



HAL
open science

Les biomarqueurs à visée pronostique dans le cancer du sein

Laëtitia Ganier

► **To cite this version:**

Laëtitia Ganier. Les biomarqueurs à visée pronostique dans le cancer du sein. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01625975

HAL Id: dumas-01625975

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01625975>

Submitted on 30 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 23 OCTOBRE 2017

PAR

Mlle GANIER Laëtitia

Né(e) le 26 Septembre 1993 à Orange (84)

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

**Les biomarqueurs à visée pronostique dans le
cancer du sein**

JURY :

Président : M. Jean-Paul Borg, Professeur et Vice-Doyen Recherche, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université

Membres : Mme. Véronique Andrieu, Maître de conférences, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université

Mme. Emmanuelle Charafé-Jauffret, Docteur en Médecine

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 23 OCTOBRE 2017

PAR

Mlle GANIER Laëtitia

Né(e) le 26 Septembre 1993 à Orange (84)

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

**Les biomarqueurs à visée pronostique dans le
cancer du sein**

JURY :

Président : M. Jean-Paul Borg, Professeur et Vice-Doyen Recherche, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université

Membres : Mme. Véronique Andrieu, Maître de conférences, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université

Mme. Emmanuelle Charafé-Jauffret, Docteur en Médecine

27 Boulevard Jean Moulin – CS 30064 - 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen : Mme Françoise DIGNAT-GEORGE

Vice-Doyens : M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT

Chargés de Mission : M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER

Conseiller du Doyen : M. Patrice VANELLE

Doyens honoraires : M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE

Professeurs émérites : M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER

Professeurs honoraires : M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI

Chef des Services Administratifs : Mme Florence GAUREL

Chef de Cabinet : Mme Sandrine NOURIAN

Responsable de la Scolarité : Mme Myriam TORRE

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Caroline MONTET

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN
Mme Florence SABATIER-MALATERRE

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI
M. Thierry AUGIER
M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Nathalie BARDIN
Mme Dominique ARNOUX
Mme Aurélie LEROYER
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

Mme Michèle LAGET
M. Michel DE MEO
Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Sylvie COINTE

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

M. Henri PORTUGAL
Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Philippe GALLICE

CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE –
CHIMIE THERAPEUTIQUE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

Mme Evelyne OLLIVIER

PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE

M. Jean-Pierre CALISSI

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY
Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARDCHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUESM. David BERGE-LEFRANC
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Catherine DIANA
Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANACHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIEM. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDET
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Thierry ATHUYT

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE
ET GESTION DE LA PHARMAFAC

M. Philippe BESSON

AHU

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

Mme Manon ROCHE

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE

Mme Camille DESGROUAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

ATER

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL
-----------------	---

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1^{er} décembre 2015

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Jean-Paul Borg pour m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse ainsi que pour sa disponibilité et ses conseils. Mes sincères remerciements pour m'avoir fait découvrir le domaine de la recherche en Cancérologie, pour avoir accepté de me recevoir en stage au sein de son équipe du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille dans le cadre de ma 5^{ème} année de Pharmacie dont le travail réalisé fait partie intégrante de cette thèse et également pour avoir accepté de m'accompagner dans un nouveau projet de recherche dans le cadre d'une thèse de Science en Cancérologie.

Je remercie le professeur Véronique Andrieu pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse. Mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, votre relecture attentive et votre aide qui ont permis son aboutissement. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Je remercie également le docteur Emmanuelle Charafe-Jauffret pour avoir contribué à la réalisation de ce manuscrit de thèse et pour avoir accepté de juger ce travail. Un grand merci également pour m'avoir accompagné et conseillé dans la réalisation du projet de recherche présenté dans cette thèse.

Je remercie mes amis sans qui ces années n'auraient pas été les mêmes : ma Clara qui malgré la distance est toujours présente, Anais, Julie, Justine, Robin, Mounia, Sam et une mention spéciale pour Amélie ma binôme de choc pendant toutes ces années de Pharmacie.

Enfin, je remercie mes parents, ma famille, Carine&Charly et tout particulièrement ma grand-mère qui a eu le courage de lire l'intégralité de cette thèse. Merci de m'avoir supporté, soutenu et encouragé durant toutes ces années.

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

Sommaire

Liste des abréviations	15
Liste des illustrations.....	16
Chapitre 1 : Introduction Générale.....	19
Le cancer du sein.....	20
I- Epidémiologie.....	20
II- Classification.....	20
A- Histologie de l'épithélium mammaire normal	21
B- Classification anatomopathologique classique.....	21
1- <i>Les cancers in situ</i>	22
2- <i>Les carcinomes infiltrants</i>	22
C- Classification TNM.....	23
D- Proposition d'une classification moléculaire	23
1- <i>Sous-types Luminaux</i>	25
2- <i>Sous-type HER2+</i>	25
3- <i>Sous-type Basal</i>	25
4- <i>Sous-type Normal-like</i>	26
5- <i>Sous-type Claudin-low</i>	26
III- Thérapeutiques actuelles	26
A- Chirurgie.....	27
B- Radiothérapie.....	27
C- Hormonothérapie	27
D- Chimiothérapie	28
E- Thérapies ciblées.....	29
Les Biomarqueurs.....	30
I- Définition.....	30
II- Exemples de biomarqueurs.....	30
III- Caractérisation et place des biomarqueurs	32

Chapitre 2 : Les biomarqueurs à visée pronostique dans le cancer du sein.....	34
Les biomarqueurs protéiques et génétiques à visée pronostique utilisés en pratique clinique et biologique	35
I- Méthodes d'identification et de mesure.....	35
A-L'Immunohistochimie (IHC)	35
B- FISH (Fuorescence in situ Hybridization)	36
C- ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)	37
II- Les récepteurs hormonaux (RH).....	38
A- Les récepteurs aux oestrogènes	39
1- Récepteurs : structure et mécanisme de transcription	39
2- Récepteurs aux estrogènes et cancer du sein	40
3- Mise en évidence des récepteurs aux œstrogènes dans le cancer du sein	40
B- Les récepteurs à la progestérone.....	41
1- Récepteurs : structure et mécanisme de transcription	41
2- Récepteurs à la progestérone et cancer du sein	42
3- Mise en évidence des récepteurs à la progestérone dans le cancer du sein	43
III- Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 - HER2	44
A- Structure du récepteur HER2.....	45
B- HER2 et cancer du sein	45
C- Mise en évidence de HER2 dans le cancer du sein	47
1- IHC - Herceptest®	47
2- FISH	48
IV- Protéine Ki-67.....	49
A- Protéine Ki-67 : Généralités	49
B- Ki-67 : facteur pronostic ou prédictif ?	50
C- Mise en évidence de Ki-67 dans les cancers du sein	51
V- uPA/PAI-1 (Urokinase plasminogen activator / Plasminogen activator inhibitor -1)	52
A- Biologie	52
1- Spécificité de substrat	52

2- Action via un récepteur membranaire	53
B- Implication dans le cancer du sein.....	53
C- Mise en évidence dans le cancer du sein.....	54
Les biomarqueurs émergents	55
I- Signatures Multigéniques.....	55
A- Méthodes de détermination des signatures multigéniques.....	55
1- Technologie de la RT-qPCR.....	55
2- Technologie des "puces à ADN"	57
B- Signature à moyen débit reposant sur la technologie de la RT-qPCR	58
1- Endopredict® (Myriad)	58
2- Oncotype DX® (Genomic Health)	60
C- Signature à haut débit reposant sur la technologie des "puces à ADN"	62
1-MammaPrint score	62
2- Prosigna® (PAM50) (Nanostring).....	63
D-Avenir des signatures multigéniques.....	65
II- IHC4	67
A- Détermination du score IHC4	67
B- Intérêts et limites de l'IHC4.....	68
Exemples de voies de recherche	69
I- ALDH1 (Aldéhyde déshydrogénase 1)	69
II- miR34a.....	71
III- Immunoscore	72
Chapitre 3 : Développement et mise sur le marché des biomarqueurs.....	75
Identification d'un nouveau biomarqueur - Application : mise au point des techniques d'immunohistochimie et mise en évidence de Vangl1 et Vangl2 dans le cancer du sein ..	76
I- Introduction	76
II- Matériel et Méthodes	80
A- Méthodes - Immunohistochimie	80
1-Préparation des échantillons pour la réalisation d'une IHC.....	80

2- Protocole d'immunohistochimie	81
B- Anticorps	82
C- Biologie cellulaire	83
1-Lignées cellulaires et culture	83
2-Réalisation des culots cellulaires pour inclusion en paraffine.....	85
D- Biochimie - Western Blot	86
1-Préparation de l'échantillon	86
2-Electrophorèse des protéines	86
3-Transfert des protéines	86
4-Détection des protéines	87
III- Résultats	87
A- Etude de Vangl1 chez l'homme	87
1-Etude de la spécificité du marquage par les anticorps anti-Vangl1 en IHC	87
2-Développement des conditions d'IHC sur tissus humains	88
a-Xénogreffes dérivés de patients incluses en paraffine	88
b-Tumeurs du sein incluses en paraffine.....	90
3-Corrélation des données d'expression de Vangl1obtenues par Western Blot et IHC	91
4-Etude de Vangl1 en Immunohistochimie sur Tissue MicroArray	93
B- Etude de Vangl1 chez la souris.....	95
1-Etude de la cross-réactivité des anticorps monoclonaux anti-Vangl1 chez la souris	95
2-Etude de la spécificité du marquage des clones anti-Vangl1 en IHC	96
a-Modèles murins KO Vangl1	97
b-Epreuve de compétition.....	97
C- Etude de Vangl2 chez l'homme.....	98
D- Etude de Vangl2 chez la souris	101
1-Etude de la spécificité du marquage des clones anti-Vangl2 chez la souris en IHC.....	101
2-Etude de l'expression de Vangl2 chez l'embryon de souris (inclus en paraffine) par IHC	103
IV- Discussion et Conclusion.....	105

Validation	108
I- Validation Analytique	108
A- Contrôle de qualité interne d'une méthode quantitative	108
B- Evaluation externe de la qualité d'une méthode quantitative	109
C- Maitrise de la qualité d'une méthode de type qualitative	110
II- Validation Clinique	111
A- Introduction	111
B- Matériels et Méthodes	112
1- <i>Les patients</i>	112
2- <i>Caractéristiques de l'échantillon</i>	112
3- <i>Méthodes de l'essai</i>	113
4- <i>Conception de l'étude</i>	113
5- <i>Méthodes d'analyse statistique</i>	115
C- Résultats.....	116
1- <i>Données</i>	116
2- <i>Analyse et présentation</i>	117
D- Discussion	119
III- Utilité Clinique	120
A- Diagramme TMUGS : <i>Tumor Marker Utility Grading System</i>	120
B- Grille de HAYES mise à jour par Simon en 2009	122
 Commercialisation : cas des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro	125
I- Définition et Classification des DMDIV.....	125
II- Obligations générales des fabricants - (UE)2017/746 Article 10	126
III- Surveillance après commercialisation - (UE)2017/746 Chapitre VII	127
 Conclusion Générale	129
 Bibliographie	130
 Annexe I	141

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique	IHC : Immunohistochimie
ALDH1 : Aldéhyde déshydrogénase 1	KO : Knock-out
ARN : Acide Ribonucléique	LBD : domaine de liaison du ligand
AF : domaine d'activation transcriptionnelle	LOE : Level of Evidence
CIQ : Contrôle de qualité interne	miRNA : microARN
CrispR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	NLS : signal de localisation nucléaire
DBD : domaine de liaison à l'ADN	PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor 1
DMDIV : Dispositifs médicaux de Diagnostic In Vitro	PCP : polarité cellulaire planaire
EEQ : Evaluation externe de la qualité	PDGFR : Platelet-Derived Growth factor Receptor
EGF : Epidermal growth factor	PDX : xéno greffes dérivés de patients
EGFR: Récepteur de l'EGF	PR (ou RP) : Récepteurs à la progestérone
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	R&D : Recherche et Développement
ER (ou RE) : Récepteurs aux œstrogènes	RDR : risque de récidence
ERE : Estrogen Responsive Element	RT-PCR : Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
FDA : Food and Drug Administration	SPAC : Suivi des Performances Après Commercialisation
FFPE : formalin fixed paraffin embedded	TMA : Tissu Micro Array
FISH : Fluorescence in situ hybridization	TMUGS : tumor marker utility grading system
GGI : Genomic Grade Index	TPMT : Thiopurine S-méthyltransférase
GHTF : Global Harmonization Task Force	UICC : Union Internationale Contre le Cancer
HER2: Human Epidermal Growth factor Receptor 2	uPA : Urokinase Plasminogen Activator
HRE : Hormone Responsive Element	WB : Western Blot
HRP : Horse radish peroxidase	WT : Wild type

Liste des Illustrations

Liste des Figures

- FIGURE 1 : Histologie de l'épithélium mammaire normal
- FIGURE 2 : Historique de la découverte et de l'utilisation des biomarqueurs
- FIGURE 3 : Principe d'une réaction d'Immunohistochimie
- FIGURE 4 : Principe de la technique de FISH
- FIGURE 5 : Principe d'une réaction ELISA
- FIGURE 6 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs aux œstrogènes
- FIGURE 7 : Immunomarquage des récepteurs aux œstrogènes
- FIGURE 8 : Structure primaire des 3 isoformes du récepteur à la progestérone
- FIGURE 9 : Immunomarquage des récepteurs à la progestérone sur tissus mammaires tumorale riche en PR
- FIGURE 10 : Architecture des domaines protéiques de l'EGFR
- FIGURE 11 : Voie de signalisation HER2
- FIGURE 12 : Exemples de marquage de la protéine HER2 par l'Herceptest®
- FIGURE 13 : Evaluation de l'amplification génique de HER2 par FISH
- FIGURE 14 : Illustration des différents niveaux d'expression de Ki-67
- FIGURE 15 : Synthèse d'ADNc à partir d'un ARNm
- FIGURE 16 : Premier cycle de PCR
- FIGURE 17 : Principe de la technologie des "Puces à ADN"
- FIGURE 18 : Panel de gènes du test OncotypeDx®
- FIGURE 19 : Probabilité de récurrence à distance selon la catégorie de risque
- FIGURE 20 : Expression génique des sous-types de cancers du sein définie par le PAM50
- FIGURE 21 : Estimation du risque prévu à 10 ans au sein du groupe d'état ganglionnaire
- FIGURE 22 : Exemples de marquage ALDH1 dans le cancer du sein
- FIGURE 23 : Courbes de survie générale en fonction de l'expression d'ALDH1
- FIGURE 24 : Définition et méthodologie de l'Immunoscore
- FIGURE 25 : Correspondance entre le contexte immunitaire et l'Immunoscore
- FIGURE 26 : A - Polarité cellulaire planaire ; B - Voie de signalisation WNT
- FIGURE 27 : A- Survie sans métastase avec ou sans surexpression de Vangl2 ; B – Survie générale avec ou sans surexpression de Vangl1

FIGURE 28 : A- Expression de Vangl2 dans le cancer du sein ; B- Expression de Vangl1 dans le cancer du sein

FIGURE 29 : Structure des protéines Vangl

FIGURE 30 : Principe de la technologie siRNA

FIGURE 31 : Principe de la technologie Crispr

FIGURE 32 : Etude de spécificité du marquage chez l'homme des anticorps anti-Vangl1

FIGURE 33 : Production de PDXs (Patient Derived Xenografts)

FIGURE 34 : Développement des conditions d'IHC sur xénogreffes dérivés de patients incluses en paraffine

FIGURE 35 : Développement des conditions d'IHC sur tumeurs du sein incluses en paraffine

FIGURE 36 : Corrélation des données d'expression de Vangl 1 obtenues par Western Blot et Immunohistochimie

FIGURE 37 : IHC sur Tissue MicroArray sein "tout-venant"

FIGURE 38 : Variation de l'expression de Vangl1 en fonction du sous type de cancer du sein

FIGURE 39 : Variation de l'expression de Vangl1 en fonction de l'index de prolifération

FIGURE 40 : Etude de la cross-réactivité des clones anti-Vangl1 chez la souris

FIGURE 41 : Focus sur quelques structures embryonnaires fortement marquées chez la souris

FIGURE 42 : Etude de la spécificité du marquage des clones anti-Vangl1 chez la souris

FIGURE 43 : Essai de mise en évidence de Vangl 2 par IHC sur PDX incluse en paraffine

FIGURE 44 : Essai de mise en évidence de Vangl2 par IHC sur culots cellulaires inclus en paraffine

FIGURE 45 : Essai de mise en évidence de Vangl2 par IHC sur culot cellulaire inclus en paraffine (protocole de 2010)

FIGURE 46 : Reproduction du protocole utilisé en 2010 pour mettre en évidence Vangl2 sur PDX et sur tumeur basale

FIGURE 47 : Etude de la spécificité du marquage des clones purifiés anti-Vangl2 chez la souris en IHC

FIGURE 48 : Etude de la spécificité du marquage des clones purifiés anti-Vangl2 chez la souris (2) - Clone 2G4 lot n°2

FIGURE 49 : Etude de l'expression de Vangl2 chez l'embryon de souris inclus en paraffine

FIGURE 50 : Focus sur certaines structures embryonnaires de la souris exprimant Vangl2 en IHC

FIGURE 51 : Diagramme TMUGS (grille de Hayes)

Liste des Tableaux

TABLEAU 1 : Guidelines pour la détermination du score HercepTest®

TABLEAU 2 : Annotation fonctionnelle et association de phénotypes spécifiques des gènes d'intérêt

TABLEAU 3 : Classification du risque par plage de RDR et état ganglionnaire

TABLEAU 4 : Anticorps utilisés

TABLEAU 5 : Echelle de score d'utilité clinique des marqueurs tumoraux

TABLEAU 6 : Grille de Simon

TABLEAU 7 : Classification des DMDIV selon le GHTF

Chapitre 1 : Introduction Générale

Introduction au chapitre :

Ce premier chapitre est une introduction à ce travail de Thèse intitulé « **Biomarqueurs à visée pronostique dans le cancer du sein** ». Dans un premier temps, nous aborderons des généralités sur le cancer du sein telles que l'épidémiologie, les différentes classifications actuelles ainsi que les thérapeutiques utilisées en pratique clinique. Dans un second temps, ce chapitre permettra de préciser la définition des biomarqueurs, leur caractérisation et place dans la prise en charge thérapeutique.

Le cancer du sein

I- EPIDÉMIOLOGIE

Les cancers de la prostate, du sein, du côlon-rectum et du poumon sont les cancers les plus fréquents. En 2015, le nombre de nouveaux cas de cancers en France métropolitaine est estimé à 385 000. Le nombre de décès est quant à lui estimé à 149 500. Chez l'homme, le cancer du poumon est le plus meurtrier devant le cancer colorectal et le cancer de la prostate. Chez la femme, c'est le cancer du sein qui se situe en tête de la mortalité précédant les cancers du poumon et colorectaux.

Le cancer du sein constitue donc un enjeu de santé publique en se situant au 1^{er} rang des cancers incidents chez la femme avec 54 000 nouveaux cas et 11 900 décès (taux de mortalité de 14,6 pour 100 000 femmes) estimés en 2015 en France métropolitaine selon une étude de l'Institut National du Cancer(1). Cela représente 31% de l'incidence des cancers chez la femme et 18,2% des décès par cancer féminin. Une femme sur 9 développera un cancer du sein au cours de sa vie.

Bien que le cancer du sein soit considéré comme une maladie du monde développé, une majorité (69%) de l'ensemble des décès survient dans les pays en développement(2). Cela est essentiellement dû à une absence de programme de dépistage précoce, se traduisant par une proportion élevée de femmes présentant une maladie à un stade avancé, et également à l'absence d'infrastructures de diagnostic et de traitement appropriées.

II- CLASSIFICATION

Le cancer du sein est une maladie très hétérogène, rendant compte d'un grand nombre d'entités biologiques associées à des caractéristiques pathologiques spécifiques et un comportement clinique différent. Cette hétérogénéité, associée à une adaptation permanente aux pressions environnementales (naturelles, traitements ou autres), a des implications cliniques multiples qui nécessitent un diagnostic précis afin d'adapter au mieux la thérapeutique et maximiser les chances des patientes à vaincre la maladie. Afin de prendre en compte cette hétérogénéité, différentes classifications sont disponibles et permettent de définir

des sous-groupes de patientes présentant des caractéristiques communes. Ces classifications reposent sur des critères cliniques et pathologiques, anatomopathologiques ou moléculaires.

A- Histologie de l'épithélium mammaire normal

Afin de mieux appréhender la classification actuelle des cancers du sein, il est important de rappeler, dans un premier temps, l'histologie de l'épithélium mammaire normal (3).

La glande mammaire est formée de deux épithéliums distincts (Figure 1): (i) le myo-épithélium (ou épithélium basal), situé au contact de la lame basale et du stroma environnant. Ce dernier entoure les canaux et est à l'origine de leurs propriétés contractiles ; (ii) l'épithélium luminal faisant face au lumen et subdivisé en cellules longeant les canaux et en cellules alvéolaires à l'origine de la production de lait.

La glande mammaire est également composée de cellules souches et progénitrices plus ou moins engagées dans une voie de différenciation qui sont à l'origine de son importante capacité proliférative et régénérative. Ces cellules, plus rares, sont situées en position basale ou supra-basale, probablement au niveau de niches spécialisées.

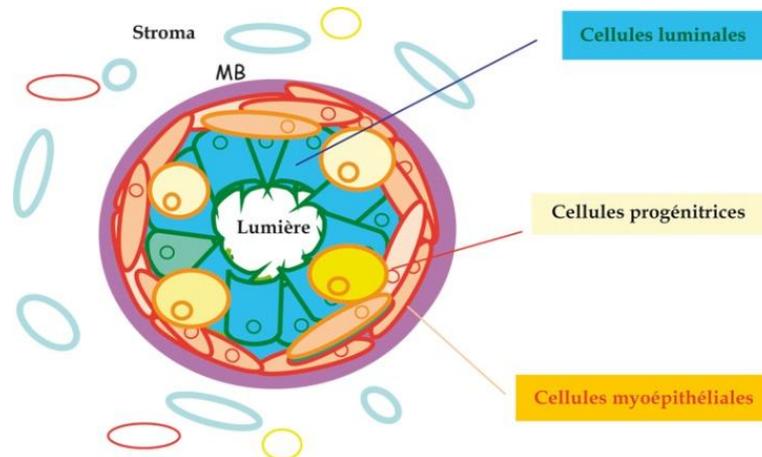


Figure 1 : Histologie de l'épithélium mammaire normal(3)

B- Classification anatomopathologique classique

La classification anatomopathologique des cancers du sein permet de distinguer les cancers *in situ* et les cancers infiltrants.

1- Les cancers *in situ*

Les cancers *in situ* correspondent à une prolifération de cellules malignes sans rupture de la membrane basale et ne comportent, théoriquement, pas de risque d'envahissement ganglionnaire.

Deux types de cancers *in situ* sont décrits : (i) les carcinomes canaux, les plus fréquents (15 à 20% des cancers du sein) et (ii) les carcinomes lobulaires. Ces derniers sont rares et actuellement considérés comme des facteurs de risque de développer un cancer infiltrant dont la fréquence de survenue est estimée entre 20 et 30% avec cependant une apparition tardive dans les 10 à 25 ans suivant le diagnostic(3).

2- Les carcinomes infiltrants

Dans ce cas, la prolifération tumorale dépasse la membrane basale. Les ganglions les plus souvent atteints par les cellules cancéreuses se trouvent sous les bras, au niveau des aisselles. Ils sont appelés ganglions axillaires. 21 types histologiques de carcinomes infiltrants sont décrits par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Les carcinomes infiltrants les plus courants sont : (i) le carcinome canalaire infiltrant ou adénocarcinome canalaire. Il représente plus de 70% des carcinomes infiltrants et trouve son origine au niveau des canaux mammaires avant de s'étendre à l'ensemble des tissus mammaires environnants ; (ii) le carcinome lobulaire infiltrant qui représente 10% de tous les cancers du sein infiltrants. Il prend naissance dans les lobules mais traverse les glandes pour se propager aux tissus mammaires voisins et parfois aux ganglions lymphatiques ou d'autres parties du corps.

D'autres formes plus rares peuvent également être observées, comme par exemple :

- Le carcinome médullaire mammaire. Il représente 1% des cancers du sein infiltrants et se manifeste davantage chez les femmes de moins de 50 ans. Sa bordure est souvent de forme arrondie et bien limitée. Il présente une infiltration lymphoïde importante mais un pronostic plus favorable que le carcinome canalaire infiltrant. Ce type de carcinome déplace généralement les tissus environnants sans les infiltrer.
- Le carcinome tubuleux. Ce dernier représente 1 à 2% des cancers du sein infiltrants. Il se manifeste davantage chez les femmes de 55 ans et plus. Le carcinome tubuleux a

tendance à être de petite taille et à ne pas se propager aux ganglions lymphatiques des aisselles. Il présente également un meilleur pronostic.

C- Classification TNM

Afin de définir l'ampleur du processus cancéreux au sein des tumeurs solides, l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) a établi la classification TNM. Cette classification permet de prendre en compte la taille de la tumeur (T), l'envahissement ou non des ganglions lymphatiques (N pour *node*) et la présence ou absence de métastases (M). La classification TNM du cancer du sein définit par la 7^{ème} édition de l'UICC est présentée dans l'*Annexe 1*.

L'association de ces trois critères permet de définir un stade caractérisant le degré de progression tumorale au moment de la résection chirurgicale. Plus le stade est élevé, plus le risque de récurrence et de métastases est important. Cette classification fait partie des premiers moyens développés afin d'établir le pronostic des patients dans de nombreux types de cancers dont le cancer du sein(4,5). La définition du stade TNM va également permettre d'orienter le choix de la thérapeutique après chirurgie en fonction de la situation clinique. Cependant, il s'est avéré que cette classification ne permettait pas de proposer le traitement le plus adapté dans le cancer du sein, c'est pourquoi cette dernière a été associée à une autre classification prenant en compte les caractéristiques moléculaires de la tumeur.

D- Proposition d'une classification moléculaire

L'utilisation de techniques génomiques à haut débit a récemment permis d'ajouter une caractérisation moléculaire aux données histologiques et cliniques utilisées jusqu'à la fin des années 90 pour classer les différents types de cancers du sein.

Ces techniques ont permis d'identifier quatre sous-types majeurs sur la base de leur profil d'expression génique : Luminal A, Luminal B, Basal-like, HER2+ (ou ERBB2+). Un cinquième sous-type moins fréquent, le sous-type Normal-like, et, plus récemment, le sous-type Claudin-low(6), ont été ajoutés à cette classification.

1- Sous-types luminaux

Deux tiers des cancers du sein sont caractérisés par l'expression de récepteurs aux œstrogènes. Parmi eux, deux sous-types ont pu être identifiés, les luminaux A et B. Ces sous-types, bien qu'ayant des caractéristiques communes, présentent des différences dans le profil d'expression génique, le pronostic et la réponse aux thérapeutiques.

En effet, le sous-type luminal A correspond majoritairement à des cancers de bas grade, exprimant les récepteurs hormonaux (œstrogènes ER et progestérone PR) et d'évolution plutôt favorable. Le sous-type luminal B présente, le plus souvent, un niveau d'expression plus faible en ER ainsi qu'un niveau d'expression plus faible voire une absence d'expression des PR. Ce sous-type est de grade plus élevé et va présenter une expression plus importante de gènes codant pour des régulateurs du cycle cellulaire et notamment liés à la prolifération cellulaire (*exemple* : Ki67). Le sous-type luminal B présente donc un pronostic moins bon que celui du groupe A.(7)

2- Sous-type HER2+

Ce sous-type est caractérisé par une amplification du gène *HER2* (ou *ERBB2*) qui est un proto-oncogène impliqué dans la synthèse de la protéine de surface HER2 (HumanEpidermalGrowth factor Receptor 2) appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase.

Ce sous-type présente également une expression importante des gènes codant pour des régulateurs du cycle cellulaire ainsi qu'une expression modérée des gènes codant pour des protéines lumineales (ER et PR). Ces tumeurs sont de pronostic plutôt défavorable.

3- Sous-type basal

Le sous-type basal est caractérisé par l'expression de gènes identiques à ceux exprimés par les lignées de cellules myoépithéliales. Ces cancers, très prolifératifs, ne vont exprimer ni les récepteurs hormonaux, ni ERBB2 mais présentent au moins un marqueur des cellules basales (CK5/6, EGFR, vimentine, actine du muscle lisse, c-kit)(8). De plus, ils présentent un taux plus important de mutations du gène suppresseur de tumeur *P53*. Contrairement aux cancers luminaux, ils sont de haut grade et de mauvais pronostic. La définition formelle des sous-

types repose sur les profils d'expression mais le sous-type basal est le plus souvent défini comme le cancer du sein « triple négatif » (ER-, PR-, HER2-).

4- Sous-type normal-like

Ce sous-type présente une expression génique proche de celle du tissu mammaire normal. Le phénotype des tumeurs de ce sous-type reste assez mal défini. Leur pronostic est intermédiaire.

5- Sous-type Claudin-low

La caractérisation moléculaire du sous-type Claudin-low a mis en évidence un enrichissement du sous-type en caractéristiques analogues aux cellules souches et en marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse ce qui le différencie en grande partie des autres sous-types. De plus, il présente une expression faible en marqueurs luminaux et de prolifération. Ces tumeurs, également « triple négatives » sont de mauvais pronostic et présentent une réponse aux chimiothérapies intermédiaire(6).

Environ 10 à 15% des tumeurs restent non classées et n'appartiennent pas aux groupes précédemment décrits. Certains sous-types sont eux-mêmes hétérogènes tels que le sous-type luminal A (hétérogénéité des tumeurs ER+), basal (p53 +/- ; BRCA1) ou HER2 (ER+/-) et des analyses plus approfondies permettront d'améliorer cette classification. La possibilité d'intégrer ainsi progressivement la classification histoclinique et la classification moléculaire devrait permettre une meilleure approche des traitements.

III- THÉRAPEUTIQUES ACTUELLES

L'établissement des critères anatomopathologiques et moléculaires d'une tumeur permet d'orienter au mieux la thérapeutique afin d'obtenir un rapport bénéfice/risque optimal. Actuellement, le traitement du cancer du sein repose sur cinq outils fondamentaux : la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées.

A- Chirurgie

La chirurgie est une étape indispensable dans le traitement du cancer du sein, les autres traitements visant uniquement à réduire le risque de rechute. Elle consiste en l'ablation de la tumeur dans le cas de la tumorectomie, de l'ablation d'une partie du sein pour la segmentectomie, ou de l'ablation totale du sein dans le cas de la mastectomie.

B- Radiothérapie

La radiothérapie permet de traiter loco-régionalement les cancers en utilisant des radiations permettant de détruire les cellules tumorales tout en épargnant les tissus sains périphériques. Les séances de radiothérapie sont de courte durée et les effets secondaires moins importants que lors d'une chimiothérapie.

C- Hormonothérapie

L'efficacité de l'hormonothérapie est directement liée à la présence de récepteurs hormonaux dans le tissu tumoral. Si les récepteurs hormonaux sont exprimés alors le pronostic sera plutôt favorable et inversement. L'hormonothérapie sera essentiellement indiquée pour le sous-type luminal.

Différentes classes thérapeutiques sont disponibles. On retrouve :

- Les antagonistes des hormones. On retrouve deux classes : (i) les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes : tamoxifène (Kessar®, Oncotam®) et (ii) les antagonistes compétitifs des récepteurs aux œstrogènes : fulvestrant (Faslodex®).
- Les agonistes progestatifs à forte dose dont l'action va induire une inhibition de l'axe hypophyso-ovarien et donc une diminution des taux d'œstradiol, d'androgène et de cortisol. On retrouve dans cette classe : l'acétate de médroxy-progestérone (Dépoprodasone®, Farlutal®) et l'acétate de mégestrol (Mégace®).
- Les agonistes de la LH-RH (hormones de synthèse) qui vont provoquer une castration chimique par rétrocontrôle négatif de l'axe hypothalamo-hypophysaire provoquant un effondrement du taux d'œstrogènes chez la femme pré-ménopausée uniquement. Un agoniste de la LH-RH est principalement utilisé dans le cancer du sein, il s'agit de la leuproréline (Enantone LP®)

- Les inhibiteurs de la synthèse des hormones : cette inhibition est permise par les molécules anti-aromatase qui seront uniquement efficaces chez la femme ménopausée. On retrouve principalement les anti-aromatase sélectif stéroïdiens (2^{ème} génération) représentés par l'exemestane (Aromasine®) et les anti-aromatase sélectif non stéroïdiens (3^{ème} génération) représentés par l'anastrozole (Arimidex®) et le létrozol (Femara®).

De nombreuses résistances peuvent apparaître pour lesquelles le cancer devient hormono-indépendant. C'est à cause de cette résistance que le traitement hormonal n'est souvent qu'un traitement palliatif et non curatif. De plus, en cas de mauvais pronostic, l'hormonothérapie sera fréquemment associée à une chimiothérapie.

D- Chimiothérapie

La chimiothérapie n'est pas spécifiquement antitumorale mais touche essentiellement les cellules en division ce qui induit une toxicité importante. Elle permet d'éliminer le risque de dissémination, de réduire la masse tumorale et le nombre/taille de métastases afin de faciliter l'exérèse chirurgicale. Elle permet de réduire le taux de mortalité et le risque de rechute mais présente de nombreux effets indésirables pour la patiente (fatigue, nausées, vomissements, chute des cheveux).

Différentes classes de molécules sont utilisées, telles que les cytotoxiques alkylants (notamment le cyclophosphamide), les antimétabolites (taxanes) ainsi que les inhibiteurs de la topoisomérase (anthracyclines).

La chimiothérapie est essentiellement indiquée pour le sous-type basal qui ne dispose pas encore de thérapie spécifique, mais pour lequel plusieurs cibles potentielles sont étudiées et également pour le sous-type claudin-low ou le sous-type luminal en cas de mauvais pronostic.

La chimiothérapie dans le cancer du sein sera toujours associée à une radiothérapie ou une chirurgie du sein mais également à des molécules de classes différentes ou des thérapies ciblées afin d'obtenir une meilleure efficacité et de limiter le risque de résistance au traitement.

E- Thérapies ciblées

La mise en évidence d'altérations moléculaires dans les cellules tumorales ou leur environnement a permis, en décrivant mieux la maladie, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques puis de développer des thérapies spécifiquement dirigées contre elles. L'avènement des thérapies ciblées s'est déroulé conjointement à celui des biomarqueurs. Actuellement, 13 biomarqueurs conditionnant l'emploi de molécules disposent d'une autorisation de mise sur le marché dans 11 localisations tumorales, dont le cancer du poumon, le cancer colorectal et le cancer du sein.

Dans le cadre du cancer du sein, les thérapies ciblées utilisées en clinique sont essentiellement représentées par les traitements anti-HER2 (Herceptin®, Tyverb®...). On peut toutefois retrouver également des traitements ciblant l'environnement tumoral comme les anti-angiogéniques (Avastin®), qui permettent de faire régresser les vaisseaux tumoraux et d'inhiber la formation de nouveaux vaisseaux nécessaires au développement tumoral et à sa dissémination ou, les biphosphonates indiqués en cas de métastases osseuses.

Aujourd'hui, la plupart des cas de cancer du sein sont traités par chirurgie, suivie d'un traitement adjuvant par radiothérapie ou chimiothérapie afin de limiter le risque de rechute. Cependant, ce traitement reste inefficace pour plus de la moitié des patientes et occasionne de nombreux effets secondaires (9). Cet exemple illustre un enjeu majeur de santé publique qui consiste à l'orientation du traitement du cancer du sein vers la médecine personnalisée permettant une prise en charge médicale adaptée à la forme particulière de la maladie développée par chaque patiente.

Dû à l'importante hétérogénéité des cancers et à la complexité de leur développement, peu de thérapies ciblées sont, à ce jour, disponibles sur le marché. En effet, ce développement requiert tout d'abord l'identification d'une cible et d'un **biomarqueur** dont l'altération sera associée à la progression tumorale chez certains patients. Ensuite, il sera nécessaire de mettre au point un traitement permettant de rétablir le fonctionnement normal de cette cible ainsi qu'un test diagnostique dit « compagnon » permettant de prédire chez un patient donné l'efficacité du traitement.

Les biomarqueurs

I- DÉFINITION

Selon le National Institute of Health, un biomarqueur est : « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique ».

Cette définition inclut de nombreuses actions, au cours des phases de Recherche & Développement et en pratique médicale courante, réalisées par les chercheurs, l'industrie pharmaceutique ou les biologistes. Elle introduit deux notions importantes. Tout d'abord, un biomarqueur doit être mesuré avec fiabilité et précision. Ensuite, le caractère potentiellement indirect du biomarqueur qui est porté par un ou plusieurs paramètres biologiques doit permettre de caractériser un état physiologique, un état pathologique, l'évolution d'une maladie ou la réponse à un traitement.

La notion de biomarqueur est également incluse dans le concept de la théranostique qui consiste en l'utilisation d'un test diagnostique ou « test compagnon » permettant l'identification d'un marqueur afin d'orienter la thérapeutique du patient en fonction de son statut concernant le marqueur.

II- EXEMPLES DE BIOMARQUEURS

Le concept de biomarqueur n'est pas nouveau, ces derniers font partie des pratiques médicales depuis de nombreuses années mais leur développement s'est accéléré dans la dernière décennie (Figure 2). Dès 1848, la glycémie a été identifiée comme biomarqueur et reconnue tant pour caractériser le diabète que pour évaluer l'efficacité des molécules antidiabétiques.

Dans le domaine de la cancérologie, le premier biomarqueur fut découvert également en 1848. Il s'agit de la protéine de Bence-Jones qui consiste en une chaîne légère d'immunoglobuline éliminée dans les urines au cours de certaines hémopathies et notamment dans le myélome. Sa présence dans les urines contribue au diagnostic et le suivi de son taux permet de contrôler l'efficacité du traitement et l'évolution de la maladie.

L'anticancéreux 6-MercaptoPurine ou 6-MP (GSK) a été lancé en 1953 sur le marché et a permis de traiter un grand nombre de patients atteints de leucémies. En 1973, des chercheurs découvrent une forte toxicité dans certains cas qui sera plus tard identifiée comme la conséquence d'un polymorphisme de la TPMT (Thiopurine S-méthyltransférase). Les patients présentant une activité TPMT intermédiaire ou nulle s'exposent à un risque d'hématotoxicité sévère et parfois létale. Il conviendra alors pour ces patients de prescrire 10 à 50% de la dose habituellement utilisée. Dans ce cas, la recherche du polymorphisme de la TPMT aura un rôle de biomarqueur de toxicité.

On peut également citer la découverte d'une mutation du gène *KRAS* qui est fréquemment observée dans les cancers. 50% des cancers colorectaux portent une mutation activatrice des gènes *RAS* entraînant une activation constitutive de la voie de signalisation EGFR. Ces mutations vont être associées à une inefficacité des traitements anti-EGFR donc seuls les patients non-mutés pourront bénéficier des traitements de thérapies ciblées (Erbix® et Vectibix®).

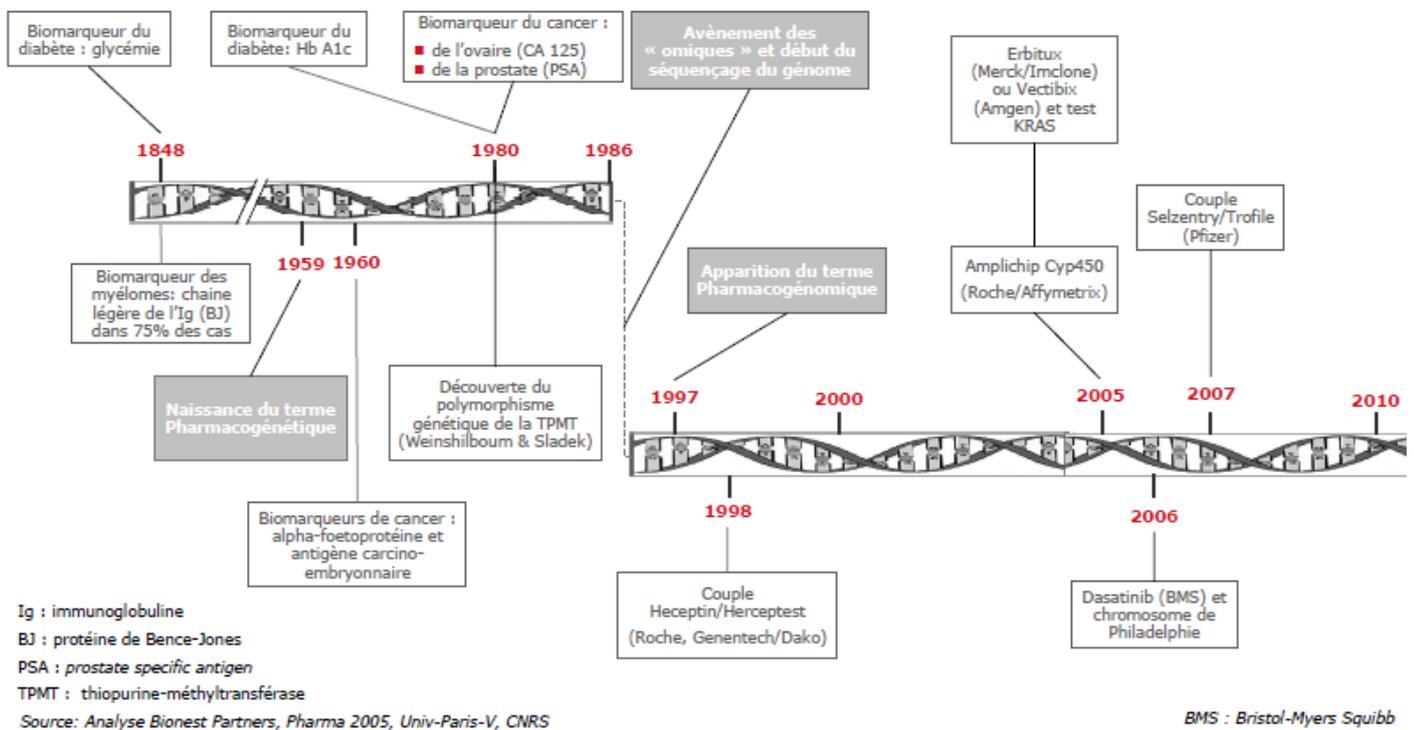


Figure 2 : Historique de la découverte et de l'utilisation des biomarqueurs

Le dosage des biomarqueurs peut correspondre à des procédures très simples comme celui de la glycémie. Grâce au progrès, celui-ci peut également correspondre à des techniques plus complexes telles que l'identification d'une mutation spécifique du génome. En effet, le

développement des biomarqueurs est essentiellement lié à l'apparition de nouvelles connaissances, notamment à l'avènement des « omiques » - génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique - et à de nouveaux outils technologiques et rapides permettant de les identifier et de les quantifier.

III- CARACTÉRISATION ET PLACE DES BIOMARQUEURS

La caractérisation des biomarqueurs peut se faire selon quatre dimensions :

- (i) La nature du paramètre mesuré laquelle peut être biologique, anatomique, physiologique, biochimique, moléculaire,...
- (ii) L'aire thérapeutique ciblée comme par exemple l'oncologie, la neurologie, l'immunologie, l'infectiologie, la cardiologie, ...
- (iii) La technologie de support qui repose essentiellement sur des technologies révélant les altérations d'un gène ou de son produit (ARN, protéine) mais également sur l'imagerie ou l'informatique.
- (iv) Le niveau de complexité entrera aussi en compte selon qu'il s'agit d'un marqueur monoparamétrique ou multiparamétrique (ex : détermination d'une signature biologique).

La notion de biomarqueur est un concept polyvalent et va être associé à une ou plusieurs étapes du cycle de vie du médicament.

Dans le cadre de la Recherche&Développement (R&D), la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques sera essentiellement associée à l'utilisation de biomarqueurs de recherche pour lesquels deux types sont définis : (i) les biomarqueurs mécanistiques, ils permettent d'étudier et/ou découvrir les mécanismes physiopathologiques d'intérêts et (ii) les biomarqueurs de stade qui permettent de faire la distinction entre les différents stades de la maladie.

Au cours de l'étape d'Evaluation Thérapeutique des nouvelles molécules identifiées, comprenant études précliniques et cliniques, seront spécifiquement utilisés des biomarqueurs d'efficacité et de toxicité ainsi que des biomarqueurs pharmacogénomiques. Les biomarqueurs d'efficacité/toxicité sont des paramètres biologiques se substituant à un critère clinique et permettent une évaluation provisoire du rapport bénéfice/risque du traitement. Les biomarqueurs pharmacogénomiques, quant à eux, vont permettre l'étude des mécanismes génétiques et des variations individuelles de la réponse aux médicaments.

Enfin, certains biomarqueurs seront utilisés de manière transversale au cours de la chaîne de valeur du médicament. On retrouve les biomarqueurs de diagnostic et/ou prédictif associés à chaque étape du cycle de vie (R&D, évaluation thérapeutique et commercialisation). Ces derniers permettent d'identifier la pathologie et des populations cibles, et donnent une indication précoce sur la réponse au traitement. Enfin, les biomarqueurs de pronostic et de suivi, associés à l'évaluation thérapeutique et à la commercialisation, permettront de prédire l'évolution de la maladie et de suivre sa progression.

Suivant ces définitions, deux types de biomarqueurs sont donc à distinguer et suivront des règles différentes de développement et de validation :

- (i) Les biomarqueurs utilisés indépendamment d'un médicament spécifique (tests de diagnostic/pronostic ou de suivi clinique par exemple) et ;
- (ii) Les biomarqueurs « compagnons », pour lesquels il existe également deux catégories :
 - Les biomarqueurs permettant de sélectionner les patients pouvant bénéficier ou non d'un traitement et ;
 - Les biomarqueurs utilisés conjointement à la prise d'un médicament afin de réaliser un suivi thérapeutique.

Dans une récente enquête, le Leem (Les Entreprises du Médicament) a estimé que seulement 3 à 5% des biomarqueurs utilisés au cours des phases de R&D et d'évaluation thérapeutique des nouveaux médicaments sont commercialisés. En cause, la difficulté de validation analytique et clinique car, afin d'envisager une utilisation en clinique, les biomarqueurs doivent présenter un maximum des critères suivants :

- | | |
|--|----------------------------|
| ✓ Utilisable en routine | ✓ Robuste |
| ✓ Faisable | ✓ Reproductible |
| ✓ Simple (ex : mise en évidence par immunohistochimie) | ✓ Mesurable |
| ✓ Economique | ✓ Standardisé |
| ✓ Rapide d'utilisation | ✓ Fondé sur une pathologie |
| | ✓ Puissant |

De plus, compte tenu des biomarqueurs déjà disponibles sur le marché, il sera essentiel d'apporter la preuve d'une utilité clinique.

Chapitre 2 : Les biomarqueurs à visée pronostique dans le cancer du sein

Introduction au chapitre :

Depuis de nombreuses années, les facteurs pronostiques sont utilisés en pratique clinique afin d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein. Ces derniers permettent d'évaluer la gravité et l'évolution de la maladie. Les premiers facteurs pronostics ont été représentés par un ensemble de critères clinico-pathologiques donnant notamment lieu à la classification TNM. Ces facteurs classiques sont bien connus et peu de changements sont intervenus ces dernières années dans leur connaissance ou dans l'analyse de leur impact. Cependant, l'avènement des nouvelles technologies et l'amélioration des connaissances dans le cancer du sein ont vu naître un certain nombre de biomarqueurs génétiques et protéiques permettant une caractérisation de la tumeur sur le plan moléculaire. Certains de ces biomarqueurs sont actuellement utilisés en pratique clinique et biologique et sont complémentaires des facteurs clinico-pathologiques pour l'établissement du pronostic.

Dans la première partie de ce chapitre seront présentés, de manière exhaustive, les biomarqueurs à visée pronostique et utilisés en pratique clinique et biologique. Dans la deuxième partie, nous aborderons les biomarqueurs émergents pour lesquels différents modèles ont vu le jour (signatures multigéniques, test IHC4) et qui permettent une évaluation du pronostic grâce à l'association de plusieurs facteurs pronostics distincts. Dans la dernière partie de ce chapitre, quelques exemples de voie de recherche seront présentés. En effet, de nombreuses voies sont actuellement explorées afin de développer de potentiels nouveaux biomarqueurs. L'échappement thérapeutique de certains cancers du sein et la nécessité d'améliorer la prise en charge des patientes rendent indispensables ces travaux de recherche.

Les biomarqueurs protéiques et génétiques à visée pronostique utilisés en pratique clinique et biologique

I- MÉTHODES D'IDENTIFICATION ET DE MESURE

A- *L'Immunohistochimie (IHC)*

L'IHC est une technique permettant la mise en évidence de certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques, nucléaires ou membranaires, spécifiques à un type ou à une fonction cellulaire, à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette protéine.

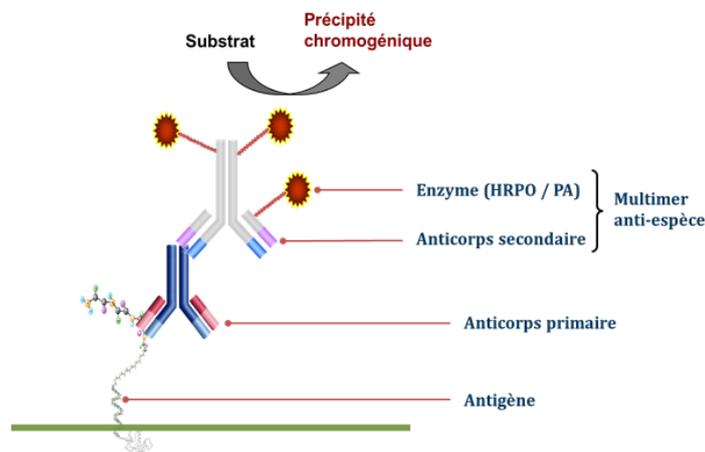


Figure 3 : Principe d'une réaction d'Immunohistochimie

Afin de mettre en évidence des protéines cellulaires, l'IHC requiert l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines aux propriétés antigéniques. Les anticorps utilisés peuvent être de deux types :

- (i) Anticorps monoclonaux : ils ne reconnaissent qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné. Ils sont tous identiques et produits par un seul clone de plasmocyte.
- (ii) Anticorps polyclonaux : dans ce cas les anticorps seront hétérogènes car produits par des cellules différentes. Ils vont ainsi reconnaître plusieurs épitopes.

L'anticorps primaire sera détecté par un anticorps secondaire dirigé contre la partie constante du premier. L'anticorps secondaire est marqué par une enzyme dont l'activité va se manifester par la formation d'un précipité chromogénique après ajout du substrat. Ce précipité permettra une immuno-localisation de l'antigène spécifique en premier lieu au niveau tissulaire puis, si

possible, une localisation subcellulaire c'est-à-dire cytoplasmique, nucléaire ou membranaire (Figure 3).

La technique d'immunohistochimie est utilisée en pratique clinique courante afin de mettre en évidence les récepteurs hormonaux (RE et RP), le récepteur HER2 ainsi que le Ki-67 dans le cancer du sein. Les marquages sont réalisés sur des zones tumorales représentatives de la tumeur choisie par le pathologiste qui peut ainsi distinguer les secteurs de carcinome invasif par rapport au reste du tissu. Il s'agit d'une évaluation semi-quantitative et subjective permettant la détermination de la présence ou de l'absence des protéines dans les cellules tumorales.

B- FISH (Fluorescence in situ Hybridization)

La technique de FISH permet l'hybridation de séquences spécifiques marquées sur le génome entier : centromères, régions sub-téломériques, loci spécifiques. Elle permet la détection de délétions ou d'amplification, l'identification de translocations ou d'autres réarrangements chromosomiques.

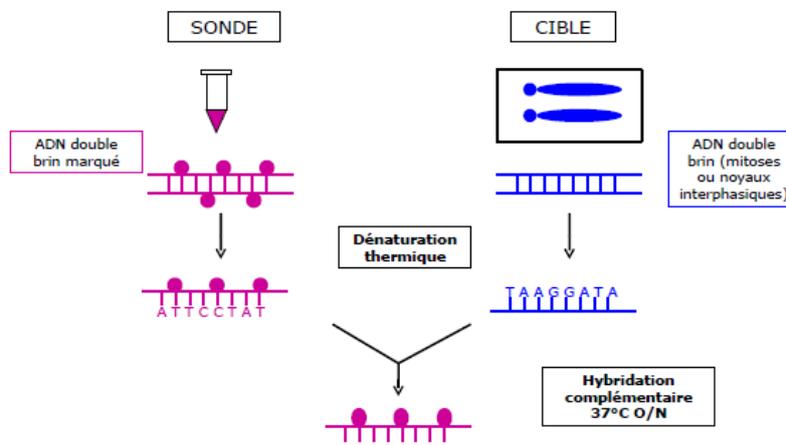


Figure 4 : Principe de la technique de FISH

Les sondes sont réalisées séparément suivant différents protocoles possibles mais tous basés sur la reconstitution d'un brin d'ADN à partir d'un brin matrice de départ. L'hybridation consiste à mettre en présence les sondes avec les molécules d'ADN peignées, c'est à dire étirées et alignées sur lamelles silanisées pour l'analyse en microscopie à fluorescence. L'ADN cible et les sondes sont ensuite dénaturés afin de permettre l'appareillage spontané des sondes aux séquences complémentaires présentes sur l'ADN. La révélation est ensuite

permise grâce à la reconnaissance des sondes par des anticorps marqués en fluorescence (Figure 4).

Cette technique permet de mettre en évidence une amplification du gène codant pour la protéine HER2 surexprimée dans certains cancers du sein et est utilisée en association à l'IHC. La réalisation de la FISH nécessite la sélection d'un tissu comprenant du carcinome infiltrant essentiellement et le contrôle de certaines étapes comme les conditions de fixation, l'épaisseur des coupes (4-5µm) et la digestion du tissu (éviter la sous- et sur-digestion) pour un résultat optimal.

C- ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

La technique ELISA est une technique permettant le dosage de protéines à faible concentration telles que des protéines plasmatiques (IgE, ferritine), hormones protéiques (hCG), marqueurs tumoraux (alpha foetoprotéine), ou molécules de petite taille (hormones stéroïdes, thyroïdiennes, médicament...). Elle permet également la recherche et le dosage d'anticorps pour le diagnostic de maladies infectieuses ou de maladies auto-immunes.

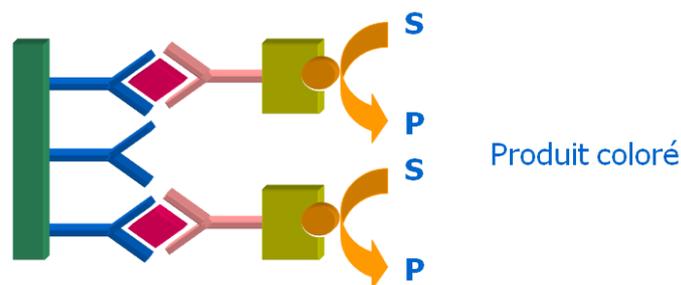


Figure 5 : Principe d'une réaction ELISA

Afin de permettre le dosage de protéines aux propriétés antigéniques, cette technique nécessite l'utilisation de deux anticorps spécifiques de l'antigène étudié. Un premier anticorps est tout d'abord fixé au fond d'une plaque de 96 puits (classiquement). La 1^{ère} étape d'incubation immunologique consiste à ajouter la protéine antigénique à doser qui se fixera ou non au premier anticorps. La 2^{ème} étape d'incubation immunologique consistera à ajouter un deuxième anticorps spécifique de l'antigène mais conjugué à une enzyme. L'ajout du substrat de l'enzyme permettra la formation d'un produit coloré dont l'absorbance sera mesurée pour établir la concentration de la protéine à l'aide d'une gamme d'étalonnage (Figure 5).

La technique d'ELISA est utilisée en pratique clinique courante, dans le cadre du cancer du sein, pour doser le biomarqueur uPA (Urokinase Plasminogen Activator) ainsi que son principal inhibiteur PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor 1). Ce test doit être réalisé à partir de tissus tumoraux frais ou congelés.

II- LES RÉCEPTEURS HORMONAUX (RH)

Depuis plus d'un siècle, un lien a pu être établi entre les hormones et le développement du cancer du sein. En 1896, George Beatson a mis en évidence que la suppression des ovaires chez la femme non ménopausée présentant un cancer du sein était à l'origine d'une réduction importante de la taille de la tumeur mais également d'une amélioration du pronostic(10). Cependant en 1900, Stanley Boyd(11) a observé que seulement un tiers des patientes répondaient de manière favorable à l'ablation des ovaires. Malgré cela, les thérapies endocrines sont devenues un standard dans le traitement du cancer du sein.

Allen et Doisy (12) mirent en évidence la production d'hormones œstrogéniques par l'ovaire et, plus tard, c'est grâce à l'amélioration des techniques notamment de la chimie des radioisotopes que le récepteur aux œstrogènes fut identifié permettant d'imaginer des molécules ciblées dans le traitement et la prévention du cancer.

Suite à l'observation que seulement un tiers des patients étaient répondeurs aux différentes formes de thérapies ablatives, Jensen and Jordan(10) ont émis l'hypothèse que si le récepteur aux œstrogènes était nécessaire à une croissance tumorale stimulée par les œstrogènes alors la détermination du statut ER dans la tumeur serait informative. C'est donc en 1971 que ces derniers ont signalé que les cancers du sein exprimant fortement les ER seraient plus susceptibles de répondre aux thérapies endocrines que les cancers ayant une faible expression(13). Cela a permis de mettre en évidence le caractère hétérogène des tumeurs mammaires et a marqué le début de l'ère des biomarqueurs dans le cancer du sein.

Par la suite, ces études se sont poursuivies avec le récepteur à la progestérone et c'est Horwitz et McGuire(14) qui, pour la première fois, ont caractérisé ce récepteur dans les cancers du sein.

A- Les récepteurs aux œstrogènes

1- Récepteurs : structure et mécanisme de transcription (Figure 6)

Les récepteurs aux œstrogènes, pour lesquels deux isoformes sont décrits : ER α et ER β , sont des facteurs de transcription activés par un ligand. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, lesquels présentent deux domaines complémentaires : un domaine de liaison à l'ADN permettant la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques nommées HRE (Hormone Responsive Element) et un domaine de liaison du ligand.

Les récepteurs nucléaires sont classés en 4 groupes selon l'état de dimérisation et les séquences d'ADN reconnus. Les ER appartiennent au groupe III qui comprend l'ensemble des récepteurs aux hormones stéroïdiennes : ER, PR, le récepteur des glucocorticoïdes, des minéralocorticoïdes et des androgènes.

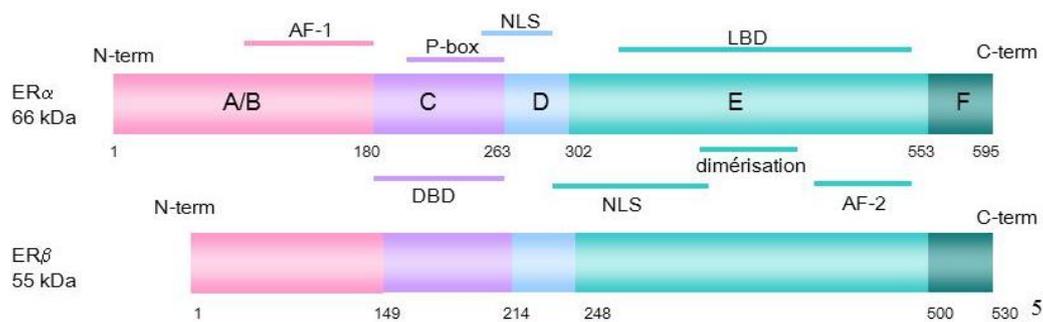


Figure 6 : Organisation structurale et fonctionnelle d'après Ogawa et al.(15) AF-1 : domaine d'activation transcriptionnelle constitutif ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; NLS : signal de localisation nucléaire ; LBD : domaine de liaison du ligand ; AF-2 : domaine d'activation transcriptionnelle

En l'absence de ligand, le récepteur est localisé dans le noyau sous forme de complexe protéique inactif, avec les protéines Hsp. La fixation du ligand au LBD va stabiliser le récepteur en une forme active qui pourra alors se dimériser. Le complexe va alors transloquer dans le noyau et se lier à une séquence spécifique de l'ADN : ERE (Estrogen Responsive Element).

Le contrôle de la transcription par les RE nécessite une interaction avec des corégulateurs, soit des coactivateurs pour la stimulation ou des corépresseurs pour l'inhibition de l'expression des gènes cibles(16). Ce contrôle est exercé via les domaines AF-1 et AF-2. Cependant, le domaine d'activation transcriptionnelle constitutif AF-1 présent sur l'isoforme ER α est

tronqué dans ER β . De ce fait, l'activation transcriptionnelle d'ER β sera uniquement permise par liaison du ligand via AF-2 localisé dans la région C-terminale.

Une action immédiate, qui ne semble pas primordiale, est néanmoins permise par fixation du ligand à des récepteurs membranaires. Cette action non transcriptionnelle est à l'origine d'une activation de voies de signalisation cytoplasmique telles que la voie des MAP kinases ou la voie PI3 kinase-AKT.

2- Récepteurs aux œstrogènes et cancer du sein

Les œstrogènes sont essentiels au développement de l'épithélium mammaire normal en favorisant la prolifération des cellules épithéliales et la morphogenèse canalaire mais ils jouent également un rôle important dans la croissance de nombreux cancers. En effet, la liaison des œstrogènes à leur récepteur (notamment ER α) va favoriser la prolifération et la survie des cellules exprimant ces récepteurs via la modulation de l'expression de gènes pro-mitotiques et anti-apoptotiques. L'action mitogène sur les cellules épithéliales de la glande mammaire peut également favoriser la génération de mutations et donc participer à la transformation tumorale(17).

Malgré l'implication d'ER α dans le processus cancéreux, l'expression des œstrogènes est généralement considérée comme un marqueur de bon pronostic. En effet, les tumeurs du sein dépendent toujours, au moins initialement, de la stimulation par les œstrogènes et l'efficacité de l'hormonothérapie est directement liée à la présence de récepteurs hormonaux dans le tissu tumoral. Cependant, de nombreuses tumeurs progressent vers une croissance œstrogène-indépendante induisant une résistance à l'hormonothérapie et une évolution plutôt défavorable du cancer.

3- Mise en évidence des récepteurs aux œstrogènes dans le cancer du sein

En pratique clinique, la détermination du statut ER est réalisée grâce à la technique d'IHC. Elle utilise un anticorps monoclonal de souris anti-ER α humain (clone 1D5) capable de reconnaître les cellules tumorales exprimant ER α dans un tissu FFPE (*formalin fixed paraffin embedded*)(18,19). Cet anticorps réagit spécifiquement avec ER α . Dans le cancer du sein, il est lié à une meilleure survie globale qu'ER β et indique une réponse favorable au traitement endocrinien ce qui rend sa mesure plus utile(18–23). La révélation est réalisée par ajout d'un

anticorps secondaire couplé directement à un polymère sur lequel est fixé l'enzyme HRP permettant la transformation de son substrat en un précipité chromogénique.

Les ER appartenant à la famille des récepteurs nucléaires, un profil de coloration nucléaire sera essentiellement observé au sein des cellules marquées (Figure 7). Tout marquage cytoplasmique devra être considéré comme non spécifique.

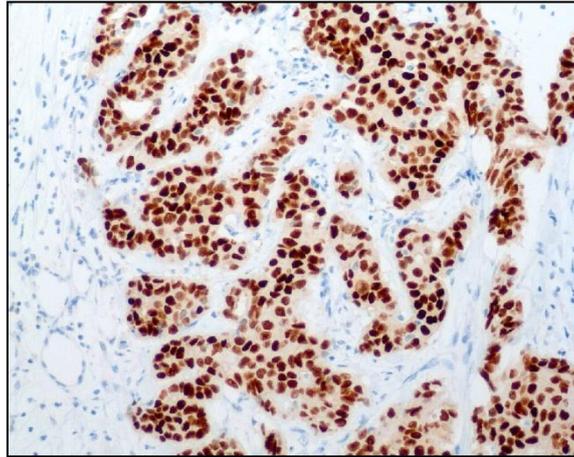


Figure 7 : Immunomarquage des récepteurs aux oestrogènes : fort marquage nucléaire des cellules tumorales (RE+)

L'interprétation des résultats devra être associée à des études morphologiques et évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests pronostics. Après réalisation de l'IHC, les lames sont analysées par un médecin anatomopathologiste qui va définir l'intensité du marquage et la quantité de cellules tumorales marquées.

Afin de déterminer le statut ER, c'est le pourcentage de cellules marquées qui doit être pris en compte. Le seuil de positivité est établi pour un % de cellules marquées supérieur ou égal à 10%. Pour une valeur inférieure à 10%, le statut de la tumeur sera considéré comme ER négatif et la patiente ne pourra pas bénéficier d'une hormonothérapie adjuvante. L'anticorps utilisé est fiable et efficace pour révéler le statut ER α , il apporte également des informations de prédiction exactes concernant la réponse aux traitements endocriniens(18,20,21).

B- Récepteurs à la progestérone

1- Récepteurs : structure et mécanisme de transcription

Les récepteurs de la progestérone (PR) appartiennent à la même superfamille de récepteurs nucléaires que les ER et sont donc également des facteurs de régulation de l'expression

génique. Les ligands des PR, nucléaires ou membranaires, sont la progestérone, les progestatifs de synthèse et les modulateurs spécifiques du récepteur de la progestérone.

Il existe 3 types de PR (Figure 8) provenant du même gène situé sur le chromosome 11(24). Ils appartiennent également au groupe III des récepteurs nucléaires. Leur structure est divisée en domaine de régulation transcriptionnelle, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand. Le domaine d'activation transcriptionnel AF1 est constitutif et son action va se déclencher dès fixation du PR à l'ADN alors qu'AF2 nécessitera, en plus, la liaison de cofacteurs. AF-3 présent uniquement sur l'isoforme B du PR va permettre la fixation de coactivateurs et induira des fonctions biologiques différentes des deux autres isoformes. La troisième isoforme, RP-C, tronquée ne possède ni les domaines AF1 et AF3 ni le domaine de liaison à l'ADN et n'a été détectée que dans le cytoplasme. Elle est incapable d'activer la transcription mais aurait un effet inhibiteur sur les autres isoformes notamment par fixation de la progestérone alors non disponible pour RP-A et RP-B(25).

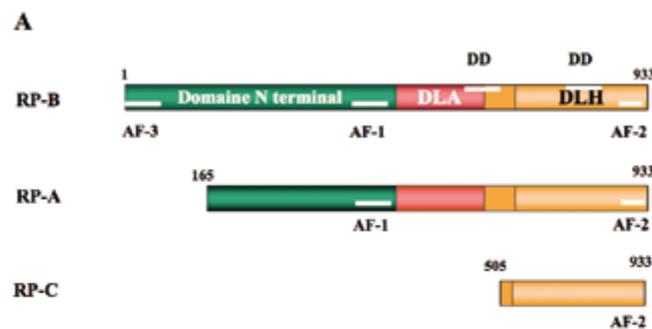


Figure 8 : D'après Kastner et al(24) Structure primaire des 3 isoformes du récepteur à la progestérone ; DLA : domaine de liaison à l'ADN ; DLH : domaine de liaison à l'hormone ; AF : domaine d'activation transcriptionnelle ; DD : domaine de dimérisation

Un faible pourcentage de PR proche de la membrane cytoplasmique va être capable d'activer différentes voies de signalisation intracellulaires de façon dépendante du progestatif fixé et jouerait un rôle dans le développement du processus cancéreux notamment par l'activation de facteurs de croissance(26).

2- Récepteurs à la progestérone et cancer du sein

L'action périphérique de la progestérone est liée à la présence d'œstrogènes. Parmi les nombreux gènes cibles de l'activité de transcription des ER, ces derniers vont avoir pour effet

de stimuler la transcription du gène PgR codant pour les RP. La progestérone va alors présenter des effets « anti-œstrogènes » ainsi que d'autres activités spécifiques de la localisation.

Dans les cancers du sein ER α +, la présence des RP va être associée à un meilleur pronostic de la maladie(27). Diverses études ont montré par exemple, que :

- (i) Sur des lignées cellulaires de cancer du sein ER α + PR+, le traitement par la progestérone induit un effet antiprolifératif(28–30).
- (ii) L'action des progestatifs va s'opposer à la croissance de xénogreffes ER α + PR+ stimulée par les œstrogènes(31)
- (iii) La stimulation de cellules de cancer du sein ER α + par la progestérone va induire une augmentation de la transcription de gènes de mort cellulaire, d'apoptose ou encore de différenciation(32).
- (iv) Dans le cancer du sein ER α +, la présence des PR va être un facteur prédictif indépendant de la réponse à une hormonothérapie adjuvante(33).

L'ensemble de ces données démontre que l'activation des récepteurs à la progestérone peut avoir un effet anti-tumoral dans le cancer du sein ER+. Les cancers du sein ER+PR+HER2- sont ceux présentant le meilleur pronostic clinique du fait d'une susceptibilité plus importante à répondre à l'hormonothérapie. Les cancers du sein ER+PR- ne présentent pas nécessairement un défaut fonctionnel des ER car d'autres facteurs peuvent contribuer à la perte de l'expression des PR et également influencer sur la réponse aux thérapies ciblant ER α (32).

3- Mise en évidence des récepteurs à la progestérone dans le cancer du sein

La détermination semi-quantitative du statut PR en clinique est également réalisée par IHC. Elle utilise des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre le PR humain (clones PgR 636 et PgR 1294) présent dans des tissus sains et pathologiques FFPE.

Les anticorps anti-PR reconnaissent les formes RP-A et RP-B et réagissent à la fois avec les PR libres et les PR liés à l'hormone(34). Les deux clones vont avoir pour épitope le domaine N-terminal présent sur les isoformes A et B. Afin d'obtenir un signal optimal, la réaction nécessite l'utilisation d'un anticorps secondaire intermédiaire lequel sera reconnu par un troisième anticorps couplé au polymère marqué à l'HRP.

L'interprétation clinique d'une coloration positive ou non doit également être associée à des études morphologiques et histologiques ainsi qu'aux antécédents cliniques du patient et autres tests diagnostics.

Le profil de coloration cellulaire attendu pour les anticorps anti-PR est également nucléaire (Figure 9). Le statut PR est positif si, tout comme le statut ER, plus de 10% des cellules présentent une coloration nucléaire, quelle que soit l'intensité.

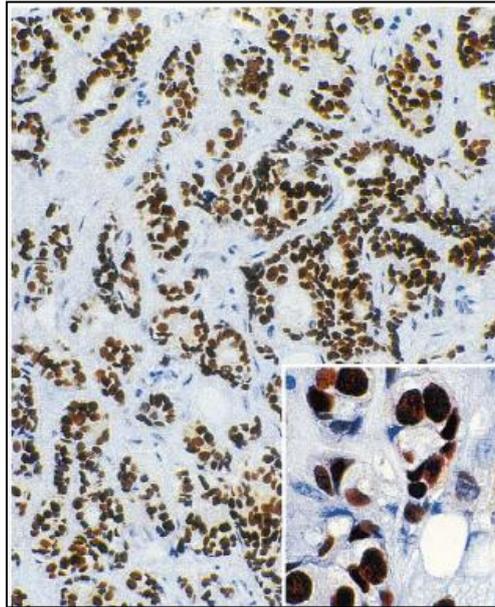


Figure 9 : Immunomarquage des récepteurs à la progestérone sur tissus mammaire tumoral riche en PR (Clone PgR 1294) (34)

III- HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 - HER2

L'EGF (Epidermal Growth Factor ou facteur de croissance épidermique) fait partie d'une famille de facteurs de croissance impliqués dans le développement et le fonctionnement de différents organes dont la glande mammaire. L'action de cette famille de facteurs de croissance, comprenant également les hétérogènes, est permise grâce à 4 récepteurs membranaires ubiquitaires : ErbB ou HER (Human EGF Receptorrelated). Dès 1987, il fut montré que la surexpression d'ErbB2 (HER2) dans le cancer du sein était un facteur de mauvais pronostic, ce qui conduisit au développement par Genentech du premier traitement ciblant un oncogène, le trastuzumab (Herceptin®)(35).

A- Structure du récepteur HER2

Les quatre récepteurs ErbB font partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase essentiels à la croissance, la différenciation et le contrôle du métabolisme cellulaire. Les récepteurs ErbB partagent une forte homologie de structure primaire qui se traduit par une organisation structurale commune caractéristique qui se décompose en trois parties(36,37) (Figure 10):

- Une région extracellulaire composée de 4 sous-domaines : L1 et L2 puis CR1 et CR2.
- Un domaine transmembranaire essentiellement caractérisé par une forte hydrophobie des acides aminés le composant.
- Une région cytoplasmique composée d'un domaine juxtamembranaire, un domaine à activité tyrosine kinase très conservé ainsi qu'un domaine terminal riche en sites de phosphorylation important pour la transduction du signal.

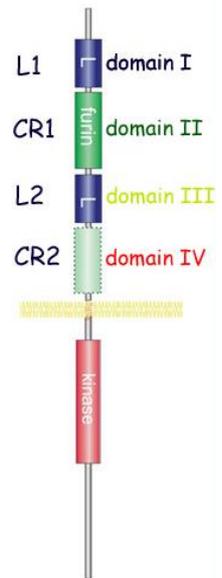


Figure 10 : Architecture des domaines protéiques de l'EGFR

B- HER2 et cancer du sein

Les récepteurs ErbB sont impliqués dans de nombreux cancers humains. Les altérations observées sont des mutations, des surexpressions (avec ou sans amplification du gène) ou une stimulation anormale par leurs ligands(36,38). Dans le cadre du cancer du sein, une surexpression de HER2 est observée dans 23% des cas. Cette surexpression correspond dans 95 à 98% des cas à un phénomène d'amplification génique suivie d'une surexpression protéique à la surface des cellules(39).

Dans un contexte physiologique, la liaison du ligand au domaine extracellulaire des HER induit la formation d'homo- ou d'hétérodimères activés (par exemple EGFR-HER2). HER2 est cependant le seul membre de la famille sans ligand identifié. Il est activé par hétérodimérisation avec un récepteur homologue capable de fixer un ligand (par exemple

EGFR, Figure 11) ou par homodimérisation lorsqu'il est surexprimé. Cette activation entraîne la phosphorylation des résidus tyrosines intra cytoplasmiques et déclenche ainsi des signaux de transduction intracellulaire, notamment la voie des MAP kinases, de la PI3 kinase ou phospholipase C. Au niveau cellulaire, ces voies de signalisation participent à la prolifération, à la migration et à la différenciation cellulaire et entraînent également un effet anti-apoptotique (Figure 11).

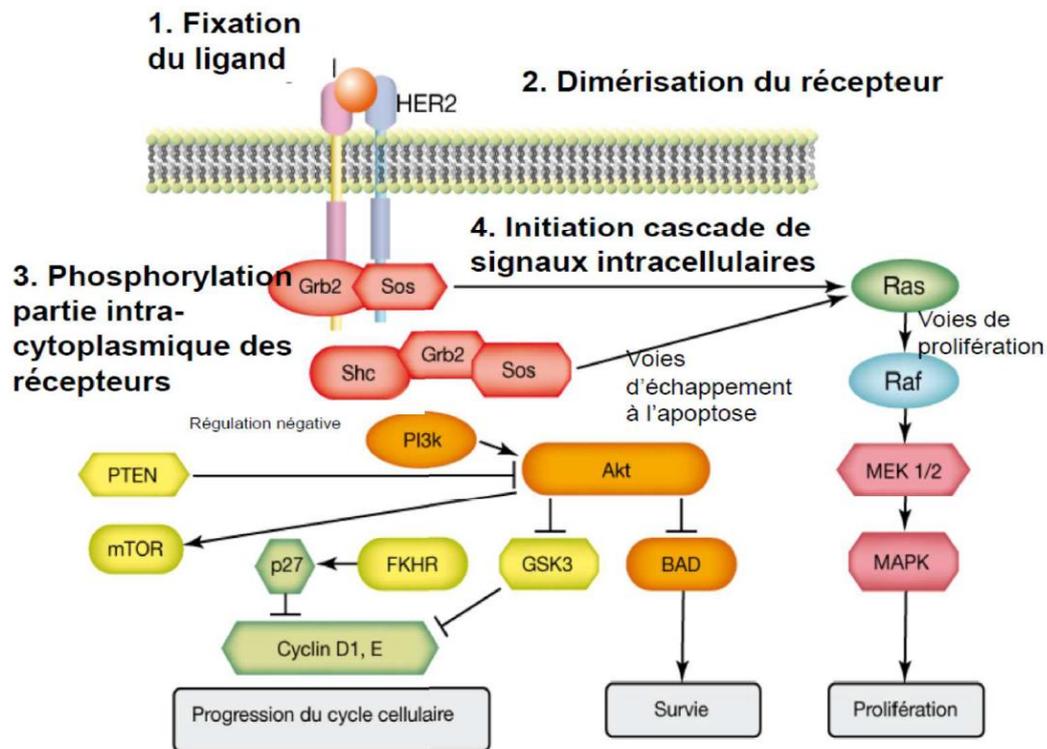


Figure 11 : Voie de signalisation HER2

La survenue de l'amplification de HER2 est associée à une évolution défavorable de la maladie notamment due à une transmission excessive des signaux de transduction résultant en une augmentation des capacités de prolifération et de croissance des cellules tumorales. La surexpression de HER2 est associée à une réduction de la survie et, de ce fait, à un mauvais pronostic.

Dans 50% des cas, l'amplification d'HER2 est associée à une absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes. Ces cancers HER2+ER- sont pour la plupart de grade 3 et vont exprimer fortement plusieurs gènes de prolifération(40,41). D'autres types de carcinomes HER2 amplifiés existent et seront définis par le type d'altérations génomiques associées ou la nature du stroma.

C- Mise en évidence de HER2 dans le cancer du sein

Deux méthodes sont utilisées en routine pour établir le statut HER2 dans le cancer du sein. Ces méthodes vont permettre dans un premier temps d'évaluer la surexpression de la protéine par IHC et dans un second temps, l'amplification du gène par FISH. Bien que ces techniques présentent leurs avantages et inconvénients, elles restent complémentaires notamment pour les cas intermédiaires où l'interprétation des résultats est plus complexe.

La détermination du statut HER2 est indispensable à la prescription des thérapies ciblées ayant pour cible HER2. C'est pourquoi un biomarqueur « compagnon », l'HercepTest®, a été développé en association avec l'Herceptin®, traitement de référence dans les cancers HER2+. Ce biomarqueur est donc à la fois pronostic et prédictif en permettant la sélection des patients pouvant bénéficier ou non d'un traitement ciblé.

1- IHC – HercepTest®(42)

L'HercepTest® est une technique immunohistochimique de détermination semi-quantitative du statut HER2 sur tissus tumoraux FFPE. Il utilise un anticorps primaire de lapin dirigé spécifiquement contre la protéine HER2 humaine. La révélation est réalisée à l'aide d'anticorps secondaires (chèvre anti-lapin) marqués à l'HRP et reliés par une chaîne polymère commune afin d'amplifier le signal.

Afin de déterminer le statut HER2, l'intensité du signal sera essentiellement prise en compte en association avec le pourcentage de cellules tumorales marquées. L'association de ces paramètres permet de définir un score compris entre 0 et 3+ dont les caractéristiques sont définies dans le tableau 1 et le marquage illustré dans la figure 12.

L'expérience du pathologiste est essentielle car l'interprétation du marquage peut ne pas être évidente du fait par exemple d'un marquage hétérogène des cellules au sein d'un même tissu, d'un marquage membranaire incomplet ou encore d'un marquage occasionnel des cellules non tumorales. De plus, la coloration cytoplasmique doit être considérée comme non spécifique et ne doit pas être incluse dans l'évaluation de l'intensité de coloration de la membrane. Après détermination du score IHC, le pathologiste sera à même de déterminer si le patient peut bénéficier d'une thérapie ciblée ou non ou bien si la réalisation de la FISH est nécessaire.

Tableau 1 : Guideline pour la détermination du score HercepTest®(42) :

Score	Evaluation de la surexpression de HER2	Caractéristique de coloration
0	Négatif	Absence de coloration ou marquage membranaire observé dans moins de 10% des cellules tumorales
1+	Négatif	Une coloration de la membrane à peine perceptible est détectée dans plus de 10% des cellules tumorales. Les cellules présentent une coloration membranaire incomplète
2+	Faiblement Positif	Coloration membranaire faible à modérée complète observée pour plus de 10% des cellules tumorales
3+	Positif	Coloration membranaire forte et complète observée pour plus de 10% des cellules tumorales

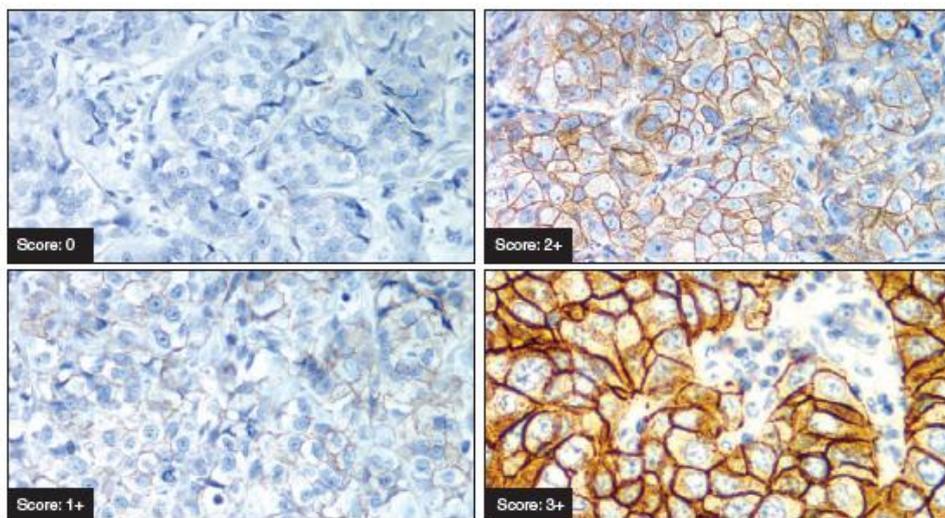


Figure 12 : Exemples de marquage de la protéine HER2 par l'Herceptest

2- FISH

Cette technique est une méthode indirecte de détection de la protéine HER2 car elle repose sur la détection de l'amplification du gène et non sur la surexpression du récepteur protéique. Dans 5 à 10% des cas, une amplification d'*HER2* pourra s'observer sans surexpression de sa protéine.

Différents kits d'hybridation in situ sont commercialisés, certains permettant un double marquage par co-hybridation de sondes HER2 et centromère du chromosome 17. En effet, la recherche du gène *HER2* est le plus souvent couplée à un marquage du centromère du chromosome 17 afin de repérer les polysomies, source de faux positifs.

A l'état normal, une cellule va présenter deux copies d'un même gène ainsi que 2 copies de centromère d'un chromosome. L'amplification génique de HER2 sera certaine à partir de 4 copies du gène. Cette dernière sera considérée comme faible entre 4 et 10 copies et forte au dessus de 10 copies. Afin d'éviter le risque de faux positifs, il sera essentiel de réaliser un rapport HER2/centromère du chromosome 17. Un rapport supérieur à 2 sera synonyme d'amplification génique (Figure 13). Un médecin pathologiste expérimenté est ici aussi requis pour l'analyse microscopique de cette technique. 40 noyaux devront au minimum être étudiés voir plus si le nombre de copies du gène est évalué entre 3,5 et 4.

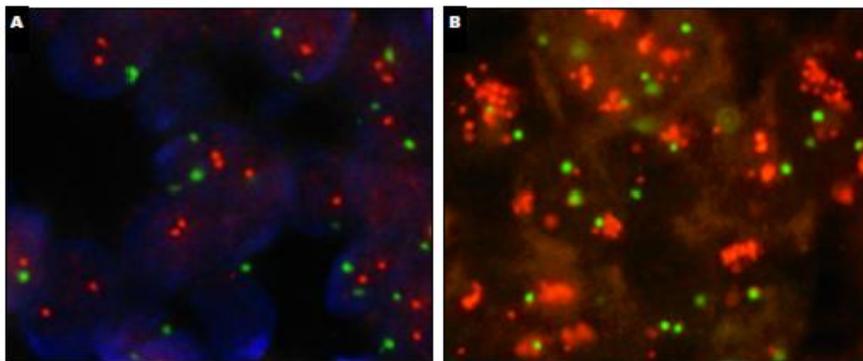


Figure 13 : Evaluation de l'amplification génique de *HER2* par FISH A : Carcinome du sein sans amplification génique présentant un ratio HER2(rouge)/CEP17(vert) <2 B : Carcinome du sein avec amplification génique présentant une augmentation du nombre de copies du gène *HER2* (rouge) et un ratio HER2/CEP17 > 2 (43)

IV- PROTÉINE KI-67

A- Protéine Ki-67 : Généralités

La protéine Ki-67 fut mise en évidence en 1983 par Gerdes et al(44) grâce à l'anticorps monoclonal Ki-67 obtenu par immunisation de souris avec les noyaux d'une lignée cellulaire de lymphome Hodgkinien. La caractérisation de cet anticorps a permis d'observer une réactivité avec une structure nucléaire présente uniquement au sein de cellules prolifératives. Au cours du cycle de division cellulaire, l'antigène a pu être observé dans le noyau des cellules durant les phases G1, S, G2 et mitose mais pas au sein des cellules quiescentes ou au repos en phase G0(45). Du fait de sa présence au sein des cellules prolifératives uniquement,

il a rapidement été mis en évidence que la protéine Ki-67 pouvait servir de marqueur de croissance cellulaire. C'est dix ans plus tard que la séquence primaire complète de la protéine fut publiée par Schlüter et al(46). Deux isoformes furent décrites et différenciées par l'absence ou la présence de la région codée par l'exon 7 du gène Ki-67.

Malgré une amélioration des connaissances sur la régulation du cycle cellulaire, aucun régulateur connu n'a pu être associé structurellement ou fonctionnellement à l'antigène Ki-67 rendant difficile l'élucidation de sa fonction. Bien que son rôle fonctionnel ne soit toujours pas complètement élucidé, il est indiscutable que l'expression de Ki-67 et la prolifération cellulaire sont étroitement liées. La présence de la protéine au sein d'une cellule ne sera pas systématiquement associée à une division cellulaire active mais surtout à la capacité d'une cellule à se diviser : c'est ce qui définit un marqueur de prolifération(47).

B- Ki-67 : facteur pronostique ou prédictif ?

De nombreuses études cliniques résumées dans plusieurs revues ont été menées afin d'établir le rôle pronostique ou prédictif de la détermination du statut Ki-67(48–51). De manière générale, il a été montré un effet opposé de Ki-67 sur l'évaluation du pronostic et l'évaluation de la réponse à un traitement adjuvant. En effet, une augmentation de Ki-67 synonyme d'une augmentation de la prolifération cellulaire est associée à un mauvais pronostic. Cependant, elle est également associée à une augmentation de la réponse aux chimiothérapies, qui dans certains sous-types de cancer du sein, sera à l'origine d'une amélioration du pronostic.

Concernant les tumeurs RH+, une réponse complète peut être obtenue par l'utilisation d'une hormonothérapie adjuvante. Une augmentation de Ki-67 sera alors de plus mauvais pronostic. A la différence des tumeurs RH-, pour lesquelles une hormonothérapie sera inefficace, l'augmentation de Ki-67 sera de meilleur pronostic puisqu'elle rendra la tumeur plus sensible aux chimiothérapies. Dans le cas des tumeurs chimio-résistantes, l'augmentation du Ki-67 sera associée à une réduction de la survie.

Ki-67 est donc un marqueur à la fois pronostique et prédictif mais les deux effets ne peuvent être dissociés. Après de nombreuses années d'étude de Ki-67 en tant que biomarqueur pronostique et/ou prédictif, ce n'est que récemment, au cours de la conférence St Gallen qu'il

a été suggéré une utilisation de la protéine dans le but de différencier les sous-types luminaux A et B(52,53).

C- Mise en évidence de Ki-67 dans les cancers du sein

L'expression de la protéine Ki-67 est mesurée semi-quantitativement par IHC afin d'étudier la prolifération des cellules tumorales notamment dans le cancer du sein. L'analyse IHC va permettre de définir un index de marquage ou index de prolifération qui représente le pourcentage de noyaux cellulaires marqués à l'aide de l'anticorps Ki-67. L'intensité du marquage ne sera ici pas prise en compte, chaque cellule marquée, quelle que soit l'intensité, sera considérée comme positive. Cependant, l'estimation de l'index Ki67 et son interprétation sont complexes.

Tout d'abord, il est difficile de définir un seuil séparant les cas présentant un index faible et élevé. Ce seuil varie selon les publications entre 5 et 34%(48). En 2009, la conférence de St Gallen(54) a donc suggéré de définir trois catégories illustrées dans la figure 14 :

- (i) Prolifération faible si index < 15%
- (ii) Prolifération intermédiaire pour 16% < index < 30%
- (iii) Prolifération importante si index > 30%

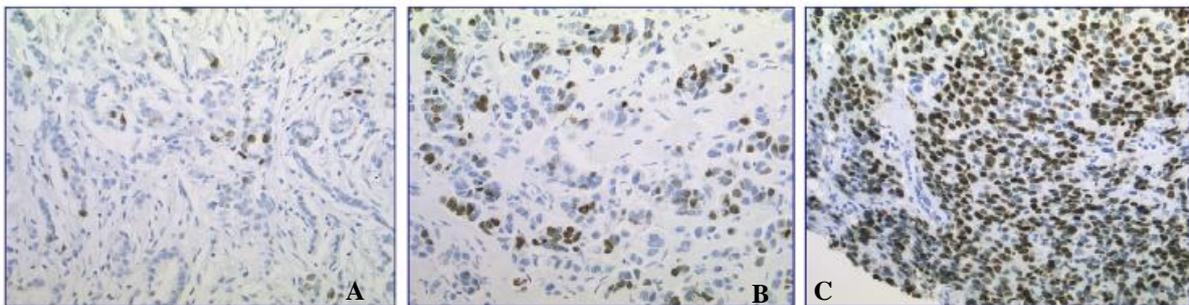


Figure 14 : Illustration des différents niveaux d'expression de Ki-67 A : Expression faible (Sous-type luminal A) ; B : Expression intermédiaire (Nécessite d'associer d'autres biomarqueurs) ; C : Expression importante (Sous type luminal B)(55)

En 2011, cette même conférence a recommandé d'utiliser un seuil de 14% afin de différencier les tumeurs luminal A et luminal B de plus mauvais pronostic(52). En 2013, ce seuil fut changé à 20% mais avec la possibilité d'utiliser les seuils établis localement(53).

La difficulté pour établir ce seuil provient essentiellement de la complexité de l'estimation de l'index. En effet, cette estimation doit prendre en compte l'hétérogénéité intra-tumorale et dépend également de la variabilité inter-observateur. L'impact de l'hétérogénéité intratumorale est cependant moins important pour les cas présentant un index de prolifération très bas ou très haut. De plus, il peut également exister une hétérogénéité temporelle de l'expression de Ki-67 au sein du tissu tumoral notamment suite à l'utilisation d'une thérapie adjuvante, par exemple. Ces problèmes d'hétérogénéité seront importants essentiellement dans les cas où cela doit faire l'objet d'une décision thérapeutique.

V- uPA/PAI-1 (UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR / PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR -1)

A- Biologie

uPA est une protéase appartenant à la famille des sérine peptidases qui présente deux caractéristiques spécifiques à son activité la différenciant des autres membres de cette famille.

1- Spécificité de substrat

L'uPA présente une spécificité de substrat restreinte. *In vivo*, un seul substrat biologique a pu être identifié. Il s'agit de la proenzyme plasminogène qui, après action de l'uPA, sera transformée en une sérine protéase active, la plasmine. *In vitro*, l'action de l'uPA a cependant pu être étendue à d'autres protéines telles que la fibronectine, l'intégrine α_6 , le facteur de croissance hépatocytaire, le récepteur à l'uPA et l'uPA elle-même(56–58).

Cependant, la plasmine va avoir la capacité de cliver de nombreux substrats. C'est cette dernière qui va permettre un remodelage de la matrice extracellulaire par sa capacité à dégrader ou remodeler plusieurs de ses composants (laminine, fibronectine, ténascine C et ostéopontine)(59,60). La dégradation des composants de la matrice extracellulaire va induire la libération et l'activation de facteurs de croissance à l'origine d'une augmentation de la prolifération, de la migration cellulaire, de l'invasion et des métastases.

La plasmine va également pouvoir activer de nombreux précurseurs d'enzymes (zymogènes) dont notamment les précurseurs de nombreuses métalloprotéases matricielles ou encore la

pro-uPA, précurseur de l'uPA(59). Les métalloprotéases vont alors pouvoir participer à la dégradation de la matrice extracellulaire.

2- Action via un récepteur membranaire

L'action de l'uPA est également permise grâce à sa liaison avec un récepteur membranaire, l'uPAR (ou CD87)(61). Cependant, ce récepteur ne peut pas induire de signalisation en aval du fait de l'absence d'un domaine transmembranaire. Pour cela, il doit interagir avec d'autres molécules telles que l'EGFR(62), le PDGFR (platelet-derived growth factor receptor)(63), ou certaines intégrines(64) par exemple. Cette interaction est à l'origine d'une signalisation permettant la régulation de la prolifération cellulaire, de la migration et des métastases ce qui va renforcer l'action de la plasmine.

Afin de réguler l'activité de l'uPA, deux protéines endogènes vont pouvoir l'inhiber: PAI-1 et PAI-2. Cette inhibition est dûe essentiellement à la liaison de PAI-1 au complexe uPA-uPAR, ce qui va déclencher une endocytose du complexe qui sera alors dégradé(65,66).

B- Implication dans le cancer

Par son mécanisme d'action, uPA va causalement favoriser l'invasion des cellules cancéreuses et les métastases(56,58). Le rôle de l'uPA dans les métastases a été confirmé par l'utilisation de souris déficientes en uPA ou en plasminogène. Chez ces souris, il a pu être observé une réduction spontanée des métastases sans cependant affecter la croissance tumorale(67). Plus précisément, elle va permettre l'échappement initial des cellules tumorales du site principal et donc participer à la dissémination à un stade précoce(68).

Bien que l'on puisse s'attendre à un rôle protecteur de PAI-1 de par l'inhibition de l'uPA, Masuda et al ont mis en évidence un rôle direct dans le cancer et un des mécanismes pro-tumoral de PAI-1 serait de favoriser l'angiogenèse(69). De plus, il a également été montré que PAI-1 protège les cellules endothéliales ainsi que différents types de cellules tumorales de l'apoptose. Ce blocage est entre autre dépendant de l'activation de la plasmine médiée par uPA(70).

Du fait de leurs rôles importants dans le processus cancéreux, le développement d'uPA et PAI-1 en tant que biomarqueurs a été essentiel. Ils furent les premiers biomarqueurs à voir

leur utilité pronostique et prédictive validée dans le cancer du sein. Dans un premier temps, il a été établi un lien entre une activité catalytique importante de l'uPA et une réduction de l'intervalle sans récurrence chez les patientes atteintes de cancer du sein(71). Des niveaux d'expression élevés d'uPA mais aussi de PAI-1 ont donc été associés à un mauvais pronostic dans le cancer tout en étant indépendants l'un de l'autre.

Suite à cela, les patientes à haut risque peuvent donc bénéficier d'une chimiothérapie adjuvante afin de réduire la probabilité de récurrence de la maladie. A l'inverse, les patientes à faible risque de récurrence pourront éviter la toxicité d'une chimiothérapie et réduire également les coûts de traitement. uPA et PAI-1 présentent donc également un intérêt en tant que biomarqueurs prédictifs. Plusieurs études ont montré une amélioration de la réponse aux chimiothérapies, aux thérapies anti-métaboliques (CMF) et anthracyclines chez les patientes présentant une expression plus importante en uPA et PAI-1(72–75).

C- Mise en évidence dans le cancer du sein

Actuellement, seule la méthode ELISA a subi une validation analytique et est utilisée pour le dosage d'uPA et PAI-1. Les kits ELISA commercialisés pour la mesure de l'uPA et de PAI-1 sont indiqués chez les patientes ayant un cancer du sein sans atteinte ganglionnaire à risque faible ou élevé de rechute après chirurgie. Des concentrations au dessous du seuil établi à 3ng d'uPA/mg et 14 ng PAI-1/mg de protéines totales vont classer les patientes dans le groupe à faible risque de récurrence. Des concentrations au dessus de ce seuil seront associées à un risque de récurrence élevé.

La technique ELISA a cependant ses limites. Cette dernière nécessite de grandes quantités de tissus tumoraux pour sa réalisation et doit être effectuée sur tissus frais ou congelés, c'est pourquoi des tests immunohistochimiques, pouvant être réalisés sur tissus FFPE, sont actuellement en développement.

Les biomarqueurs émergents

Certaines caractéristiques cliniques et pathologiques telles que la taille de la tumeur, le statut ganglionnaire et l'invasion lymphovasculaire sont des facteurs de risques associés au pronostic du cancer du sein. D'autres paramètres comme la présence ou non des récepteurs aux œstrogènes ou à la progestérone, de HER2 ainsi que l'index de prolifération vont à la fois être des facteurs pronostics et prédictifs de la réponse au traitement. Indépendamment les uns des autres, ces facteurs de risque vont entraîner un pronostic plus ou moins favorable. Cependant, l'association de plusieurs facteurs pourra avoir un impact différent sur le pronostic. C'est donc dans le but d'améliorer la détermination du pronostic dans le cancer du sein que des modèles multivariés ont été développés. Différents modèles ont vu le jour, d'une part de nombreuses signatures multigéniques et d'autre part, un test IHC4 reposant sur l'analyse IHC de plusieurs facteurs.

I- SIGNATURES MULTIGÉNIQUES

Ces dernières années ont permis d'observer un changement important dans la prise en charge de nombreuses tumeurs solides dû en grande partie aux progrès de la biologie moléculaire et de la génétique. Notamment, la classification des cancers du sein s'est précisée et a permis de définir des sous-groupes de patientes présentant des pronostics différents ce qui a abouti à la première « signature » pronostique moléculaire appelée « signature 70 gènes »(76). Depuis, de nombreuses autres « signatures » ont été développées et seront également présentées dans cette partie.

A- Méthodes de détermination des signatures multigéniques

1- Technologie de la RT-qPCR

L'acronyme RT-PCR signifie Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction. Il s'agit d'une PCR « classique » mais réalisée après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire. Cette technologie est donc constituée de deux étapes :

- (i) La transcription inverse
- (ii) L'amplification génique par PCR

Dans un premier temps, la synthèse de l'ADNc est permise grâce à l'action de transcriptases inverses qui sont des enzymes ADN polymérase ARN dépendantes capables d'utiliser un brin d'ARN comme matrice. La transcriptase inverse va nécessiter une amorce afin de débiter la synthèse du brin d'ADNc. Cette amorce sera le plus souvent obtenue à partir d'une séquence polyadénylée présente sur l'ARN. Le retournement de l'extrémité 3' servira d'amorce à l'ADN polymérase intervenant dans la réplication de l'ADN. Enfin, l'action d'une nucléase sera nécessaire pour former une extrémité franche à partir du simple brin persistant et obtenir un ADNc double brins (Figure 15).

Dans un second temps, la PCR va permettre d'amplifier de manière sélective l'ADN choisi (Figure 16). Au cours du premier cycle de PCR, les deux brins d'ADN seront séparés par l'action de la chaleur. Ensuite, des amorces seront ajoutées par fixation à la région 3' et vont encadrer la région à amplifier. L'hybridation de ces amorces se fera à 55-65°C. Enfin la Taq polymérase synthétisera le brin complémentaire. Dans les cycles suivants, les mêmes étapes seront reproduites.

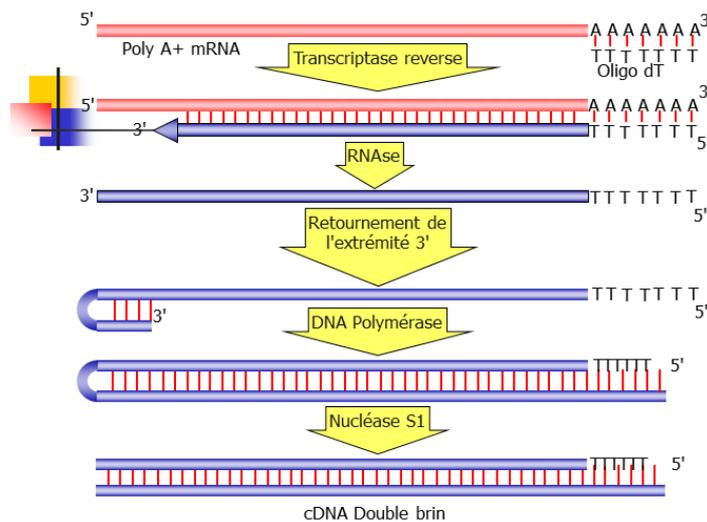


Figure 15 : Synthèse d'ADNc à partir d'un ARNm

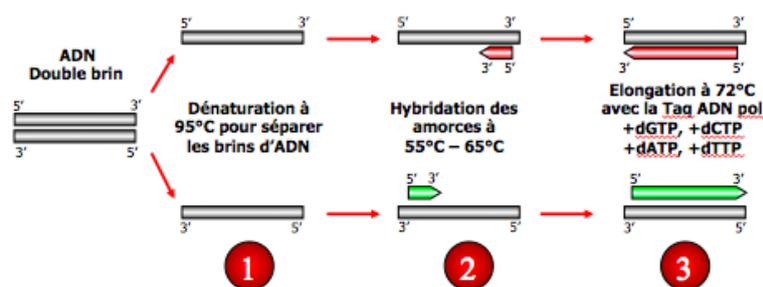


Figure 16 : Premier cycle de PCR

2- Technologie des « puces à ADN »

Cette technologie permet d'analyser l'expression de nombreux gènes présents dans une cellule ou un tissu donné en une réaction unique de manière rapide et efficace. Cette technique se base sur le principe d'hybridation qui signifie que deux fragments d'acides nucléiques complémentaires peuvent s'associer et se dissocier de façon réversible sous l'action de la chaleur et de la concentration saline du milieu(77).

Une puce à ADN consiste en un support rigide sur lequel vont être déposées de courtes séquences d'ADN. Ces séquences également appelées « sondes » correspondent à des oligonucléotides de synthèse ou à des produits de PCR qui seront spécifiques d'un gène unique. Ce dispositif sera alors mis en contact avec les cibles à étudier, marquées par incorporation de radioéléments ou de fluorochromes, qui peuvent être de différentes origines et de différentes natures (ARNm, ADNc obtenu par RT-PCR...). Après acquisition des images d'hybridation, le niveau d'expression dans l'échantillon initial sera obtenu par quantification des signaux d'hybridation de chaque gène présent sur la puce (signal de détection proportionnel à la concentration de la cible) (Figure 17).

Les puces à ADN permettent l'analyse des mutations, l'analyse de l'expression des gènes (transcriptomique) mais également le séquençage.

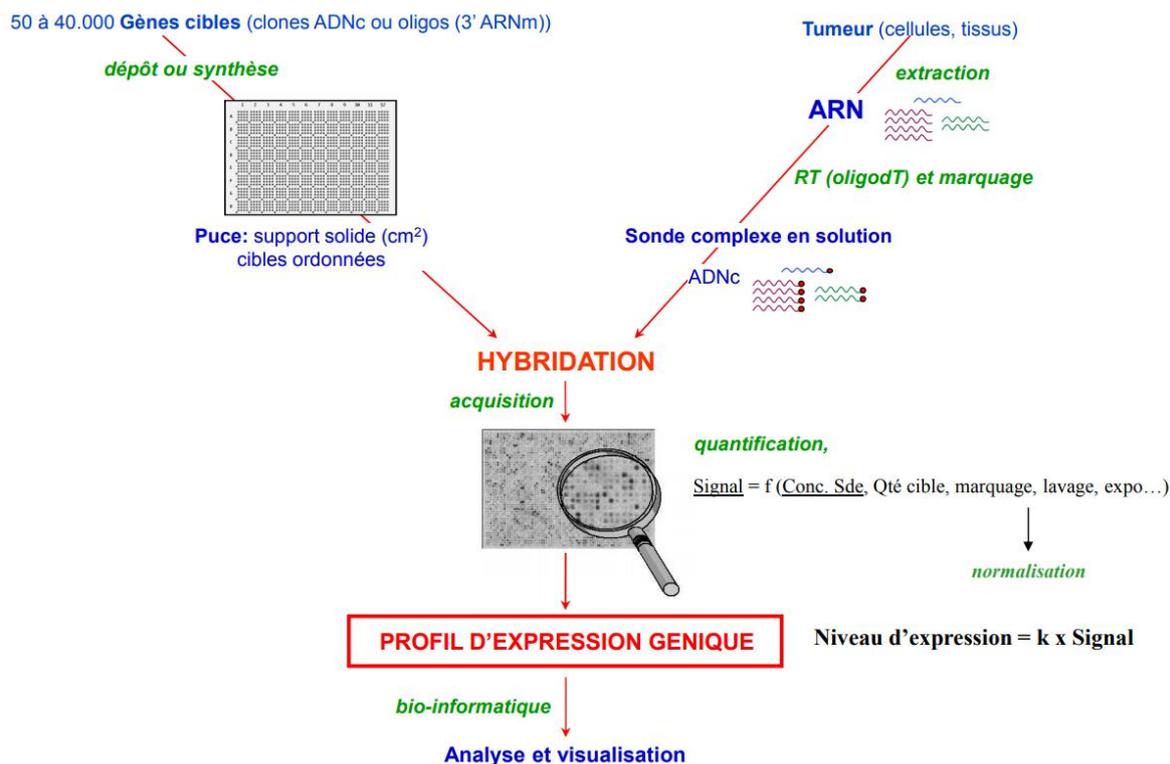


Figure 17 : Principe de la technologie des "Puces à ADN"

B- Signature à moyen débit reposant sur la technologie de la RT-qPCR

1- Endopredict® (Myriad) (78)

Les cancers du sein RE+HER2- constituent une catégorie pour laquelle le choix de la thérapeutique à adopter est plus complexe. En effet, ces patientes vont présenter différents profils de risque. Pour certaines, une hormonothérapie seule sera suffisante mais dans d'autres cas, dû à un risque de récurrence plus important, il sera important d'associer une chimiothérapie. C'est à ce niveau qu'EndoPredict® test va intervenir puisqu'il est indiqué chez les patientes atteintes de cancer du sein RE+HER2- traitées par une hormonothérapie adjuvante uniquement.

Il va permettre de définir la probabilité de récurrence à l'aide de deux scores « l'EP risk score » et « l'EPclinrisk score ». « L'EP risk score » repose sur une signature multigénique comprenant 8 gènes d'intérêt dans le cancer du sein décrit dans le tableau 2 et sur 3 gènes de normalisation (*CALM2*, *OAZ1* and *RPL37A*). Le score obtenu est compris entre 0 et 15 et le seuil de discrimination permettant de différencier les patientes de faible et haut risque de récurrence est de 5.

Tableau 2 : Annotation fonctionnelle et association de phénotypes spécifiques des gènes d'intérêt(77)

Gènes d'intérêt	Implication dans le processus biologique	Association avec l'expression du RE
AZGP1 (Alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Adhésion cellulaire 	Corrélié au RE
BIRC5 (Baculoviral IAP repeat-containing 5)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anti-apoptique ○ Division cellulaire ○ Cytocinèse ○ Transition G2/M du cycle cellulaire ○ Etablissement de la localisation chromosomique 	
DHCR7 (7-dehydrocholesterol reductase)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Processus de biosynthèse du cholestérol 	
IL6ST (Interleukin 6 signal transducer)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Voie de signalisation médiée par les cytokines ○ Facteur inhibiteur leucémique ○ Régulation négative médiée par l'interleukine 6 ○ Régulation positive de la prolifération cellulaire ○ Régulation positive de la prolifération des lymphocytes T ○ Régulation positive de la cascade JAK-STAT ○ Réponse à la stimulation des cytokines 	Corégulé par le RE
MGP (Matrix Gla protein)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Régulation de la transcription (pas de preuve expérimentale) 	Induit par les oestrogènes
RBBP8 (Retinoblastoma binding protein 8)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Réparation de l'ADN 	Corrélié au RE
STC2 (Stanniocalcin 2)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Signalisation inter-cellulaire (pas de preuve expérimentale) 	Corégulé par le RE
UBE2C (Ubiquitin-conjugating enzyme E2C)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Processus de catabolisme protéique dépendant de l'ubiquitine ○ Ubiquitination protéique ○ Sortie de la mitose ○ Processus catabolique des cyclines 	

Dans un second temps, « l'EPclinrisk score » qui prend en compte la signature multigénique à travers « l'EP risk score » mais également la taille de la tumeur et le statut ganglionnaire sera calculé grâce à la formule suivante :

$$\text{EPclinrisk score} = 0,35t + 0,64n + 0,28s$$

Avec : *t* : taille de la tumeur
n : nombre de ganglions atteints
s : EP riskscore

Les patients présentant un « EPclinriskscore » < 3,3 sont considérés comme à faible risque de récurrence à distance tandis qu'un score > 3,3 sera associé à un haut risque. « L'EPclinriskscore » ajoute de manière significative des informations pronostiques aux facteurs clinico-pathologiques établis et permet de définir le risque de récurrence à 10 ans. Il peut être essentiel lors de la prise de décision thérapeutique notamment lorsque l'ajout d'une thérapie additionnelle à l'hormonothérapie est incertain après la prise en compte des marqueurs conventionnels.

2- Oncotype DX® (Genomic Health)(79)

Le test Oncotype DX® permet de déterminer le risque de récurrence spécifique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein invasif au stade précoce. Il permet d'identifier les patientes susceptibles de tirer un bénéfice minime, voire nul, de la chimiothérapie et celles pouvant en tirer un bénéfice important. Cela s'adresse notamment aux patientes présentant un cancer ER+ sans atteinte ganglionnaire. De larges essais cliniques, tel que le *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP), ont démontré un bénéfice de l'hormonothérapie (Tamoxifène) associée à la chimiothérapie dans ce type de cancer(80–82). Cependant, la probabilité de récurrence à distance chez des patientes traitées uniquement par hormonothérapie seule après chirurgie est seulement de 15% ce qui signifie que 85% des patientes seraient traitées inutilement par chimiothérapie et donc exposées à des effets indésirables non négligeables.

La signature multigénique de ce test prend en compte l'évaluation de l'expression de 21 gènes, listés dans la figure 18, comprenant 16 gènes d'intérêt dans le cancer et 5 gènes de normalisation.

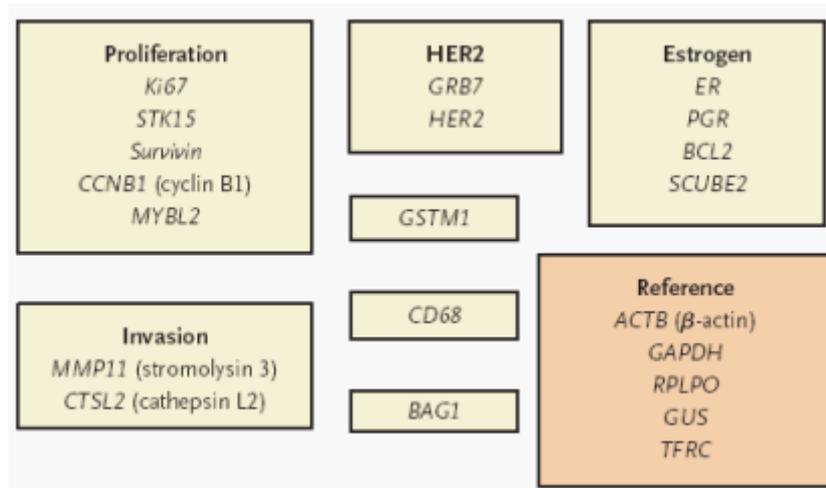


Figure 18 : Panel de gènes du test OncotypeDx®

Cette signature permet de calculer un risque de récurrence à distance dans les 10 ans sous Tamoxifène (5ans) et ce pour des patientes de tout âge ainsi que pour toute taille de tumeur. Le score obtenu est compris entre 0 et 100 et des seuils ont été définis afin de classifier les patients en trois catégories de risque de récurrence (Attention : la valeur du score ne correspond pas au % de récurrence estimé) :

- Faible risque : score < 18
- Risque intermédiaire : 18 < score < 31
- Risque élevé : score > 31

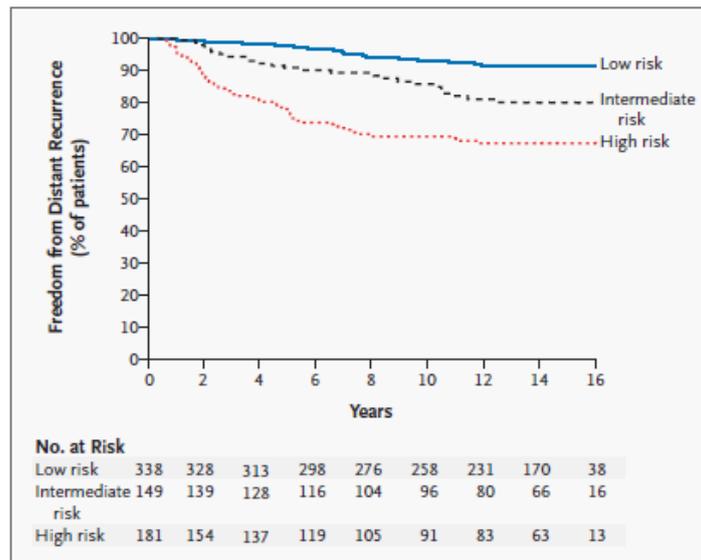


Figure 19 : Probabilité de récurrence à distance selon la catégorie de risque(78)

Pour les patientes ER+ sans atteinte ganglionnaire et traitées avec une hormonothérapie seule, Oncotype DX® va permettre de mettre en évidence une différence significative du risque de récurrence entre les patientes présentant un score faible et élevé (Figure 19).

Plusieurs études ont pu mettre en évidence un bénéfice de l'association d'une chimiothérapie adjuvante chez les patients présentant un score de récurrence élevé(83). L'étude prospective randomisée TAILORx a également démontrée que plus de 99% des patients dont le RS correspond à un faible risque n'ont pas de rechute de leur cancer après 5 ans de traitement par hormonothérapie seule. Cette étude évalue actuellement l'utilité clinique d'associer une chimiothérapie adjuvante chez les patientes sans atteinte ganglionnaire et présentant un risque de récurrence intermédiaire suite au test Oncotype DX®. En effet c'est surtout dans ce groupe de patients que l'intérêt de la chimiothérapie est difficile à apprécier(84).

C- Signature à haut débit reposant sur la technologie des « puces à ADN »

1- MammaPrint score

L'objectif des premiers travaux utilisant les outils moléculaires à haut débit a également été de différencier les tumeurs en fonction de leur risque de métastase. MammaPrint® représente le premier test multigénique commercialisé basé sur la technologie de l'ADN microarray et développé dans le but de personnaliser le traitement du cancer du sein. Cette signature fut approuvée par la FDA et par des organismes européens en tant que test pronostique pour les patientes atteintes de cancer du sein de moins de 61 ans, de grade I/II, sans ou avec envahissement ganglionnaire (1 à 3)(85).

Ce test repose sur l'évaluation de l'expression de 70 gènes identifiés par Van'tVeer et al(76), comprenant essentiellement des gènes impliqués dans le cycle cellulaire associés à d'autres gènes impliqués dans l'invasion, les métastases et l'angiogenèse. Cette signature permet d'identifier les patientes à faible risque de métastase (de bon pronostic) et à risque métastatique élevé (de mauvais pronostic) avec une sensibilité supérieure à celle des critères clinico-pathologiques.

2- Prosigna® (PAM50) (Nanostring)

Prosigna® est un test *in vitro* basé sur l'identification d'une signature d'expression génique afin d'évaluer le risque de récurrence à distance des patientes atteintes de cancer du sein.

Ce test est indiqué chez les patientes souffrant d'un cancer du sein ayant subi une mastectomie ou un traitement conservateur du sein conjointement avec un traitement loco-régional, en tant qu'indicateur pronostique de survie sans récurrence à 10 ans chez les femmes post-ménopausées souffrant d'un cancer RH positif,

- A ganglions lymphatiques négatifs, de stade I ou II ; ou
- A ganglions lymphatiques positifs (1 à 3 et > 4), de stade II ou III

Et à traiter avec une hormonothérapie adjuvante en monothérapie pendant 5 ans, en cas d'utilisation conjointe avec d'autres facteurs clinicopathologiques.

Ce test mesure simultanément les niveaux d'expression de 50 gènes utilisés par l'algorithme de classification des sous-types intrinsèques PAM50, 8 gènes utilisés pour la normalisation, 6 contrôles positifs et 8 contrôles négatifs dans une réaction d'hybridation unique. Le PAM50 fut développé en 2009 par Parker et al. et consiste en un ensemble minimal de gènes nécessaires à la classification des cancers du sein en sous-type intrinsèque : Luminal A, Luminal B, HER2 et Basal (Figure 20)(86).

Le système d'analyse nCounterDx fournit des mesures directes et multiplexes de l'expression génique en évaluant l'abondance relative des transcrits d'ARNm à partir de tissus tumoraux mammaires inclus en paraffine.

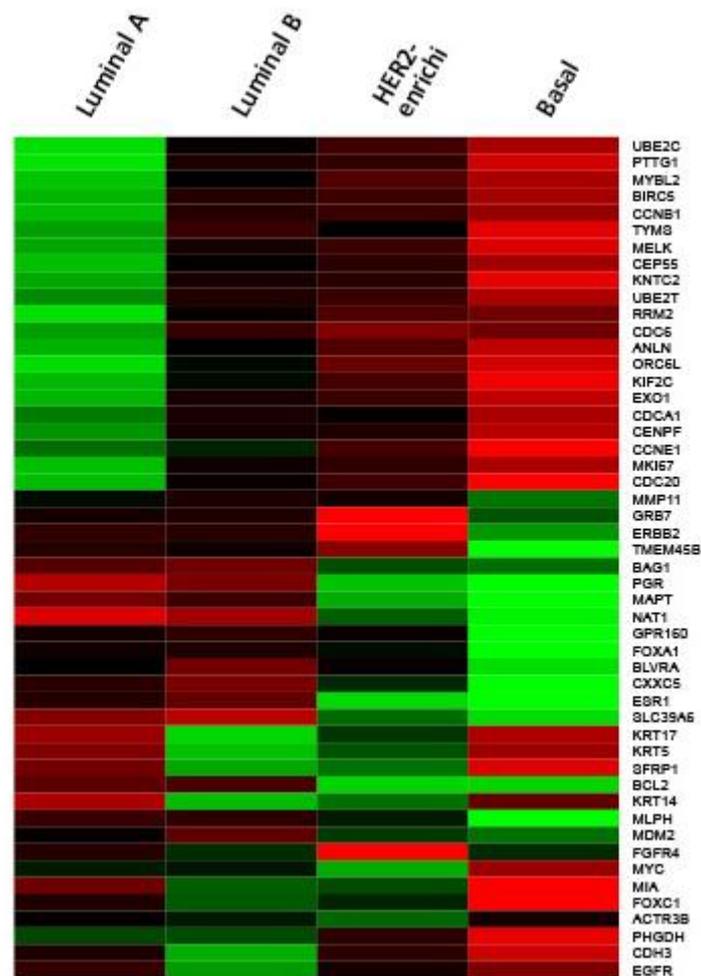


Figure 20 : Expression génique des sous-types de cancers du sein définie par le PAM50

Les résultats du test Prosigna® sont présentés en trois parties :

Dans un premier temps, un algorithme de calcul basé sur la corrélation de Pearson va comparer le profil d'expression génique normalisé de la patiente aux profils d'expression type des sous-types intrinsèques de cancer du sein. Le sous-type présentant la corrélation de Pearson la plus élevée sera affecté à l'échantillon de la patiente.

Dans un second temps, l'algorithme renvoie à un score RDR (risque de récurrence) compris entre 0 et 100. Cet algorithme repose sur la corrélation de Pearson, la taille de la tumeur, le statut ganglionnaire et le score de prolifération.

Pour finir, deux études de cohorte ont permis de définir un modèle capable de relier le score RDR à la probabilité de récurrence à distance à 10 ans des patientes testées avec un intervalle de confiance de 95%(87). Le rapport va ainsi définir une catégorie de risque de récurrence pour la patiente afin de permettre une interprétation du RDR (tableau 3/figure 21).

Tableau 3 : Classification du risque par plage de RDR et état ganglionnaire

Etat ganglionnaire	Plage RDR	Classification du risque
Sans envahissement ganglionnaire	0-40	Faible
	41-60	Modéré
	61-100	Elevé
Avec envahissement ganglionnaire (1 à 3 ganglions)	0-15	Faible
	16-40	Modéré
	41-100	Elevé
Avec envahissement ganglionnaire (≥ 4 ganglions)	0-100	Elevé

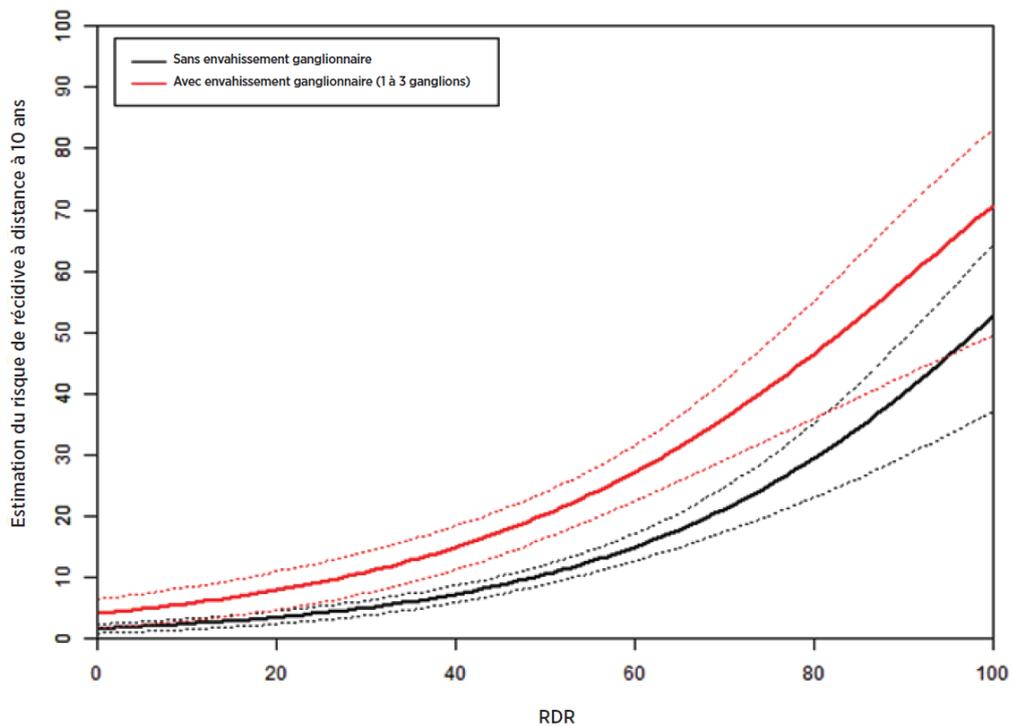


Figure 21 : Estimation du risque prévu à 10 ans au sein du groupe d'état ganglionnaire

D- Avenir des signatures multigéniques

De nombreuses autres signatures multigéniques basées sur des méthodologies identiques ou similaires ont été développées depuis, telles que :

- Le *Genomic Grade Index* (GGI) (MapQuantDx, Ipsogen, France) qui permet de mesurer l'expression de 97 gènes afin de séparer en deux groupes de risque les tumeurs de grade histologique II présentant un pronostic bien différent (40 à 50% des tumeurs du sein). Ce test fut développé en comparant les profils d'expression génique des tumeurs de grade I et III. Le GGI est essentiellement constitué de gènes du cycle cellulaire et de la prolifération et est corrélé au risque de rechute locale(88).
- Le *Breast Cancer Index* (BCI) qui combine deux biomarqueurs indépendants (HOXB13 :IL17BR et un indice de classe moléculaire reposant sur 5 gènes) permettant d'évaluer le risque de métastases à 10 ans post-diagnostique.
- Stem cell signature : Les cellules souches sont supposées avoir un potentiel d'invasion et de métastases important. Des signatures de cellules souches ont donc été publiées, notamment une signature d'invasion de 186 gènes, marqueur pronostic indépendant dans les cancers du sein RE+ de grade II(89).

L'existence de nombreux tests présentant un objectif similaire a conduit à la réalisation d'études sur la concordance de l'affectation du risque pour un même échantillon. Par exemple, lorsque six signatures génomiques ont été testées sur la même cohorte de patientes incluant, PAM50/RDR, MammaPrint®, et Oncotype DX®, chaque test présentait une valeur pronostique significative mais une affectation du risque souvent discordante(90). D'autres études ont également pu mettre en évidence des discordances importantes entre les différentes signatures multigéniques(91,92).

Actuellement, l'association de ces biomarqueurs émergents aux facteurs conventionnels clinico-pathologiques semble toutefois à préconiser afin d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes de cancers du sein à un stade précoce. Cela doit permettre, dans un premier temps, de réduire le sous-traitement de patientes exposées à un haut risque de récurrence. Ces patientes pourront bénéficier d'une hormonothérapie (si RH+) associée à une chimiothérapie adjuvante avec un rapport bénéfice/risque favorable pour permettre un allongement de la survie générale sans récurrence/métastases et également réduire le risque de résistance à l'hormonothérapie. Dans un deuxième temps, cela doit également permettre d'éviter le sur-traitement des patientes à faible risque de récurrence qui bénéficieront uniquement d'une hormonothérapie systémique adjuvante (si RH+). Cela évitera la prescription d'une chimiothérapie inutile et donc l'exposition à de nombreux effets indésirables améliorant ainsi également le rapport bénéfice/risque. Par conséquent, l'association de ces biomarqueurs

émergents aux facteurs actuels pourrait également induire un gain économique, premièrement, en réduisant le nombre de prescription de chimiothérapies adjuvantes et deuxièmement en limitant la prise en charge de leurs effets indésirables.

II- IHC4

Le test IHC4 est basé sur un modèle à plusieurs variables développé par Cuzick et al. (93) à partir de l'évaluation immunohistochimique semi-quantitative des quatre principaux facteurs pronostics utilisés actuellement en pratique clinique : ER, PR, HER2 et Ki67. Il permet d'établir à l'aide d'un algorithme un score unique à partir de l'ensemble de ces marqueurs indiquant le risque de récurrence chez les patientes atteintes d'un cancer du sein ER+ traitées par hormonothérapie adjuvante après chirurgie mammaire.

A- Détermination du score IHC4

Les résultats d'IHC, obtenus à partir de tissus tumoraux FFPE, sont obtenus de la façon suivante(93):

- (i) ER est quantifié en utilisant le H-score ou « histo » score. Pour cela, l'intensité du marquage nucléaire est déterminée (0, 1+, 2+, 3+) pour chaque cellule. Ensuite le pourcentage de cellules pour chaque intensité est calculé. Le H-score est alors obtenu à l'aide de la formule suivante :

$$\text{H-score} = [1 \times (\% \text{ de cellules } 1+) + 2 \times (\% \text{ de cellules } 2+) + 3 \times (\% \text{ de cellules } 3+)]$$

Le H-score est compris entre 0 et 300. Le score obtenu permettra de définir la première variable **ER₁₀** en divisant ce dernier par 30. ER₁₀ sera donc compris entre 0 et 10.

- (ii) PR est quantifié, simplement, en définissant le % de cellules marquées. Ce dernier sera divisé par 10 afin d'obtenir la deuxième variable PgR₁₀ comprise entre 0 et 10.
- (iii) Le score HER2 est défini par l'intensité du signal : 0, 1+, 2+ ou 3+
- (iv) Le score de Ki67 est défini par le % de cellules tumorales marquées quelle que soit l'intensité. La lecture manuelle introduit généralement un biais conduisant à des valeurs plus élevées, c'est pourquoi dans ce contexte un facteur de normalisation de 2,5 doit être intégré.

Cuzick et al. ont alors défini la formule suivante afin de calculer l'IHC4 :

$$\text{IHC4} = 94,7 \times [-0,100\text{ER}_{10} - 0,079\text{PgR}_{10} + 0,586\text{HER2} + 0,240 \ln(1+10 \times \text{Ki67})]$$

A partir de cet algorithme, trois catégories de risque sont alors définies : risque faible, intermédiaire ou important.

B- Intérêts et limites de l'IHC4

L'IHC4 a fait l'objet d'une comparaison avec la signature multigénique OncotypeDx®. Cette étude a permis de mettre en évidence une utilité pronostique similaire concernant le risque de récurrence pour les cas de cancers du sein RE+ sans envahissement ganglionnaire. Cependant, l'IHC4 apporte un pronostic légèrement plus précis en ce qui concerne le risque de récurrence à distance(93).

Un score clinique intégrant les variables clinico-pathologiques telles que l'âge, le grade ou la taille des tumeurs a également été développé. L'association de ce score à l'IHC4 permet l'obtention d'un score global ayant une forte valeur pronostique par complémentarité des informations. Ce modèle permet en intégrant les données cliniques et pathologiques d'optimiser la gestion du cancer du sein ER+ chez les patientes ménopausées en identifiant celles à faible risque de récurrence ne nécessitant pas l'utilisation d'une chimiothérapie. L'IHC4 permet donc l'obtention de données pronostiques additionnelles au moins aussi informatives que la signature multigénique. De plus, il présente l'avantage d'être moins complexe puisque utilisé en routine en pratique clinique. Il est également beaucoup moins coûteux pour une utilité similaire.

Cependant, les tests en IHC présentent un manque de reproductibilité inter-laboratoire assez important dû à certains paramètres essentiels comme la fixation, le démasquage des sites antigéniques, les réactifs et surtout l'interprétation des résultats. Cela constitue une limite importante dans l'utilisation en routine de ce score car son utilisation peut aussi conduire à un résultat trompeur. Il est alors essentiel de standardiser les méthodes immunohistochimiques ainsi que la quantification pour chacune des quatre variables afin de pouvoir bénéficier des intérêts de ce modèle de façon optimale, sans biais.

Exemples de voies de recherche

Actuellement, de nombreuses voies de recherche sont encore explorées dans le but de développer de potentiels nouveaux biomarqueurs. L'échappement thérapeutique de certains cancers du sein et la nécessité d'améliorer la prise en charge des patientes rendent indispensables ces travaux de recherche. En effet, ces marqueurs pronostiques pourront également faire l'objet du développement de biomarqueurs compagnons et par association de nouvelles thérapies ciblées. Dans cette partie, trois exemples de biomarqueurs actuellement en développement et faisant intervenir différents domaines d'étude seront présentés, l'aldéhyde déshydrogénase 1, le miR34a et l'immunoscore, mais de nombreuses autres équipes travaillent également sur d'autres marqueurs comme la protéine tau(94), la chromatine CKAP2(95), la serpine B3(96), l'association de la pyruvate kinase M2 et du VEGF-C(97), etc...

I- ALDH1 (ALDÉHYDE DÉSHYDROGÉNASE 1)

En 2003, furent isolées pour la première fois, à partir de tumeurs mammaires, des cellules souches cancéreuses. Cette sous-population de cellules, identifiées par des marqueurs spécifiques, présente des capacités d'auto-renouvellement et de prolifération importantes. De ce fait, elles favorisent la formation de métastases, l'invasion et également la résistance aux différentes thérapeutiques(98). Ces cellules souches sont aussi à l'origine des phénomènes de récurrences car elles vont générer des progéniteurs multipotents qui à leur tour donneront naissance à des progéniteurs engagés dans des voies de différenciation.

L'aldéhyde déshydrogénase (ALDH1) a été identifiée comme l'un des marqueurs spécifiques de cette sous-population de cellules(99). Ginestier et al. ont démontré par l'utilisation *in vitro* et *in vivo* du test ALDEFLUOR que ce marqueur est spécifique des cellules souches et progéniteurs normaux mais aussi cancéreux. Cela a été confirmé par la réalisation d'IHC sur tissus mammaires normaux FFPE en utilisant un anticorps dirigé contre l'ALDH1. Cette étude a également montré une corrélation entre le nombre de cellules présentant une activité aldéhyde déshydrogénase et la taille et la latence de formation tumorale ce qui est cohérent avec le fait que cette population cellulaire présente des caractéristiques de cellules souches.

Par la suite, cette même équipe a donc souhaité étudier le potentiel d'un développement en tant que marqueur pronostique et diagnostique. Pour cela, l'expression d'ALDH1 a été analysée par IHC sur tissus de tumeurs mammaires (Figure 22). Il a alors été mis en évidence une association entre les tumeurs ALDH1+ et un haut grade histologique, une surexpression d'HER2 et une absence d'expression des récepteurs hormonaux. Une corrélation a également été observée entre les tumeurs ALDH1+ et l'expression de marqueurs du sous-type basal (Cytokératines 5/6 et 14). L'analyse de la survie générale a montré une forte association entre les tumeurs ALDH1+ et un mauvais pronostic clinique (Figure 23). En effet, le risque relatif de mort causé par le cancer est 1,76 fois plus important pour les patients présentant une tumeur ALDH1+ dans la population étudiée(99).

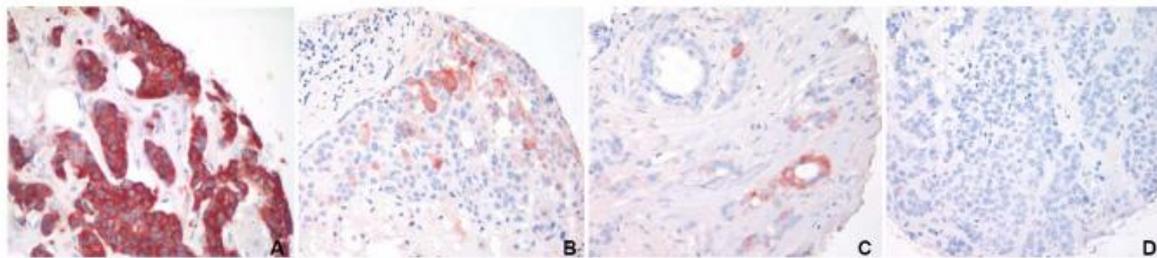


Figure 22 : Exemples de marquage ALDH1 dans le cancer du sein. A : Tumeur complètement positive pour ALDH1 B et C : Tumeurs positives pour ALDH1 avec 5-10% de cellules positives détectées D : Tumeur négative pour ALDH1 - pas de marquage détecté(99)

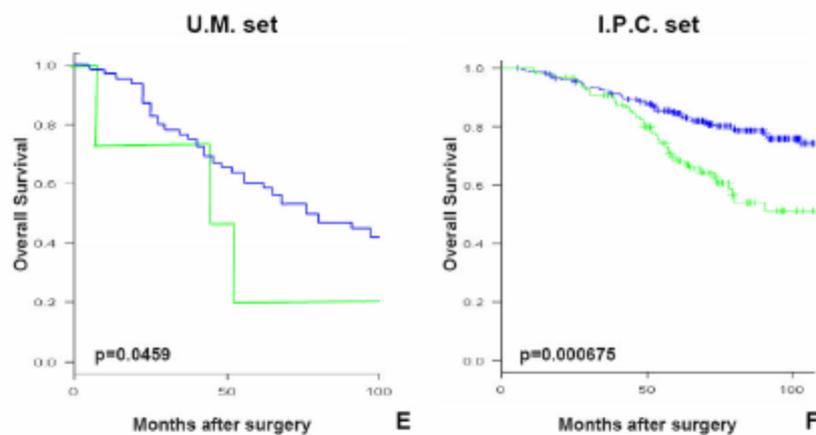


Figure 23 : Courbes de survie générale en fonction de l'expression d'ALDH1. Les patients ayant une tumeur ALDH1+ (courbe verte) ont un pronostic plus mauvais que les patients ayant une tumeur ALDH1- (courbe bleue)(99)

Les cellules souches cancéreuses constituent donc une voie de recherche essentielle pour le développement de nouveaux biomarqueurs à visée pronostique. Bien que les cellules souches cancéreuses ne soient pas encore complètement caractérisées, l'ALDH1 a été définie comme

un marqueur spécifique de cette sous-population et son utilisation en tant que biomarqueur pronostic semble prometteuse. De plus, l'utilisation de l'IHC facilite la détermination de l'expression de l'ALDH1 et l'identification des cellules souches.

II- MIR34A

Les microARN (miRNA) sont des ARN non codants de 18 à 25 nucléotides qui contrôlent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Ce contrôle est réalisé par appariement des miRNA avec des ARNm (ARN messenger) cibles dont ils sont partiellement complémentaires. Cette hybridation est alors à l'origine soit d'un blocage de la traduction de la protéine correspondante soit du clivage de l'ARNm cible au milieu du site de fixation du miRNA. Les miRNA vont permettre une régulation de la prolifération, de la différenciation et globalement de l'ensemble des processus cellulaires(100–102). De par cette action, une dérégulation de l'expression des miRNA jouera un rôle important dans les processus cancéreux notamment dans l'initiation, la progression et les métastases. Ils pourront également avoir un rôle d'oncogène ou de suppresseur de tumeur(103–107).

Le miR34a a été décrit comme un suppresseur de tumeur et présente un rôle dans la régulation de la reprogrammation des cellules somatiques, du cycle cellulaire, de la différenciation, de l'apoptose, de la progression des cellules cancéreuses et des métastases(108–116). Cependant, le miR34a va être sous-exprimé dans plusieurs types de cancer dont le cancer du sein(108,115,117). En pratique, l'expression de miR34a peut être évalué par plusieurs techniques : miRNAmicroarray, qPCR ou par hybridation in situ.

Agarwal et al. (118) ont donc étudié l'intérêt d'une évaluation quantitative de miR34a en tant que biomarqueur pronostique dans le cancer du sein. Cette étude a permis de mettre en évidence qu'une faible expression de miR34a est étroitement associée à un mauvais pronostic mais uniquement pour les cas ne présentant pas d'envahissement ganglionnaire. La perte de miR34a est également associée à une réduction de la survie, de plus, il s'agit d'un facteur pronostic indépendant d'autres variables cliniques.

Une autre étude a montré qu'une expression importante de miR34a est associée à une réduction du risque de métastase ou de décès dû au cancer du sein et a également défini le miR34a comme un marqueur indépendant(119).

Bien que des études complémentaires soient nécessaires, le miR34a présente un fort potentiel pour une application clinique future. De manière similaire, de nombreux autres microARNs sont actuellement étudiés pour une utilisation potentielle en tant que biomarqueurs pronostiques(120).

III- IMMUNOSCORE

Les cellules tumorales peuvent exprimer des antigènes de surface entraînant une réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes T(121,122). Cette réponse immunitaire peut dans certains cas favoriser l'échappement et la résistance des cellules tumorales(123). Le rôle du système immunitaire dans le processus cancéreux a essentiellement été étudié dans le cancer du côlon par Galon et al(124). En effet, l'infiltration tumorale de lymphocytes dans le cancer colorectal est à l'origine d'une inhibition de la croissance tumorale et est associée à une amélioration du pronostic(125–127).

Dans un premiers temps, Galon et al (124)ont mis en évidence une corrélation inverse entre l'expression de gènes modulateurs du système immunitaire adaptatif et les récurrences tumorales suggérant un rôle bénéfique de ce système dans l'évolution clinique. Ils ont ensuite eu recours à l'IHC afin d'étudier la réponse immunitaire adaptative *in situ*. Cela a permis de mettre en évidence une corrélation significative entre la densité des cellules immunitaires au sein de la tumeur et l'évolution clinique des patients. Les marqueurs de l'immunité adaptative (CD3, CD8, GZMB et CD45R0) vont alors permettre une amélioration de la prédiction de la survie générale et de la survie sans récurrence.

Dans cette même étude, les chercheurs ont également montré qu'une faible réponse immunitaire *in situ* est, le plus souvent, associée à un mauvais pronostic quel que soit le stade tumoral (classification TNM). De façon similaire, une forte réponse immunitaire *in situ* est à l'origine d'une amélioration du pronostic même en cas de tumeur de stade 3.

La classification TNM ne permet pas de fournir des informations pronostiques complètes. En effet, au sein d'un même stade tumoral plusieurs évolutions cliniques peuvent être observées. Entre autre, cette classification ne va pas prendre en compte la réponse immunitaire de l'hôte alors que l'environnement tumoral joue un rôle essentiel dans son évolution. Bien que cette dernière reste une référence, il a donc été montré dans le contexte du cancer du côlon qu'une analyse de la réponse immunitaire intratumorale permet une meilleure évaluation de la

progression tumorale en considérant à la fois le processus invasif de la tumeur et les systèmes de défense de l'organisme (124,128).

De ce fait, une nouvelle approche a été développée afin d'améliorer la classification des cancers : il s'agit de l'Immunoscore (Figure 24-25)(129). L'immunoscore est basé sur la numération de deux populations lymphocytaires à la fois au centre de la tumeur (CT) et dans la marge invasive (IM) afin d'établir un pronostic clinique dans le cancer du côlon(130). Il permet alors de définir un score compris entre 0 (I0) et 4 (I4) où I0 correspond à une faible densité des deux types cellulaires au sein des deux régions et I4 à une forte densité des deux populations dans les deux régions.

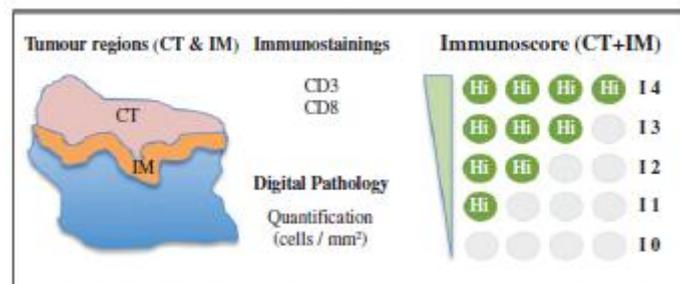


Figure 24 : Définition et méthodologie de l'Immunoscore(131)

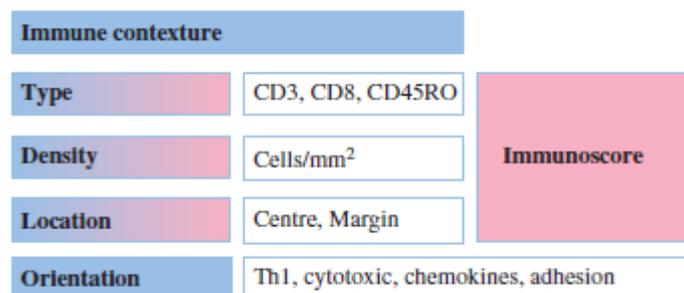


Figure 25 : Correspondance entre le contexte immunitaire et l'Immunoscore(131)

La détermination du type, de la densité et de la localisation des cellules immunitaires permet d'améliorer l'évaluation du pronostic dont la survie générale et la survie sans récurrence. L'immunoscore permettra alors l'identification de sous-groupes de patients présentant différents niveaux de risques de récurrences. Les patients à haut risque seront plus susceptibles d'obtenir un bénéfice de l'utilisation de thérapies adjuvantes. L'Immunoscore pourra donc également devenir un outil prédictif à la réponse aux nouvelles approches thérapeutiques dont l'immunothérapie. De plus, l'utilisation de techniques immunohistochimiques font de

l'immunoscore une méthode facile d'accès pour une utilisation en routine, bien qu'une standardisation des techniques soit tout d'abord nécessaire.

Bien que la recherche dans ce domaine ait essentiellement été réalisée dans le cancer du côlon, cette approche semble également prometteuse pour d'autres types de cancers dont le cancer du sein.

Chapitre 3 : Développement et mise sur le marché des biomarqueurs

Introduction au chapitre :

Afin de faire face à la montée des biomarqueurs, l'Europe a dû développer des outils réglementaires et programmes spécifiques à ces derniers. Les biomarqueurs peuvent être brevetés mais ne présentent pas de statut réglementaire à proprement parlé du fait de leur caractère biologique. Cependant, l'outil permettant l'identification et/ou le dosage devra suivre un cadre réglementaire concernant son développement et sa mise sur le marché.

Dans ce chapitre, sera abordée, dans un premier temps, l'identification d'un nouveau biomarqueur. Cette partie sera illustrée par un exemple de projet de recherche que j'ai eu l'occasion de réaliser au cours d'un stage de 6 mois au Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille. Ce projet a eu pour objectif de développer des techniques immunohistochimiques afin de mettre en évidence deux protéines dont la surexpression a été associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein et enfin d'étudier l'intérêt de leur développement en tant que biomarqueurs.

Dans un deuxième temps, nous aborderons les processus de validation des biomarqueurs. Ce processus se déroule en trois étapes : la validation analytique, la validation clinique et l'utilité clinique. Il doit permettre de s'assurer de la validité du test de diagnostic *in vitro* utilisé pour détecter le biomarqueur, doit également démontrer l'association du biomarqueur avec une maladie ou un critère clinique particulier et enfin doit justifier de l'intérêt d'une utilisation du biomarqueur en routine clinique.

Pour finir, nous aborderons l'étape de mise sur le marché du biomarqueur qui devra répondre à la réglementation des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DMDIV).

Identification d'un nouveau biomarqueur

La découverte d'un biomarqueur et son évaluation scientifique sont les premières étapes du cycle de vie d'un biomarqueur. Cette découverte repose avant tout sur l'amélioration des technologies et sur la meilleure compréhension des pathologies. Pour identifier chaque biomarqueur, médecins et chercheurs vont mettre au point des tests fondés sur la génétique, la biologie moléculaire et/ou l'immunologie.

Application : Mise au point des techniques d'Immunohistochimie et mise en évidence de Vangl1 et Vangl2 dans le cancer du sein

I- INTRODUCTION

Du fait de l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et de la surexpression de HER2 dans le cancer du sein basal (ou triple négatif), les patientes ne peuvent bénéficier ni de thérapies ciblées ni d'hormonothérapies disponibles sur le marché. Malgré la découverte de nouvelles approches thérapeutiques, il existe toujours un besoin important de nouvelles thérapies ciblées pour ce sous-type de cancer.

La dérégulation de cascades de signalisation responsables de la mise en place et du maintien de la polarité cellulaire peut être à l'origine de phénotype tumoral en altérant l'organisation du tissu épithélial et son homéostasie. Parmi ces voies, la voie de signalisation WNT non canonique (indépendante de la β -caténine, molécule clé de la voie WNT canonique) intervient dans la mise en place de la polarité planaire des tissus épithéliaux et est fondamentale pour le développement embryonnaire des invertébrés et vertébrés en participant à la coordination spatiale et fonctionnelle des cellules formant un tissu (Figure 26).

Les protéines impliquées dans cette voie WNT non canonique ont été initialement décrites chez la *Drosophila* et sont conservées au cours de l'évolution. Ces protéines et leurs complexes moléculaires associés participent non seulement à la morphogenèse tissulaire mais également à la migration et la division cellulaire grâce à des mécanismes moléculaires encore mal compris. Les nombreux gènes de la voie WNT non canonique codent pour des récepteurs membranaires tels que PTK7, Vangl 1/2, ROR2, certains de leurs ligands WNT mais également des protéines cytoplasmiques (DISHEVELLED, SCRIBBLE, ...). Ces protéines

sont engagées dans une voie de signalisation induisant l'activation de la voie JNK impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire aux mouvements cellulaires et jouant également un rôle de facteur de transcription.

De récentes études ont pu mettre en évidence un lien entre la voie WNT non canonique et les cancers. Dans les cancers du sein, les cellules réactivent couramment cette voie du développement afin de promouvoir la croissance tumorale et la dissémination métastatique(132).

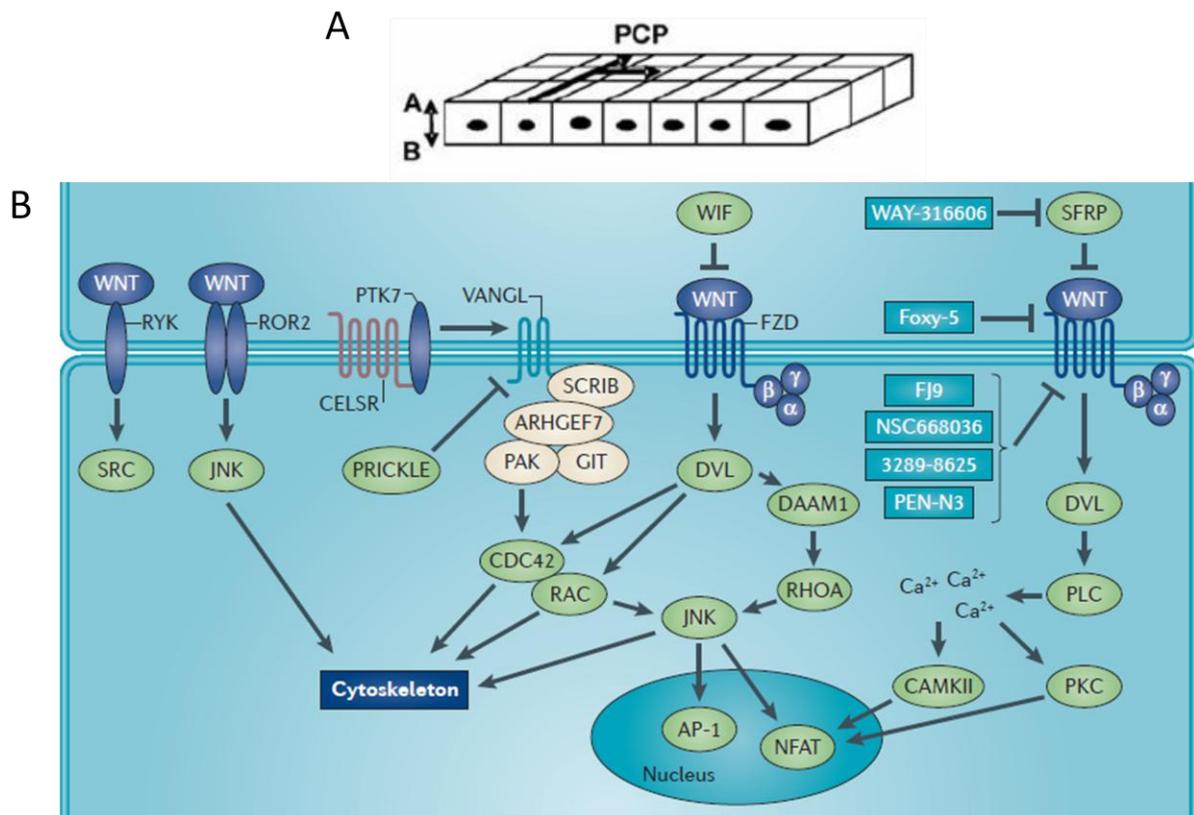


Figure 26 : A - Polarité cellulaire planaire ; B - Voie de signalisation WNT(133)

Les protéines Vangl sont impliquées dans la régulation de la voie WNT non canonique impliquée dans le développement embryonnaire. Cette famille de protéines est composée de deux paralogues : Vangl 1 et Vangl 2. Des mutations de *VANGL2* mais également de *VANGL1* ont été identifiées chez l'embryon humain et de souris, et sont à l'origine de défauts de fermeture du tube neural. Notamment, ces mutations peuvent induire un craniorachischisis qui est la forme la plus sévère des anomalies de fermeture du tube neural.

Dans le processus cancéreux, les protéines Vangl vont intervenir, par exemple, dans l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses, l'initiation tumorale, le développement des métastases ou la résistance aux médicaments(134).

Dans le contexte du cancer du sein, la surexpression de Vangl2 va être associée à un mauvais pronostic(135,136). En effet, une récente étude a confirmé que Vangl2 est surexprimé dans 24% des carcinomes du sein invasifs et qu'une haute expression de son paralogue Vangl1 est associée avec une augmentation du taux de rechute et une réduction de la survie(134,137)(Figure 27).

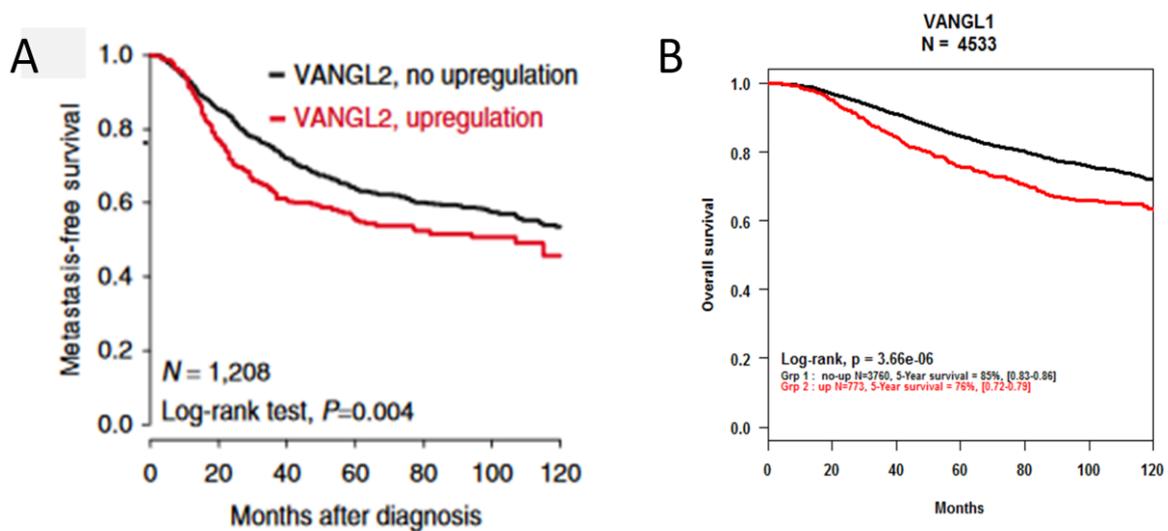


Figure 27 : A- Survie sans métastase avec ou sans surexpression de Vangl2(132) ; B – Survie générale avec ou sans surexpression de Vangl1

La surexpression de Vangl2 joue un rôle dans la croissance et la migration de cellules de cancer du sein et va être surexprimée dans les cancers de type basaux présentant un mauvais pronostic. Vangl2 est également associé à une augmentation de la taille des tumeurs et à un statut en immunohistochimie triple négatif (ER-/PR-/HER2-)(132) (Figure 28A).

Cependant, la surexpression de Vangl1 ne va pas être associée avec un sous-type spécifique de cancer du sein mais plutôt avec un statut prolifératif. En effet, Vangl 1 joue essentiellement un rôle dans la mobilité cellulaire et l'invasivité sans rôle évident dans la croissance tumorale(135,138) (Figure 28B).

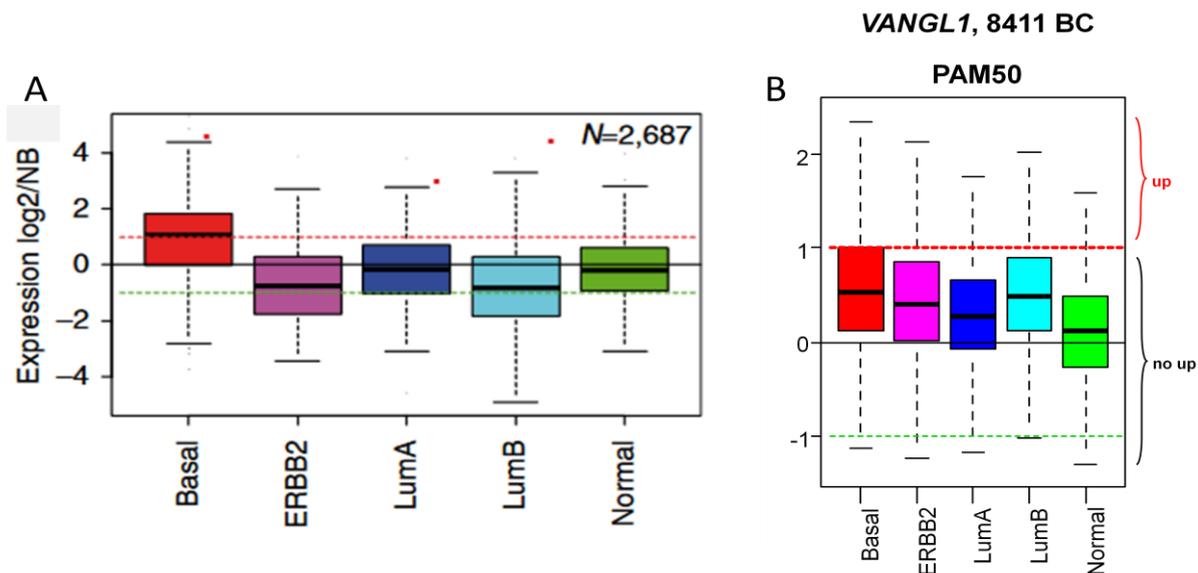


Figure 28 : A- Expression de Vangl2 dans le cancer du sein(132) ; B- Expression de Vangl1 dans le cancer du sein

A long terme, la caractérisation plus poussée des protéines Vangl pourra potentiellement conduire au développement de nouvelles thérapeutiques permettant aux patients résistants aux traitements actuels de référence (ex : Herceptin® - Trastuzumab) de bénéficier d'une alternative thérapeutique afin d'augmenter leurs chances de survie face à la maladie. Les protéines Vangl pourront également faire l'objet d'un développement en tant que biomarqueurs comme par exemple, la détermination du statut Vangl 2 dans le cancer du sein de type basal.

Objectifs du projet :

L'objectif général de mon projet a consisté en la mise au point des techniques d'immunohistochimie afin de mettre en évidence Vangl 1 et Vangl 2 dans le cancer du sein. Pour débiter mon projet, j'avais à disposition des données précédemment obtenues par mon équipe. En 2010, une expérience d'IHC utilisant un anticorps monoclonal anti-Vangl2 a montré que Vangl2 était plus exprimé dans les cellules tumorales que dans le stroma du cancer du sein basal(132). A partir de cela, il a été nécessaire de développer des conditions validées afin d'obtenir un résultat reproductible.

Les différentes étapes de mon projet ont donc été de :

1. S'assurer de la possibilité d'utiliser des anticorps monoclonaux, générés par MI-mAbs et mon laboratoire de recherche « Polarité cellulaire, signalisation et Cancer » du CRCM, en immunohistochimie. La validation de ces anticorps spécifiques soit de

Vangl1 ou Vangl2 par les méthodes de Western Blot, Immunofluorescence, Immunoprécipitation et ELISA étant déjà réalisée.

2. Développer des conditions validées et reproductibles en immunohistochimie.
3. Tester les clones validés sur un panel de tumeurs du sein pour chaque sous-type de cancer du sein issu de l'Institut Paoli-Calmettes.
4. Etudier l'intérêt de développer Vangl 1 et Vangl 2 en tant que biomarqueurs dans le cancer du sein.

II- MATÉRIELS ET MÉTHODES

A- Méthodes - Immunohistochimie

1- Préparation des échantillons pour la réalisation d'une IHC

Avant de pouvoir effectuer une IHC, une certaine procédure est à suivre afin de préparer les échantillons. Deux types de préparations peuvent être réalisés, les tissus/cellules peuvent être inclus en paraffine ou bien congelés.

Inclusion en paraffine :

- *Le prélèvement* réalisé doit être représentatif du tissu. Il est ensuite placé dans des cassettes identifiées spécialement conçues pour le transport des spécimens.
- *La fixation* : le matériel doit ensuite être fixé dans le but de conserver les structures et permettre le durcissement des pièces. Elle se fait par immersion dans un grand volume de liquide fixateur (ex : formol)
- *L'inclusion* a pour but de permettre la réalisation des coupes. Le milieu le plus utilisé est la paraffine. Le prélèvement doit subir une déshydratation (3 bains d'alcool à concentration croissante) pour que le tissu ne subisse ni distorsion, ni durcissement. Le prélèvement subit ensuite 3 bains de produit de substitution au toluène tel que l'histolemone ce qui permet de rendre la paraffine miscible avec le tissu. On réalise ensuite un bain de paraffine chaude pour solidifier le tissu avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc dur à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.
- *La coupe* est ensuite réalisée avec un microtome permettant de réaliser des tranches de 2 à 7 μm d'épaisseur qui seront recueillies sur des lames de verre.

Inclusion en OCT :

Cette technique solidifie les tissus permettant de réaliser des coupes très minces comme pour les tissus enrobés en paraffine. Les tissus non fixés et congelés conservent une antigénicité excellente mais aux dépens de la morphologie. Elle convient à la détection d'antigènes labiles ou à la préservation de l'ADN/ARN par exemple.

Les tissus sont congelés dans un composé, gel OCT, qui durcit à -20°C. Il s'agit d'un composé idéal pour préserver l'ultrastructure cellulaire mais aussi les acides nucléiques. La congélation se fait de préférence sur du tissu frais mais peut également être réalisée sur du tissu fixé. Les coupes sont réalisées au cryostat. Les sections sont effectuées la plupart du temps à 7µm et sont étalées à l'aide d'un pinceau sur un support refroidi et contrôlé en température puis collées par contact aux lames qui sont à température ambiante.

Les coupes peuvent à nouveau être fixées sur la lame par la réalisation d'un bain dans l'acétone ou le méthanol par exemple.

2- Protocole d'immunohistochimie

Sur la plateforme d'histo-pathologie expérimentale du CRCM (ICEP), l'IHC se fait à l'aide d'un système robotisé appelé *VentanaDiscovery XT*. Au préalable, les lames doivent être placées pendant environ 1h à l'étuve afin d'enlever le plus gros de la paraffine. Ce système présente une capacité de 30 lames, chaque lame pourra suivre une programmation différente. En effet, chaque lame sera identifiée par une étiquette présentant un « code barre » indiquant à l'appareil le protocole à suivre.

Les étapes classiques de l'IHC sont les suivantes :

(i) Déparaffinage

1. Démasquage des sites antigéniques (*paramètre modulable*). Plusieurs temps de démasquage sont possibles : démasquage très court (12 min), court (20 min), standard (36 min) et long (52min). Plusieurs types de démasquage sont également disponibles : CC1 (tampon EDTA à pH8), CC2 (tampon citrate à pH9) ou protéase.
2. Dépôt manuel de 100 µL d'anticorps primaire sur chaque lame. La concentration de l'anticorps primaire pourra varier au cours d'une mise au point (de l'ordre de 0,5 à 50 µg/ml ici).

3. Incubation de l'anticorps primaire (*paramètre modulable*). Le temps d'incubation peut être modulé, le plus souvent, on utilisera un temps d'incubation de 1h, 3h ou 6h. L'incubation pourra également être réalisée à température ambiante ou à 37°C.
4. Dépôt d'une goutte de l'anticorps secondaire, celui-ci dépend de l'espèce de l'anticorps primaire (exemple : OmniMap anti-souris HRP ou OmniMap anti-Rat HRP) et incubation 16 minutes. Cet anticorps peut être également couplé avec un système d'amplification du signal (UltraMap).
5. Contre-coloration : dépôt d'une goutte d'*hematoxylin II* et incubation 16 minutes
6. Post contre-coloration : dépôt d'une goutte de *BluingReagent* et incubation 4 minutes
7. Nettoyage des lames

D'autres étapes peuvent être ajoutées en option comme par exemple :

- Une étape intermédiaire de *Protein Block* à la suite du démasquage qui permet de bloquer les sites antigéniques non spécifiques de l'anticorps primaire.
- Une étape intermédiaire peut également être ajoutée entre le dépôt de l'anticorps primaire et de l'anticorps secondaire. Elle consiste en l'utilisation d'un troisième anticorps reconnaissant la fraction constante de l'anticorps primaire et reconnu par l'anticorps couplé à l'HRP. Cette utilisation permet une amplification du signal.

B- Anticorps

Pour la réalisation de mon projet, différents anticorps décrits dans le Tableau 4 ont été mis à ma disposition. Certains ont été produits par MI-mAbs et d'autres par mon laboratoire de recherche.

Les protéines Vangl présentent une structure similaire (Figure 29). On va retrouver 4 domaines transmembranaires avec les régions N- et C- terminales intracellulaires. Les anticorps monoclonaux ciblent la région N-terminale qui est la région présentant le plus de différences entre les deux protéines ce qui permet l'obtention de clones spécifiques de Vangl1 ou de Vangl2.

Tableau 4: Anticorps utilisés

Anticorps monoclonaux	Concentration (mg/ml)	Animaux immunisés pour la production	Cible	Cross-réactivité (réalisée par Western Blot)
19D5 purifié	1,1 mg/ml	Souris	Vangl 1 humain	
20G9 purifié	0,9 mg/ml	Souris	Vangl 1 humain	
3D1 purifié	1,2 mg/ml	Souris	Vangl 1 humain	Souris
7G6 purifié	1,4 mg/ml	Souris	Vangl 1 humain	Souris
2G4 purifié	Lot n°1 : 2,2 mg/ml Lot n°2 : 1,62 mg/ml	Rat	Vangl 2 humain	Souris
36E3 purifié	Lot n°1 : 1,8 mg/ml Lot n°2 : 2,5 mg/ml Lot n°3 : 2,5 mg/ml	Rat	Vangl 2 humain	Souris
Ascites 2G4 et 36E3 non purifiés		Rat	Vangl 2 humain	Souris

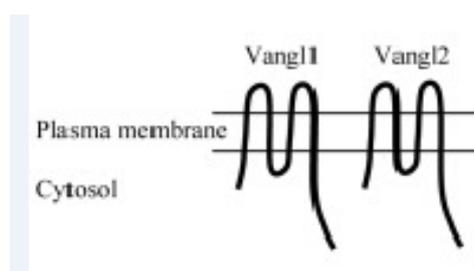


Figure 29 : Structure des protéines Vangl

C- Biologie cellulaire

1- Lignées cellulaires et culture

La caractérisation des anticorps monoclonaux a nécessité l'utilisation de différentes lignées cellulaires adhérentes.

Afin d'évaluer la spécificité en IHC des anticorps monoclonaux dirigés contre Vangl1, nous avons utilisé des cellules MCF7 qui sont des cellules d'adénocarcinome du sein humain

exprimant fortement Vangl 1. Le milieu de culture contient du DMEM/F12 (50% Dulbecco's Modified Eagle Medium, 50% Ham's F12) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté 30 min à 56°C ainsi que de 1% de Pénicilline-Streptomycine afin de limiter le développement bactérien.

Deux lignées ont été produites :

- (i) Une lignée MCF7 « Wild type » sans modification et exprimant normalement Vangl 1
- (ii) Une lignée MCF7 Knock-out (KO) Vangl 1 (suppression de l'expression de la protéine Vangl 1) obtenue grâce à l'utilisation de la technologie siRNA (Figure 30). Cette dernière a été réalisée par une étudiante en thèse au sein du laboratoire.

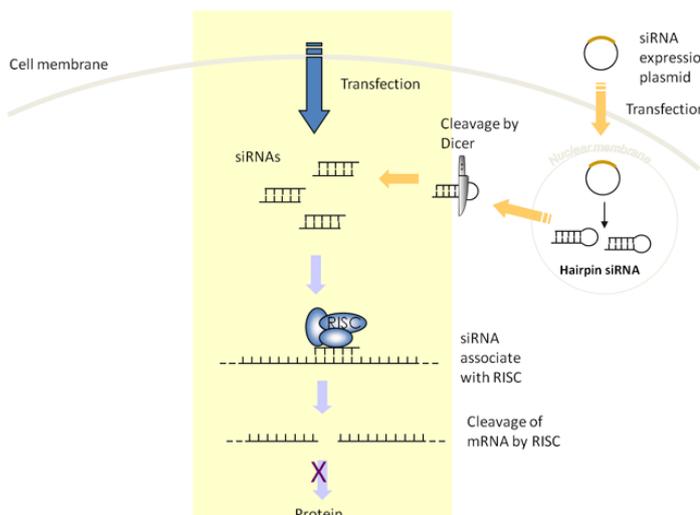


Figure 30 : Principe de la technologie siRNA

Les siRNA sont de petits ARN double brin de 21 à 24 paires de bases. Ils peuvent inhiber l'expression d'un gène en dirigeant la coupure des ARN qui leur sont complémentaires ou en inhibant la traduction d'une séquence génétique spécifique. Les siRNA sont reconnus dans le cytoplasme par un complexe protéique (RISC) qui s'active en libérant le brin complémentaire de l'ARN ou brin sens. Le complexe activé reconnaît un ARNm par complémentarité des bases. Une fois liée, une endonucléase appartenant au complexe coupe le transcrite au niveau du site de reconnaissance. Les morceaux clivés sont alors dégradés par des exonucléases.

Pour évaluer la spécificité en IHC des anticorps dirigés contre Vangl 2, des cellules ARPE19 ont été utilisées. Il s'agit d'une lignée de cellules humaines issues de la rétine et exprimant Vangl2. Dans ce cas, une lignée ARPE 19 KO pour Vangl 2 a pu être obtenue par un membre de mon laboratoire grâce à l'utilisation de la technologie Crispr (Figure 31).

Une troisième lignée a été utilisée, il s'agit de cellules SKBR7 qui sont des cellules épithéliales humaines de carcinome mammaire (mésenchymal)

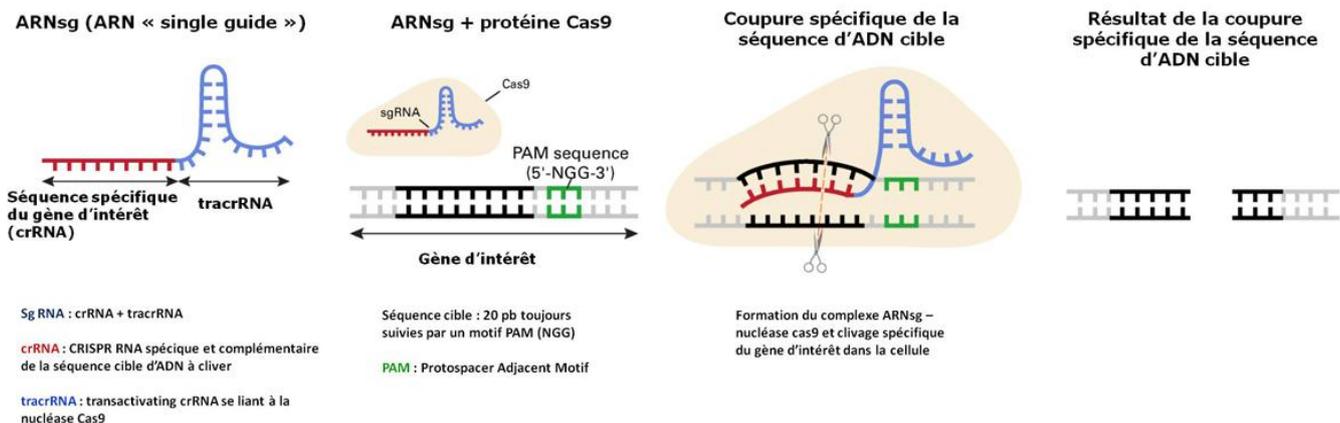


Figure 31 : Principe de la technologie Crispr

Le système CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) utilise la nucléase Cas9, qui complexée à un ARN guide (ARNg) complémentaire de la séquence cible va cliver l'ADN de façon spécifique en amont d'une séquence PAM localisée sur l'ADN génomique. L'action de la nucléase Cas9 guidée par l'ARNg aboutit à une coupure double brin de l'ADN génomique au niveau de la séquence cible. Cette technique permet de couper pour enlever ou éventuellement remplacer une séquence génique.

2- Réalisation des culots cellulaires pour inclusion en paraffine

- Les cellules utilisées sont adhérentes : pour les remettre en suspension, elles sont lavées en PBS (Phosphate Buffered Saline : KCl 200 mg/ml – KH₂PO₄ 200 mg/ml – NaCl 800 mg/ml – Na₂HPO₄-7H₂O 2160 mg/ml) puis mises en présence de trypsine-EDTA (0,05% Trypsine-0,53mM EDTA). La trypsine va opérer une digestion enzymatique des protéines d'adhésion et l'EDTA (chélateur du calcium) va empêcher l'action des lectines. Les cellules sont ensuite placées à l'étuve pendant quelques minutes.
- La trypsine-EDTA est ensuite diluée par ajout de milieu afin d'arrêter son action, l'ensemble des cellules est alors récupéré puis centrifugé à 1000 rpm pendant 5 min.
- Le surnageant est aspiré puis le culot cellulaire est remis en suspension dans du PBS 1x pour laver les cellules. On centrifuge une nouvelle fois à 1000 rpm pendant 5 min.
- Le surnageant est aspiré, puis les cellules sont pré-fixées par une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes.

Avant l'inclusion en paraffine, les culots sont inclus dans des boudins d'agarose. Les boudins d'agarose suivent alors le même parcours décrit précédemment pour l'inclusion des tissus inclus en paraffine.

D- Biochimie – Western Blot (WB)

1- Préparation de l'échantillon

- ✓ Les cellules sont tout d'abord lavées en PBS 1X puis lysées dans un tampon de lyse (Hépès 50mM pH8, NaCl 150mM, EDTA 2mM, 10% glycérol, 0,5% NP40 [détergent non ionique]) supplémenté extemporanément d'inhibiteurs de protéases (PIC : ProteaseInhibitors Cocktail au 1/1000) afin d'obtenir l'échantillon protéique.
- ✓ Le lysat total est ensuite centrifugé à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C permettant de récupérer le surnageant contenant les protéines.
- ✓ La concentration protéique des surnageants est déterminée par un dosage de Bradford (Biorad®) à l'aide d'une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumine) ce qui permet ensuite d'équilibrer les concentrations des différents échantillons.

2- Electrophorèse des protéines

- ✓ Les échantillons protéiques (50µgminimum) sont dénaturés dans du tampon de charge Laemmli 4X (Glycérol 20%, SDS8%, 0,44 M 2-Mercaptoethanol, bleu de bromophenol 0,008%, 1M Tris HCl, pH6,8) pendant 10 minutes à 95°C.
- ✓ Les échantillons et l'échelle de poids moléculaire sont alors chargés sur un gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) placés dans la chambre de migration remplie avec un tampon de migration (Tris Glycine 1x [2,5 mM Tris- 25mM Glycine], SDS 0,1%).
- ✓ L'extrait va dans un premier temps être concentré sur le gel de concentration (stacking : polyacrylamide 4,5%, Tris 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, APS 0,05%, Temed 0,9mM) puis les protéines sont séparées sur le gel de séparation (resolving : polyacrylamide 7,5%, Tris 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,05%, Temed 0,9mM) à 80 Volts pendant 15 minutes et 2h à 150 Volts.

3- Transfert des protéines

- ✓ Les protéines sont électro transférées à 70 Volts pendant 1h à température ambiante sur une membrane de nitrocellulose (GEhealthcare, Life Sciences®) dans un tampon de transfert (70% H₂O, 20% éthanol, 1X Tris Glycine).
- ✓ L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau (0,1% Ponceau S dans 5% d'acide acétique) puis décoloration au TBS 1X, 0,01% Tween.

4- Détection des protéines

- ✓ La membrane est saturée dans du TBS 1X, 0,01% Tween, 5% lait afin de bloquer les sites non spécifiques avant d'être incubée toute la nuit avec l'anticorps primaire (ici anticorps anti-Vangl 1 clone 19D5) à la concentration de 4,4µg/ml (dilution au 1/250^e) en TBS 1X, 0,01% Tween, 5% lait à 4°C sur plaque agitatrice.
- ✓ Après 3 lavages de 5 minutes à température ambiante sur plaque agitatrice avec du TBS 1X, Tween 0,01%, la membrane est incubée 1h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire (Ac anti-souris au 1/10000 en TBS Tween + 5% lait) couplé à une HRP (Horse radish peroxydase).
- ✓ Après 3 lavages de la membrane, les protéines sont révélées avec le kit ECL (ElectroChimie Luminescence, Super Signal West Pico), substrat de la peroxydase et analysées avec l'imageur (Gbox, logiciel GENEsys).

III- RÉSULTATS

A- *Etude de Vangl 1 chez l'Homme*

1- Etude de la spécificité du marquage par les anticorps monoclonaux anti-Vangl1 en IHC

Cette étude de spécificité du marquage a pour objectif de s'assurer que les anticorps monoclonaux utilisés vont reconnaître uniquement la protéine souhaitée (ici Vangl 1). Pour ce faire, nous avons eu recours à l'utilisation de cellules MCF7 sauvages exprimant fortement Vangl1 et de cellules MCF7 KO pour Vangl 1. Les culots cellulaires ont été inclus en paraffine.

Pour chaque clone, différentes conditions de démasquage des sites antigéniques ont été testées (Figure 32) :

Anticorps anti-Vangl1	Démasquage standard des sites antigéniques	Concentration	Conditions d'incubation
19D5 / 20G9 / 3D1 / 7G6	pH6, pH8 ou protéases	10 µg/ml	3h à 37°C

Cette première étape a permis de conclure à la spécificité en IHC de deux clones : le **19D5** ainsi que le **20G9**. En effet, pour ces deux clones nous pouvons observer un marquage membranaire des cellules sauvages qui n'est plus présent sur la même lignée cellulaire n'exprimant pas (ou faiblement) Vangl1 dans les mêmes conditions d'IHC.

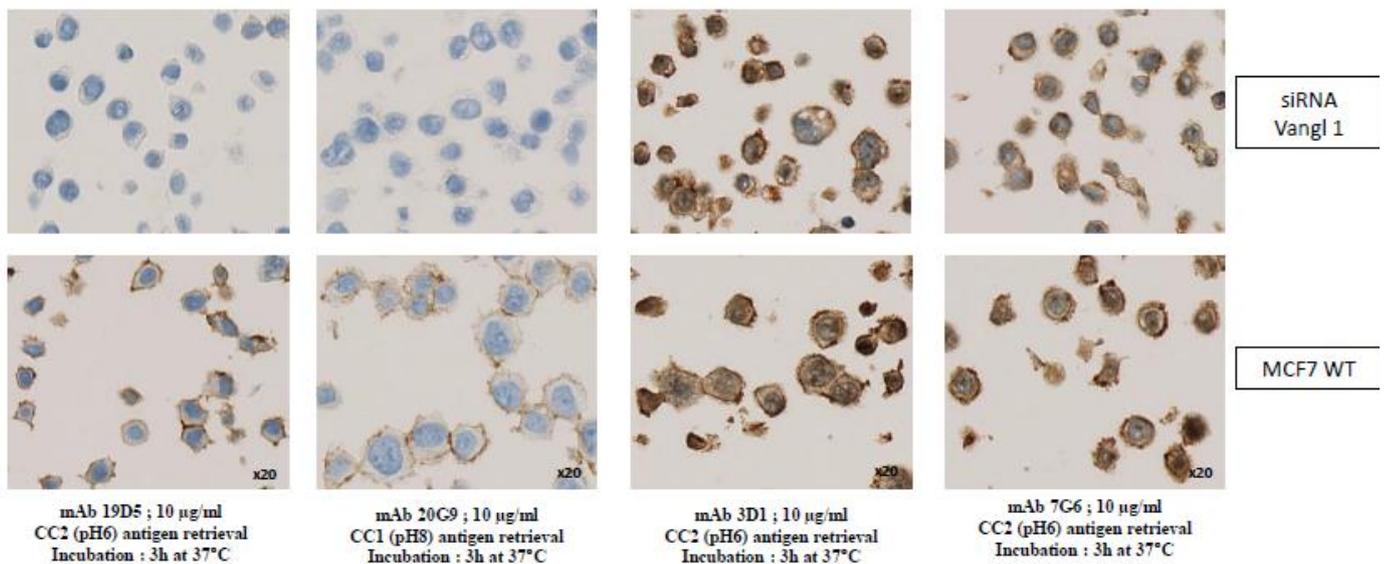


Figure 32 : Etude de spécificité du marquage chez l'homme des anticorps anti-Vangl1

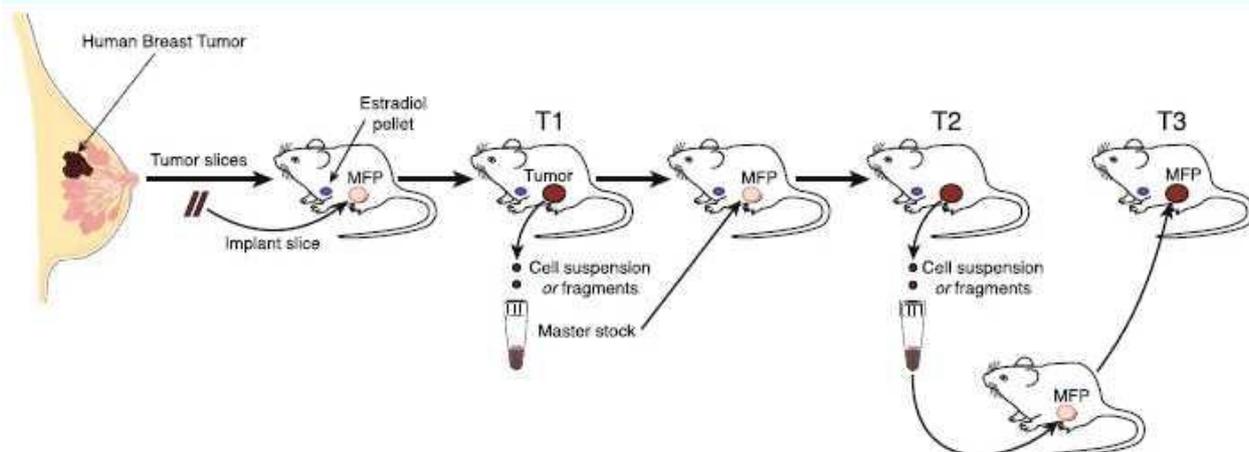
Pour les deux autres clones, le **3D1** et le **7G6**, on observe un marquage très fort à renforcement membranaire similaire sur les deux culots cellulaires. Afin d'être sûr de la non-spécificité de ces deux clones, nous avons réalisé une gamme de concentration décroissante afin de voir si nous pouvions éteindre le signal des cellules KO Vangl 1 tout en conservant celui des cellules sauvages. Cela n'a pas été le cas, nous avons donc conclu à une non-spécificité en IHC de ces deux clones.

Pour la suite de nos études en IHC chez l'homme, nous avons donc décidé de poursuivre uniquement avec les anticorps monoclonaux 19D5 et 20G9 donnant un marquage spécifique de Vangl 1 chez l'homme.

2- Développement des conditions d'IHC sur tissus humains

a- Xénogreffes dérivées de patients (PDX – Figure 33) incluses en paraffine

Sur PDXs, différentes conditions d'IHC ont été testées afin d'optimiser le signal, tout en se basant sur celles utilisées précédemment sur cellules. Ne disposant d'aucune information concernant l'expression de Vangl1 par les PDXs, nous avons pris la décision de nous baser sur les résultats d'expression de Vangl2 obtenue par Western Blot(132) par un membre du laboratoire en supposant un profil d'expression similaire.



Medscape

Source: Breast Cancer Res © 2015 BioMed Central, Ltd.

Figure 33 : Production de PDXs (Patient Derived Xenografts) - Le tissu tumoral du patient va être implanté chez une souris immunodéficiente qui va donc développer une tumeur présentant les mêmes caractéristiques que celle du patient et qui pourra être prélevé et utilisé pour des travaux de recherche.

Conditions testées :

Anticorps	Démasquage standard des sites antigéniques	Concentration	Incubation	Système de révélation
19D5 et 20G9	pH 6 / pH8	10µg/ml	3h à 37°	OmniMap (sans amplification)
19D5	pH 6 / pH 8	4,4 µg/ml	3h à 37°	OmniMap
19D5	pH6 / pH8	2,2 µg/ml	3h à 37 °C	OmniMap
19D5	pH6	10 µg/ml	1h à 37°	OmniMap
19D5	pH6	7,5 µg/ml	3h à 37°	OmniMap
20G9	pH8	15µg/ml 20 µg/ml	3h à 37°	UltraMap (amplification du signal)

Sur PDXs, nous avons pu observer un marquage essentiellement cytoplasmique et membranaire avec le clone 19D5. Même à l'aide d'un système d'amplification du signal, le clone 20G9 n'a pas permis d'obtenir un marquage suffisant des tissus ce qui a amené à nous concentrer uniquement sur le clone 19D5 pour la suite de nos études chez l'homme (Figure 34).

Les conditions d'IHC pour lesquelles nous avons obtenu le meilleur marquage et présentant le moins de bruit de fond, ont été les mêmes que celles utilisées sur cellules :

Concentration en anticorps : 10 µg/ml
 Démasquage standard des sites antigéniques : CC2 (pH6)
 Incubation : 3h à 37°C sans amplification du signal

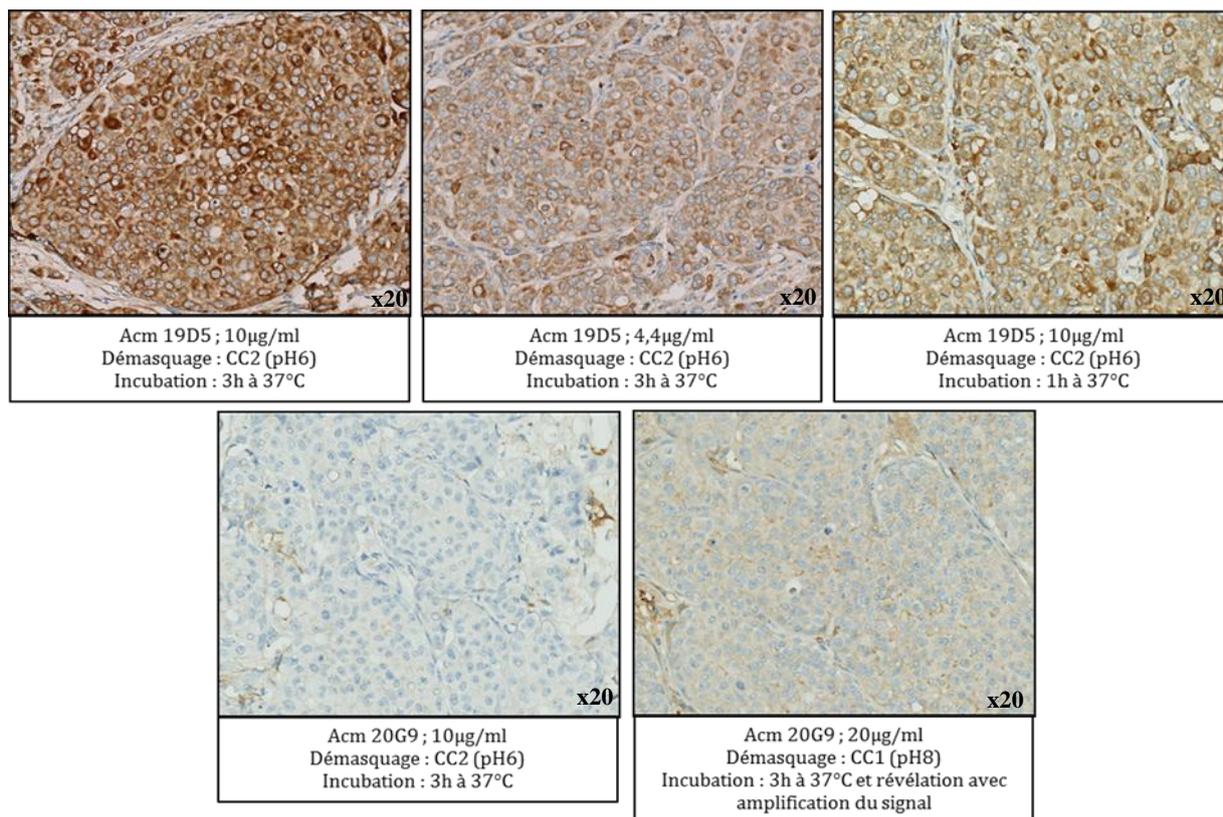


Figure 34 : Développement des conditions d'IHC sur xénogreffes dérivés de patients incluses en paraffine

Cependant, nous avons observé une absence de corrélation avec les données de Western Blot pour Vangl 2. En effet, des PDXs n'exprimant pas Vangl 2 ont montré une expression de Vangl 1 en IHC.

b- Tumeurs du sein incluses en paraffine

L'objectif final étant de tester le/les clones validés sur un panel de tumeurs du sein, nous avons réalisé une dernière étape de mise au point des conditions d'IHC du clone 19D5 sur un échantillon de tumeur représentant les 4 sous-types de cancer du sein.

Différentes conditions ont également été testées :

Antibodies	Démasquage des sites antigéniques	Concentration	Incubation	Système de révélation
19D5	pH 6 standard	10 µg/ml	3h at 37°	OmniMap
19D5	pH6 standard	10 µg/ml	1h at 37°	UltraMap Amplification
19D5	pH6 court, standard et long	10 µg/ml	2h at 37°	UltraMap Amplification

La révélation à l'aide d'un système d'amplification du signal après 2 heures d'incubation nous a permis d'obtenir un signal plus fort tout en conservant un bruit de fond faible, nous avons

donc retenu ces conditions. Les variations des résultats d'IHC suite à l'utilisation de différents temps de démasquage étant mineures, nous avons choisi de rester avec un temps standard qui se trouve être le meilleur compromis pour obtenir un bon signal (Figure 35).

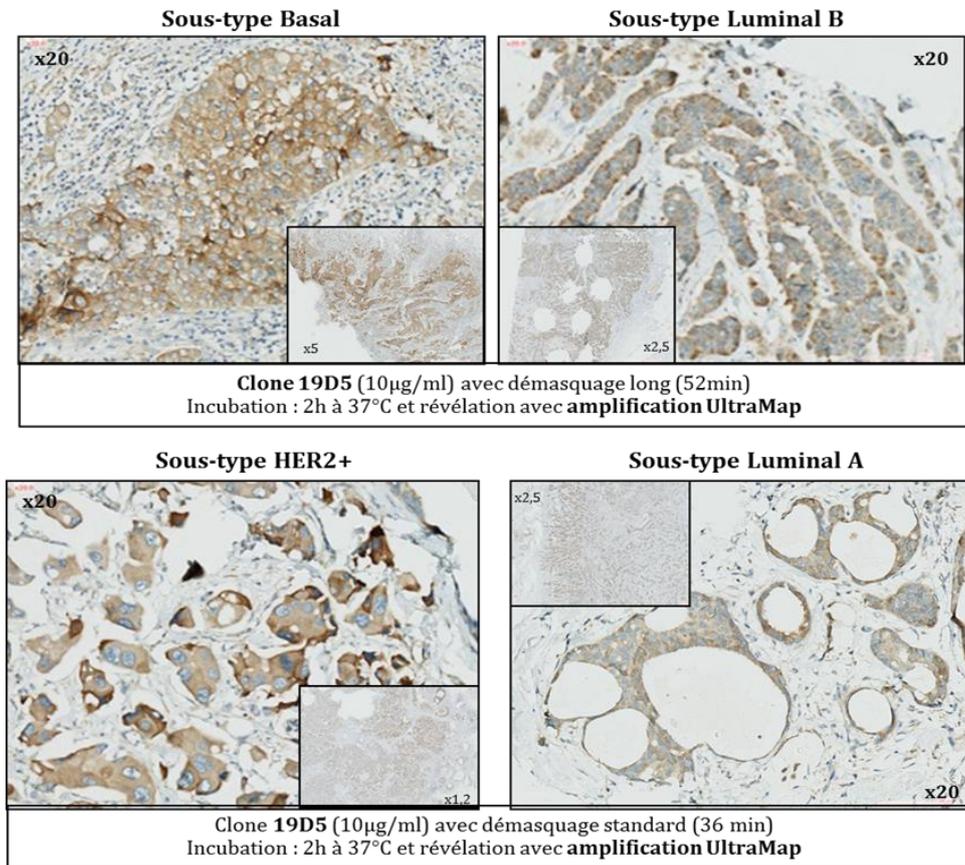


Figure 35 : Développement des conditions d'IHC sur tumeurs du sein incluses en paraffine

3- Corrélation des données d'expression de Vangl1 obtenues par Western Blot et Immunohistochimie

Afin de valider la sensibilité de la méthode d'immunohistochimie avec l'anticorps 19D5 anti-Vangl1, nous avons voulu réaliser une corrélation des données d'expression de Vangl1 obtenues par Western Blot et par IHC à partir d'un panel de xénogreffes incluses en paraffine. Cela doit permettre de s'assurer que l'anticorps sera capable de mettre en évidence une différence dans le marquage immunohistochimique pour des échantillons de concentrations protéiques différentes.

Sur les 7 échantillons testés (Figure 36), nous n'avons pas observé de différence majeure dans l'expression de Vangl1 entre chaque PDX par les deux techniques. Les données d'expression de l'ARN messager (ARNm) disponibles pour deux des PDXs testées indiquent une

surexpression de l'ARNm permettant la synthèse de Vangl 1. Cela suggère que l'ensemble des PDXs testées vont exprimer Vangl 1 ce qui correspond aux résultats que nous avons pu obtenir.

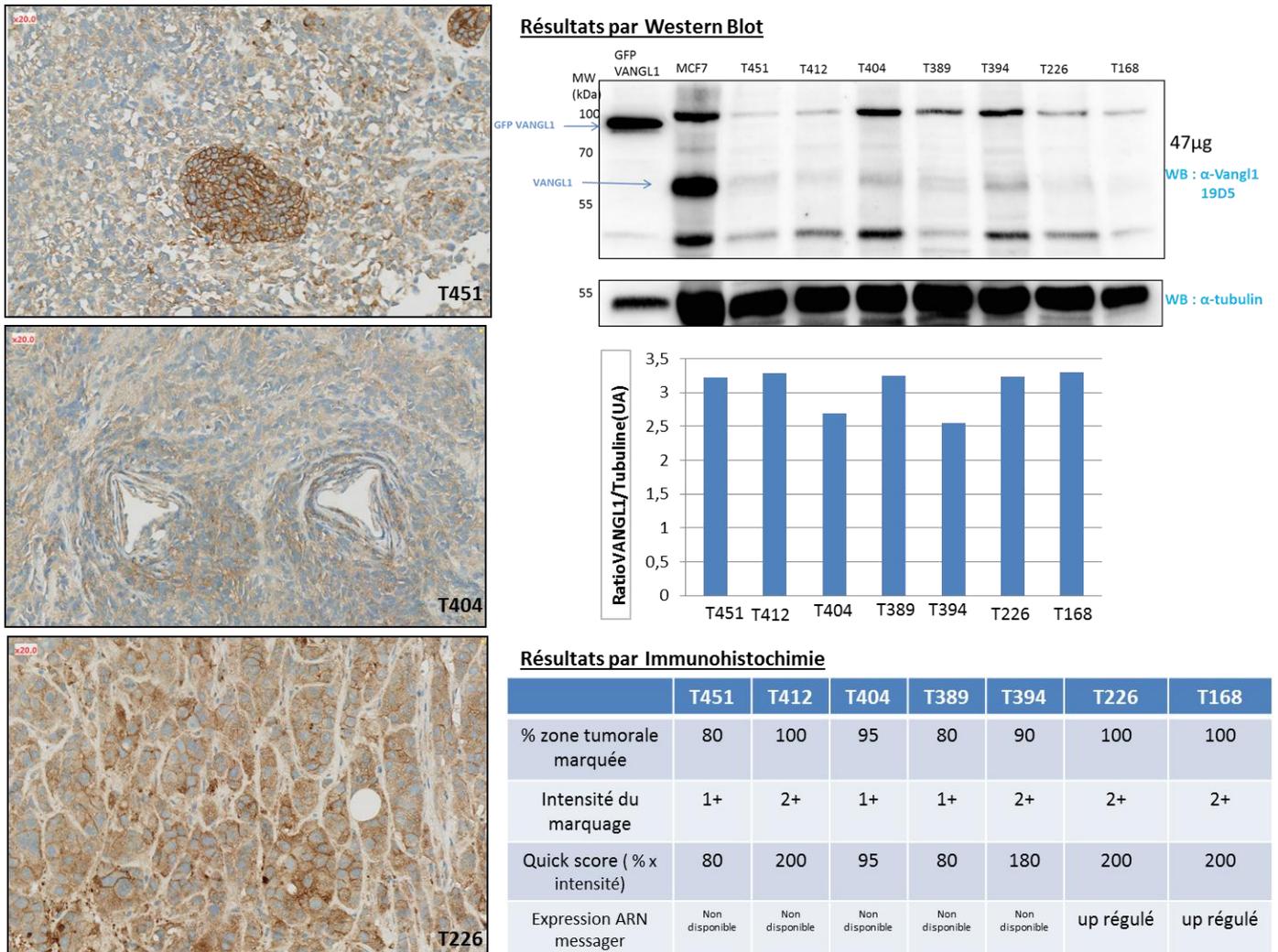


Figure 36 : Corrélation des données d'expression de Vangl 1 obtenues par Western Blot et Immunohistochimie

Bien que ces derniers soient cohérents, l'absence de différence de concentrations protéiques entre les échantillons ne permet pas d'observer une modification franche du marquage en IHC, ni de différentiel en WB. Par la suite, nous avons testé l'anticorps purifié 19D5 en IHC sur une douzaine de tissus de cancer du sein (comprenant l'ensemble des sous-types) ainsi que sur du sein normal. Nous avons pu observer des différences plus importantes dans l'intensité du marquage ainsi que dans le pourcentage de la zone tumorale concernée par le marquage entre les différents tissus.

L'association de ces résultats est donc en faveur d'une bonne corrélation entre la concentration protéique de Vangl 1 et le Quick score qui prend en compte l'intensité du marquage et la quantité de cellules tumorales marquées. Nous allons donc désormais pouvoir utiliser le clone 19D5 sur Tissue Micro Array (TMA) permettant de valider le profil d'expression de Vangl1 sur un grand nombre d'échantillons et de définir la signature pronostique de ce marqueur.

4- Etude de Vangl 1 en IHC sur Tissue MicroArray (TMA)

Le TMA est une technologie à moyen débit permettant d'analyser l'expression d'une protéine sur un nombre important d'échantillons différents disponibles sur une seule lame (ici environ 150). Pour cette étude, nous avons utilisé un TMA sein « tout-venant » c'est-à-dire présentant des échantillons de chaque sous-type de cancer du sein (Figure 37).

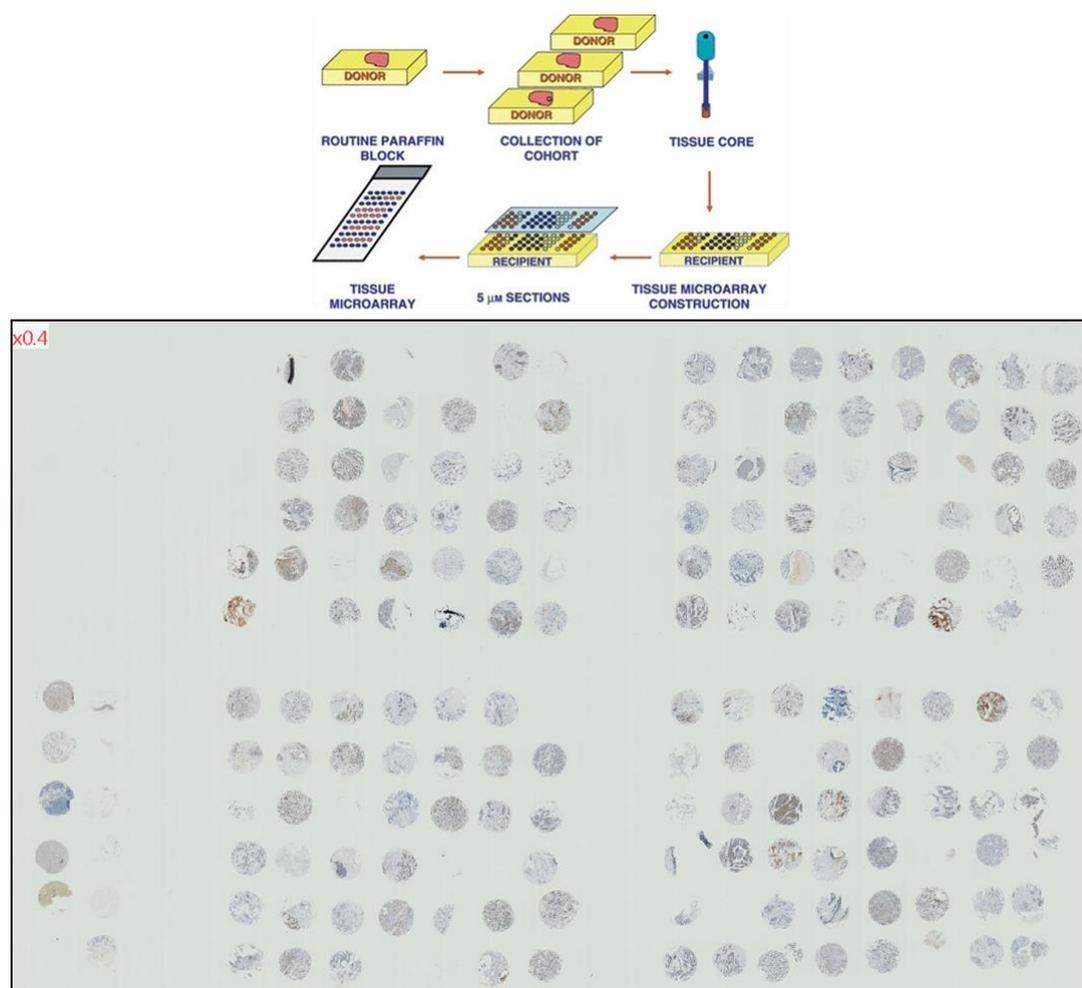


Figure 37 : IHC sur Tissue MicroArray sein "tout-venant" - Clone 19D5 anti-Vangl1 (10 μg/ml)

L'analyse du TMA par un anatomopathologiste a permis d'établir un Quick score pour chaque échantillon. Afin d'étudier la variation de l'expression de Vangl1 dans le cancer du sein, nous avons réalisé une moyenne du Quick score pour chaque sous-type de cancer du sein (Basal, HER2+, Luminal A et B) présentée sur la Figure 38.

Cette étude ne permet pas de mettre en évidence une variation significative entre les différents sous-types ce qui est en accord avec les données bibliographiques décrites en Introduction. On observe, de plus, une très bonne corrélation avec les données d'expression de génomique. Dans les deux cas, on ne retrouve pas de surexpression de Vangl 1 et les mêmes tendances peuvent être observées avec une expression légèrement plus élevée pour le sous-type basal et légèrement plus faible pour le sous-type luminal A.

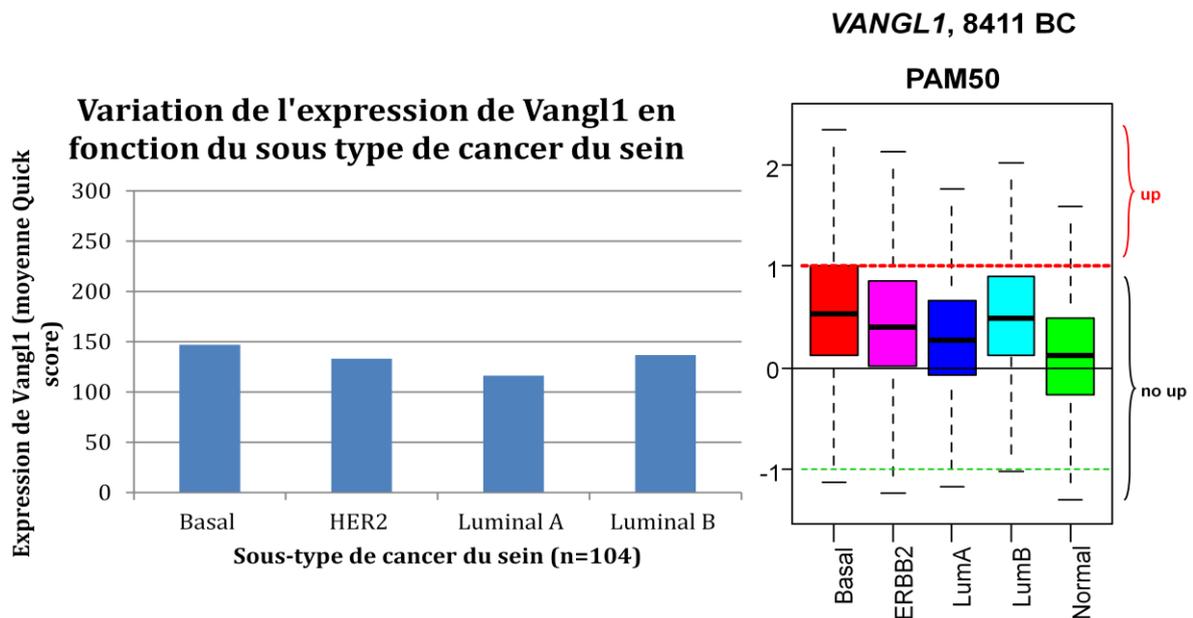


Figure 38 : Variation de l'expression de Vangl1 en fonction du sous type de cancer du sein

Vangl1 étant plutôt décrit comme un marqueur de prolifération, nous avons également voulu étudier la variation de l'expression de Vangl1 en fonction de l'index de prolifération, Ki-67 (Figure 39). L'antigène nucléaire Ki-67 est également détecté par un anticorps en IHC et l'index de marquage représente le pourcentage de noyaux marqués par l'anticorps. La valeur seuil est de 15%, à partir de ce seuil la tumeur sera considérée comme proliférative.

Nous avons donc comparé la moyenne du Quick score pour Ki-67 < 15% à la moyenne pour Ki-67 ≥ 15%. Dans ce cas, nos résultats ne sont pas en accord avec les données bibliographiques. En effet, on n'observe pas de différence significative du Quick score selon le statut prolifératif.

Variation de l'expression de Vangl1 en fonction de l'index de prolifération

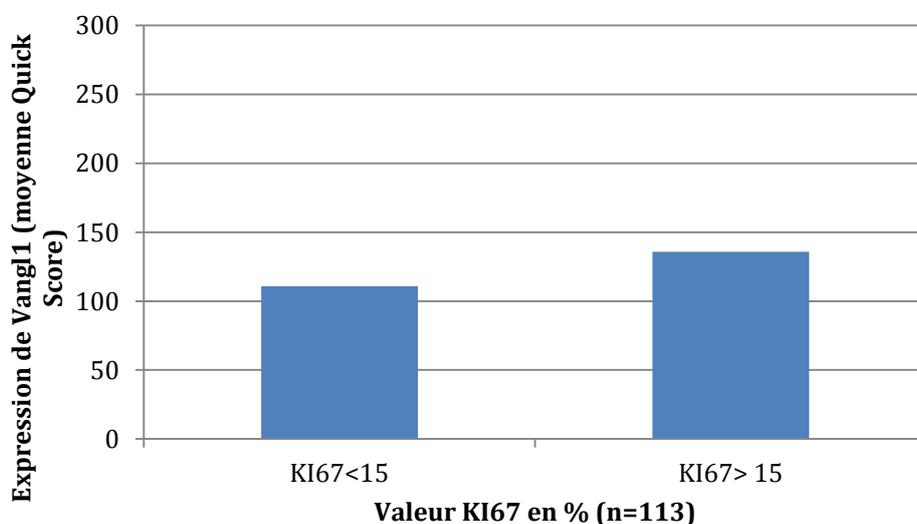


Figure 39 : Variation de l'expression de Vangl1 en fonction de l'index de prolifération

B- Etude de Vangl 1 chez la souris

1- Etude de la cross-réactivité des anticorps monoclonaux anti-Vangl1 chez la souris

Cette étude a été réalisée sur des coupes d'embryon de souris à J15,5 inclus en paraffine. Les quatre clones anti-Vangl1 ont de nouveau été testés : **19D5, 20G9, 3D1 et 7G6** (Figure 40).

Suite à cela, nous avons pu conclure que les deux clones spécifiques chez l'homme, le 19D5 et le 20G9, ne présentent pas de cross-réactivité chez la souris puisque aucun marquage n'est observable. Les mêmes conclusions ont été tirées des résultats obtenus par Western Blot et par Immunoprécipitation.

Cependant les clones 3D1 et 7G6, non spécifiques chez l'homme, présentent une cross-réactivité. En effet, on observe un marquage de différentes structures de l'embryon, avec un profil similaire pour les deux clones, on peut citer comme exemple (Figure 41):

- Le nez : les follicules pileux sont fortement marqués (cellules souches essentiellement) ainsi que l'épithélium nasal
- Les glandes salivaires également fortement marquées
- Les vaisseaux au niveau épithélial et endothélial
- Marquage apical et jonctionnel de l'épithélium bronchique

- Marquage très fort du colon au niveau du pôle apical des cellules
- Fort marquage des glomérules rénaux (vasculaire essentiellement), épithélium rénal et tubules également positifs

Ces observations sont également en accord avec les résultats obtenus par Western Blot et immunoprécipitation par une étudiante en thèse du laboratoire. La spécificité du marquage par ces deux clones anti-Vangl 1 chez la souris reste tout de même à démontrer.

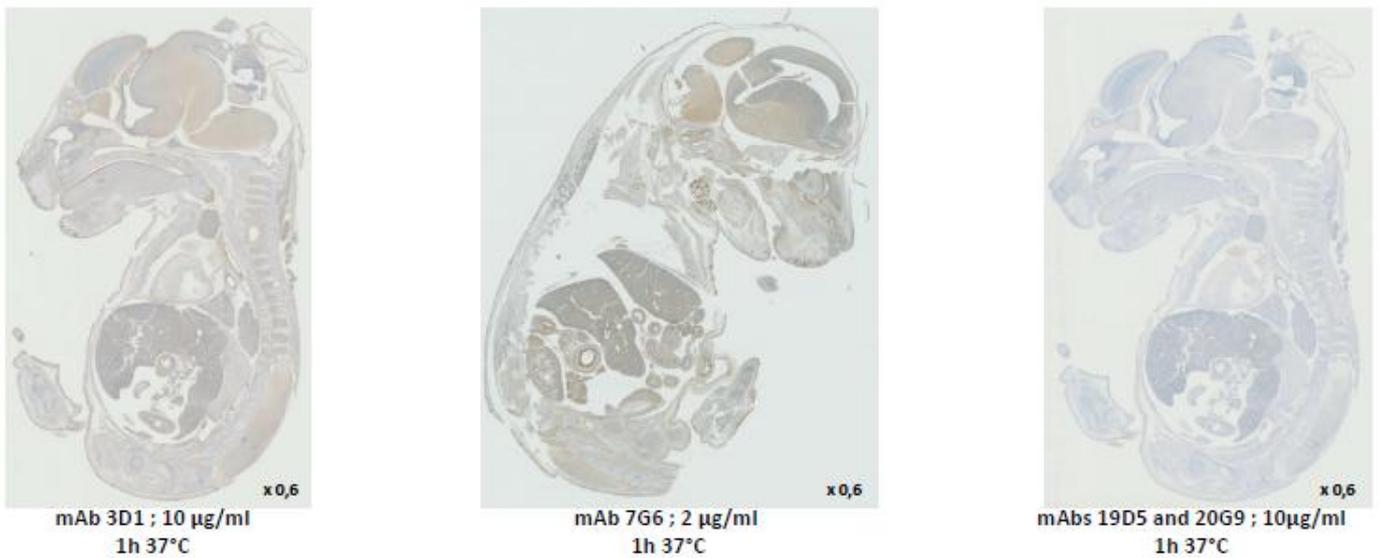


Figure 40: Etude de la cross-réactivité des clones anti-Vangl1 chez la souris

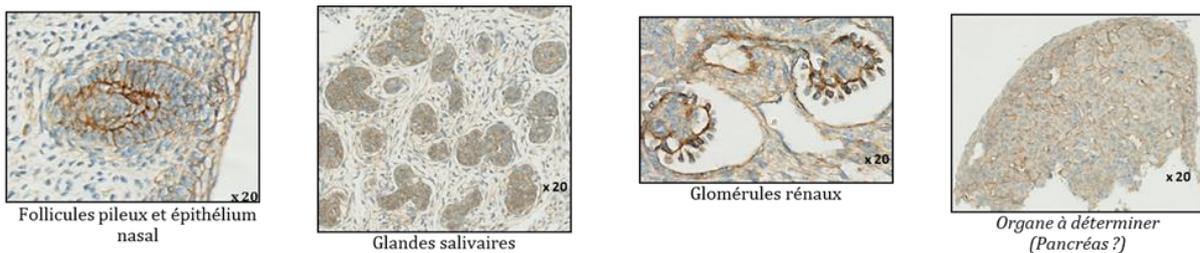


Figure 41 : Focus sur quelques structures embryonnaires fortement marquées chez la souris (Clone 3D1)

2- Etude de la spécificité du marquage des clones anti-Vangl1 en IHC

Concernant l'étude de la spécificité, plusieurs méthodes ont été possibles. Ces dernières ont donc été réalisées uniquement pour les clones 3D1 et 7G6 présentant une cross-réactivité chez la souris.

a- Modèles murins KO Vangl1

Les embryons de souris KO Vangl1 ne sont pas viables, cependant un laboratoire aux Etats-Unis a pu obtenir un tissu murin KO conditionnel pour Vangl1 et Vangl 2. Il s'agit de modèles biologiques au sein desquels le gène cible a pu être spécifiquement inactivé dans des tissus spécifiques (ici l'utérus). Ces tissus inclus en paraffine nous ont été envoyés par ce laboratoire, nous permettant de tester les deux clones présentant une cross-réactivité en IHC.

Dans ce cas, il s'est posé la question de l'expression de Vangl 1 au niveau de l'utérus murin. En effet, après avoir réalisé une gamme de concentration des deux clones sur les tissus WT et KO Vangl1, nous avons pu observer une disparition du marquage sur les deux tissus à la même concentration (Figure 42). Cela suggère que, soit les clones ne permettent pas d'obtenir un marquage spécifique de Vangl1 malgré que celui-ci semble l'être chez l'embryon, soit que Vangl 1 n'est pas exprimé dans l'utérus murin et donc que ce que l'on peut observer correspond à une accroche non spécifique des anticorps dû à une concentration trop élevée.

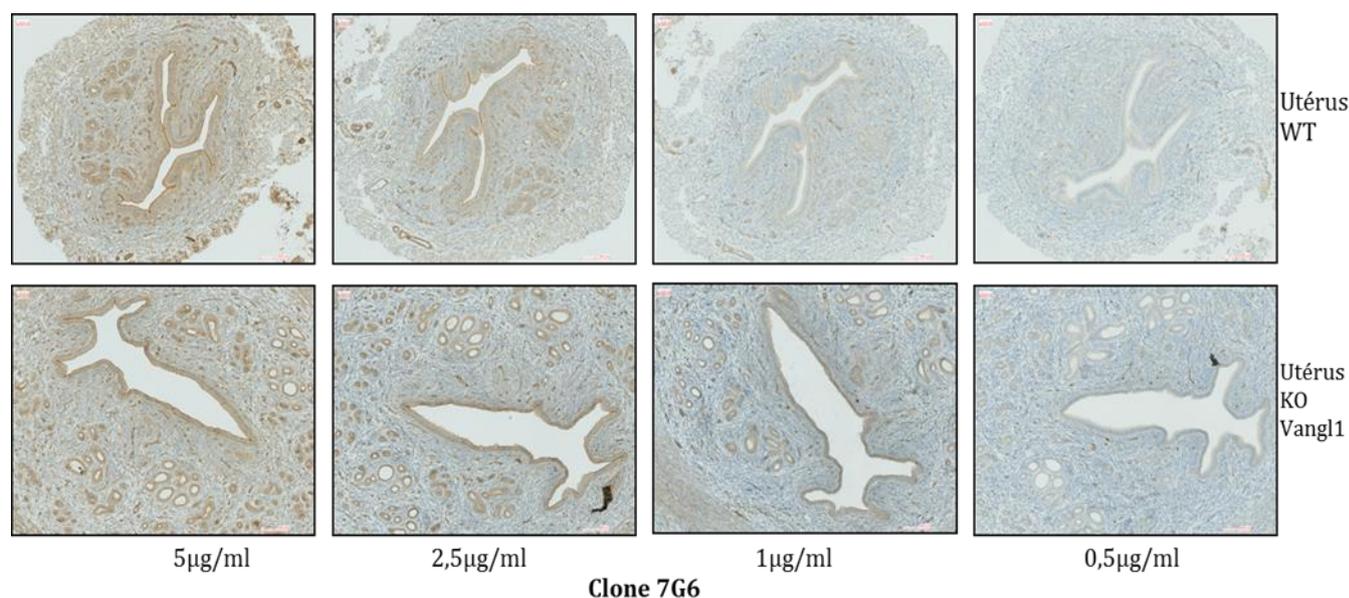


Figure 42 : Etude de la spécificité du marquage des clones anti-Vangl1 chez la souris (ici clone 7G6) - Modèle murin KO Vangl1

b- Epreuve de compétition

Les anticorps monoclonaux anti-Vangl1 ont été produits par immunisation des souris à l'aide d'un peptide issu de la région N-terminal de Vangl1. Une autre possibilité a été de réaliser une épreuve de compétition sur les coupes d'embryons de souris entre le peptide et la protéine

présente dans le tissu embryonnaire. En cas de spécificité, l'anticorps devrait se fixer au peptide présent en excès et non sur le tissu : il ne devrait donc pas y avoir de marquage sur l'embryon.

Cependant, un problème technique ne nous a pas permis de conclure sur la spécificité des clones par cette méthode. En effet, nous avons pu observer une accroche non souhaitée du peptide sur le tissu embryonnaire induisant un résultat non interprétable.

C- Etude de Vangl 2 chez l'homme

Suite aux résultats obtenus en 2010, nous avons tout d'abord cherché à reproduire le marquage en utilisant deux anticorps monoclonaux anti-Vangl2 : 2G4 et 36E3. Pour cela, nous avons à disposition un panel de xénogreffes dérivés de patients inclus en paraffine dont l'expression de Vangl2 a été déterminée par Western Blot en 2010(132).

De nombreuses conditions ont été testées, faisant intervenir différentes concentrations ainsi que différents types de démasquage des sites antigéniques cela sans pouvoir obtenir de marquage (Figure 43).

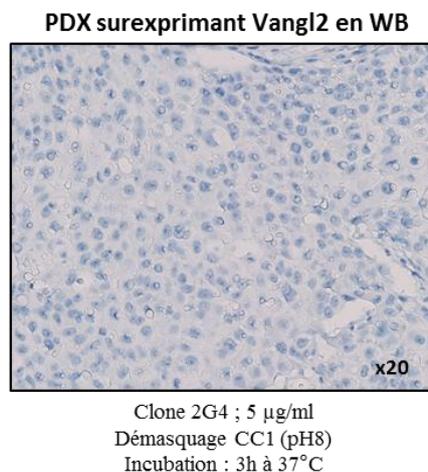


Figure 43 : Essai de mise en évidence de Vangl 2 par IHC sur PDX incluse en paraffine

Cela nous a conduit à remettre en question la qualité des tissus utilisés notamment l'expression de la cible mais également l'efficacité des clones anti-vangl2 en immunohistochimie.

Suite aux difficultés rencontrées nous avons pris la décision de reprendre la mise au point des clones sur culots cellulaires ARPE19 (cellules humaines de rétine exprimant naturellement Vangl2) et de tester également différents lots d'anticorps purifiés ainsi qu'une ascite 2G4 et une ascite 36E3.

Les différents lots d'anticorps monoclonaux purifiés et d'ascites non purifiés ont alors été testés sur une lignée ARPE19 *wild type* ainsi que sur une lignée KO Vangl2 incluses en paraffine selon un protocole classique sans obtenir de résultat (Figure 44).

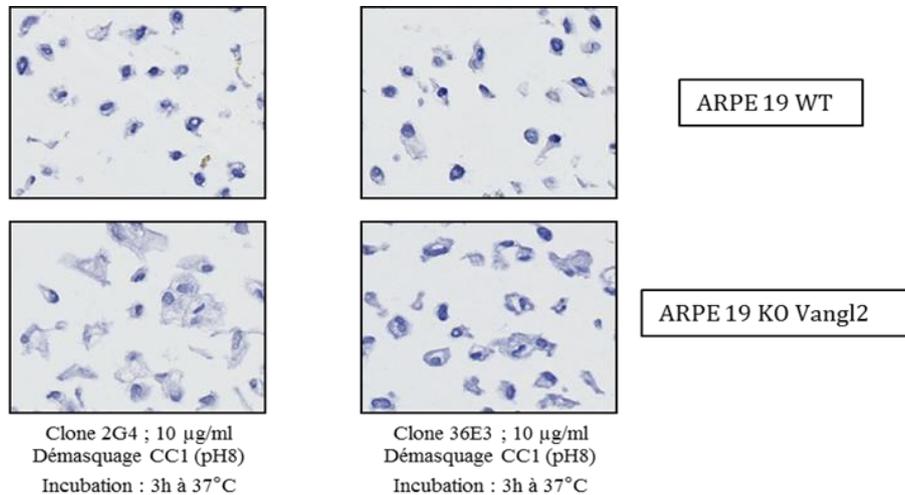


Figure 44 : Essai de mise en évidence de Vangl2 par IHC sur culots cellulaires inclus en paraffine

Par la suite, nous avons cherché à nous rapprocher le plus possible du protocole qui avait été utilisé en 2010. Cela a d'abord nécessité une transposition du protocole du système robotisé *Dako* au *Ventanadiscovery XT*. Le protocole présente différentes étapes particulières :

1. Une étape de déparaffinage supplémentaire à l'aide d'un *autostainer XL Leica*
2. Une étape au *PTlink (Dako)* réalisant également un déparaffinage mais aussi le démasquage des sites antigéniques à pH9
3. Une étape de blocage des sites antigéniques non spécifiques pendant 1h par l'utilisation de *Protein Block* avant le dépôt de l'anticorps primaire incubé 1h à 37°C
4. Utilisation d'un anticorps secondaire Lapin anti-Rat reconnu par un troisième anticorps anti-Lapin couplé à l'HRPafin d'amplifier le signal.

Pour commencer, les différents lots d'anticorps monoclonaux purifiés ont été testés avec ce protocole sur les mêmes lignées cellulaires ARPE19 que décrites précédemment.

Suite à ce protocole, différentes observations ont pu être faites selon les lots d'anticorps purifiés utilisés (Figure 45):

- (i) Les trois lots du clone 36E3 ainsi que le lot n°1 du clone 2G4 présente un profil similaire. On constate la présence d'un marquage des culots cellulaires à une

concentration de 10µg/ml mais qui n'est pas spécifique de Vangl2 puisque celui-ci est similaire sur la lignée ARPE19 n'exprimant pas Vangl2.

- (ii) Le lot n°2 du clone 2G4, produit par mon laboratoire, à la même concentration (10µg/ml), ne permet pas d'obtenir de marquage. Un marquage est observable à la concentration de 25µg/ml mais celui-ci reste tout de même relativement faible. De plus, comme décrit précédemment, le marquage n'est pas spécifique en IHC chez l'homme. Cela est probablement dû à un manque de sensibilité de ce lot d'anticorps qui va alors présenter des difficultés pour atteindre la cible

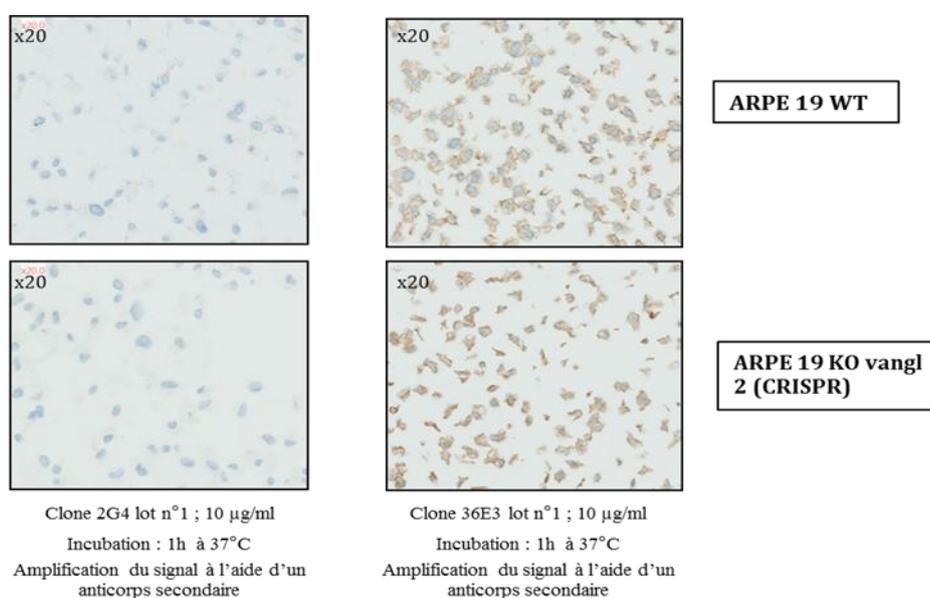


Figure 45 : Essai de mise en évidence de Vangl2 par IHC sur culot cellulaire inclus en paraffine (protocole de 2010)

En 2010, les clones anti-vangl2 n'avaient pas été testés sur un contrôle négatif car les technologies permettant de supprimer l'expression d'une protéine au sein d'une lignée cellulaire n'étaient pas disponibles au laboratoire. Nous avons donc dû remettre en question la qualité et la spécificité du signal qui avait été obtenu.

Pour cela, nous avons reproduit la manipulation avec le même protocole sur une coupe de PDX sur-exprimant Vangl2 en western blot et sur une coupe de tumeur du sein basale (sous-type de cancer du sein sur-exprimant Vangl2). Sur PDX, nous avons pu observer un marquage dans l'ensemble négatif avec quelques zones faiblement positives mais également plus de bruit de fond au niveau des zones nécrotiques (Figure 46A).

Concernant la tumeur basale, on observe également un marquage négatif sur la majeure partie du tissu tumoral à l'exception d'une petite zone. On observe également une accroche sur le tissu séreux sain (Figure 46B).

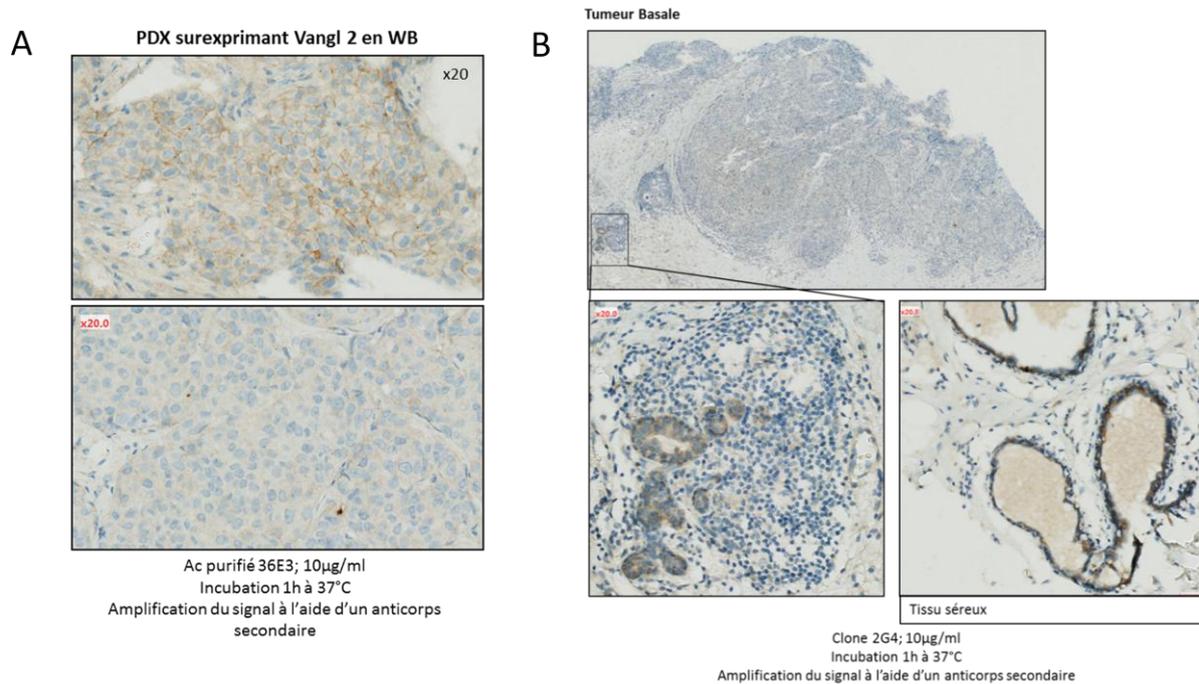


Figure 46 : Reproduction du protocole utilisé en 2010 pour mettre en évidence Vangl2 (A) sur PDX ; (B) sur tumeur basale

Cette expérimentation permet donc de confirmer le manque de spécificité du marquage par les clones purifiés anti-Vangl2 puisqu'on observe une accroche sur les cellules non tumorales. De plus, ces clones manquent également de sensibilité pour la cible du fait d'un marquage globalement négatif sur des tissus dont on sait qu'ils expriment Vangl2.

Les anticorps purifiés anti-Vangl2 2G4 et 36E3 ne semblent donc pas être de bons candidats pour une exploitation en IHC chez l'homme. Nous avons tout de même décidé d'étudier ces anticorps sur le plan immunohistochimique chez la souris ce qui pourrait permettre une utilisation sur des modèles tumoraux murins.

D- Etude de Vangl2 chez la souris

1- Etude de la spécificité du marquage des clones anti-vangl 2 chez la souris en IHC

Afin de démontrer la spécificité du marquage des anticorps monoclonaux purifiés anti-Vangl 2 chez la souris, nous avons utilisé l'utérus murin sauvage (*wild type*), l'utérus KO conditionnel Vangl1 ainsi que l'utérus KO conditionnel Vangl1/Vangl2 inclus en paraffine décrit

précédemment (cf. modèles murins KO Vangl1). L'ensemble des lots disponibles pour les clones 2G4 et 36E3 a été testé selon le protocole spécifique utilisé en 2010.

Suite à cela, nous avons pu observer un marquage membranaire important de l'épithélium utérin *wild type*. Pour l'ensemble des lots de chaque clone, ce marquage n'est plus présent sur l'épithélium utérin KO Vangl1/2 (Figure 47). Afin de s'assurer que les anticorps monoclonaux fixent uniquement Vangl2 et non Vangl1, nous avons testé les clones sur l'utérus KO conditionnel Vangl1. Le marquage de l'épithélium utérin KO Vangl1 étant similaire au marquage de l'épithélium *wild type* (Figure 48), cela nous a permis de conclure à une spécificité des clones pour Vangl 2 chez la souris.

Cependant, nous avons également pu conclure à une meilleure spécificité du lot n°2 du clone 2G4 pour Vangl 2. En effet, pour le lot n°1 et le clone 36E3, on observe un bruit de fond plus important dans l'endothélium utérin *wild type* et KO.

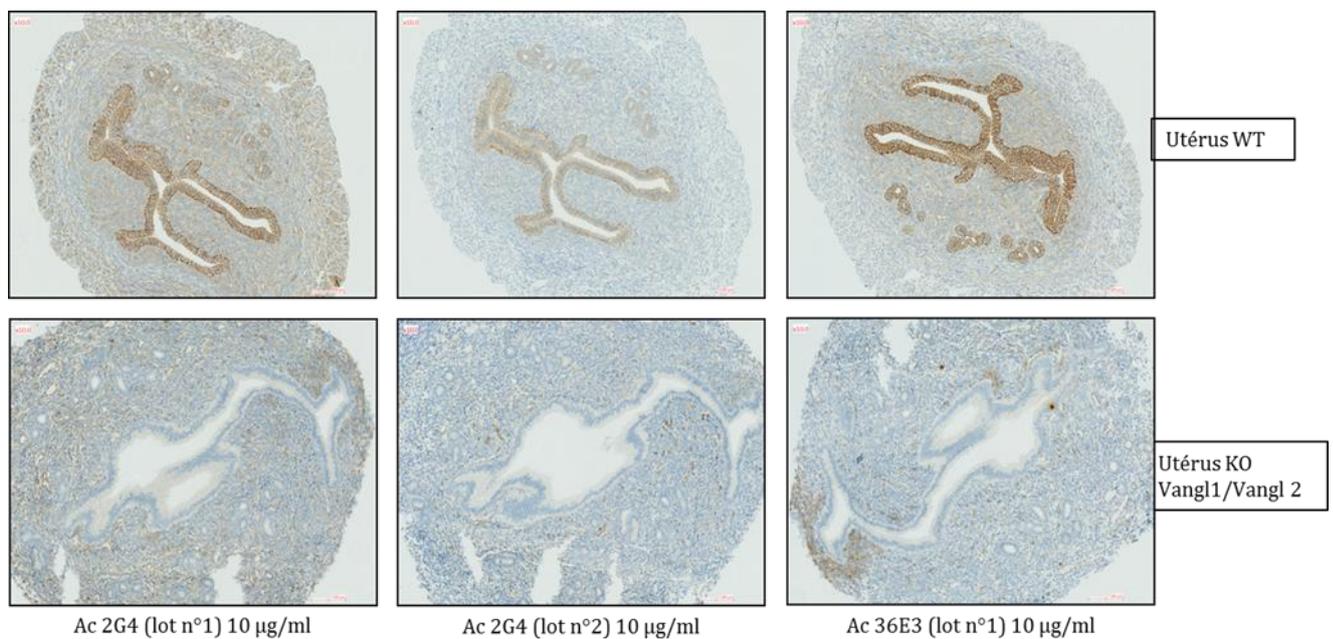


Figure 47 : Etude de la spécificité du marquage des clones purifiés anti-Vangl2 chez la souris en IHC

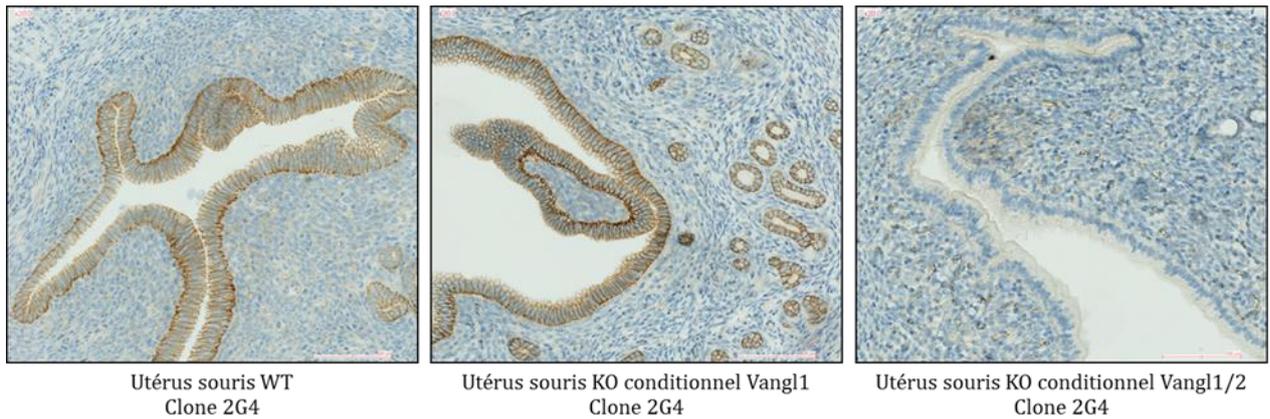
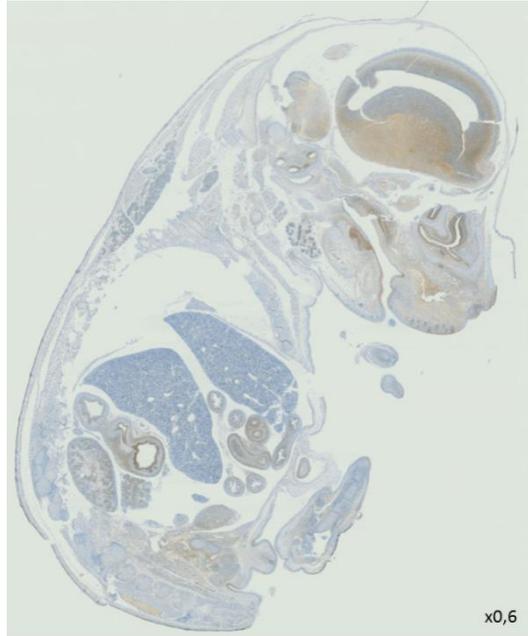


Figure 48 : Etude de la spécificité du marquage des clones purifiés anti-Vangl2 chez la souris (2) - Clone 2G4 lot n°2

2- Etude de l'expression de Vangl2 chez l'embryon de souris (inclus en paraffine) par IHC (Figure 49)

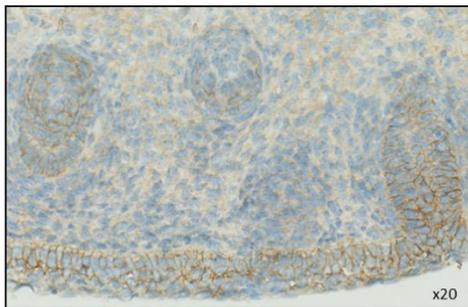
La spécificité du marquage chez la souris étant démontrée, nous avons voulu étudier le profil d'expression de Vangl2 chez l'embryon de souris en utilisant le protocole décrit précédemment. Nous avons pu observer un marquage spécifique jonctionnel au niveau mésenchymal et épithélial de certaines structures (Figure 50) telles que :

- L'épithélium nasal ainsi que les follicules pileux
- L'épithélium bronchique
- Les glandes salivaires
- L'épithélium intestinal
- Le rein
- Le cerveau
- L'épithélium buccal

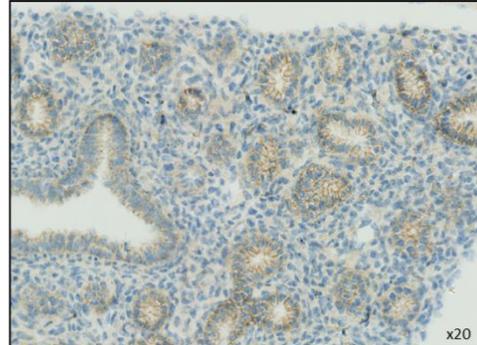


Clone 36E3 ; 10 µg/ml
 Démasquage des sites antigéniques à pH9
 Incubation 1h à 37°C et amplification du signal à l'aide d'un anticorps secondaire

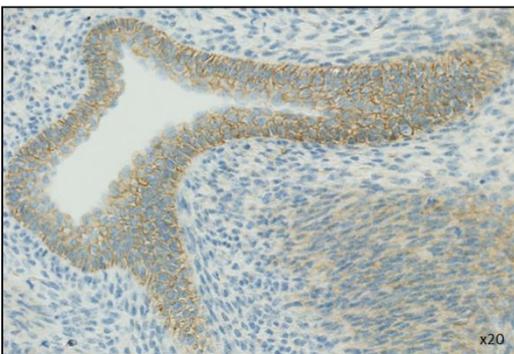
Figure 49 : Etude de l'expression de Vangl2 chez l'embryon de souris inclus en paraffine



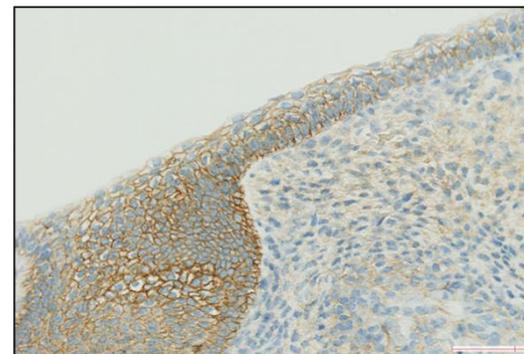
Follicules pileux et épithélium nasal



Epithélium bronchique



Epithélium intestinal



Epithélium buccal

Clone 36E3 ; 10µg/ml
 Démasquage des sites antigéniques à pH9
 Incubation 1h à 37°C et amplification du signal à l'aide d'un anticorps secondaire

Figure 50 : Focus sur certaines structures embryonnaires de la souris exprimant Vangl2 en IHC

IV- DISCUSSION ET CONCLUSION

L'objectif de cette étude était de développer des conditions en IHC validées pour des anticorps monoclonaux purifiés anti-Vangl1 et anti-Vangl2 dans le but de définir leur profil d'expression dans le cancer du sein. Pour cela, il a fallu caractériser ces anticorps sur le plan immunohistochimique (spécificité et sensibilité) avant de démarrer l'étude sur tissus tumoraux.

Concernant Vangl1, la caractérisation des anticorps monoclonaux purifiés anti-Vangl1 à disposition a permis de définir différents profils en IHC :

Anticorps	Réactivité sur cellules/tissus humains	Cross-réactivité sur la souris
19D5	<ul style="list-style-type: none">• Culots cellulaires (cellules MCF7)• Xénogreffes dérivés de patients• Seins tumoraux	Non
20G9	<ul style="list-style-type: none">• Culots cellulaires (MCF7) <p>➔ Mauvaise sensibilité sur tissus</p>	Non
3D1	Pas de spécificité	Embryon de souris
7G6	Pas de spécificité	Embryon de souris

Seul un clone a donc pu être utilisé pour réaliser l'étude chez l'Homme : le 19D5. Après un travail de mise au point sur xénogreffes et tissus de tumeurs du sein nous avons pu définir des conditions d'IHC reproductibles et fiables. De ce fait, nous avons ensuite pu réaliser une étude de l'expression de Vangl1 sur un panel plus important de tumeurs du sein à l'aide d'un *Tissue MicroArray*. Cela nous a permis de confirmer l'absence de surexpression de Vangl1 et de variation significative de cette expression selon le sous-type de cancer du sein.

Cependant, nous n'avons pas pu montrer de variation significative de l'expression de Vangl1 en fonction du statut prolifératif. Ce dernier résultat reste tout de même à confirmer, en effet, l'estimation de l'index Ki67 est complexe et son expression est retrouvée tout au long des différentes phases du cycle cellulaire (excepté la phase G0 où les cellules ne se divisent pas). Cela reste tout de même cohérent avec les résultats d'expression en fonction du sous-type de cancer. En effet, si Vangl 1 était un marqueur de prolifération on pourrait observer une forte diminution de son expression dans le sous-type luminal A qui est par définition non prolifératif, ce qui n'est pas le cas.

Chez l'embryon de souris, deux clones présentent une cross-réactivité : le 3D1 et le 7G6. Cependant la spécificité du marquage reste encore à démontrer. En effet, l'épreuve de

compétition n'a pas été réalisable et l'utilisation de tissus de souris KO conditionnel pour Vangl 1 n'a pas permis l'obtention de résultat concluant. Une troisième méthode peut être réalisée et consiste en la réalisation d'IHC avec ces deux clones sur culots cellulaires IMCD3 (cellules murines exprimant Vangl1 naturellement) *wild type* et KO Vangl1. Les cellules IMCD3 KO Vangl1 seront disponibles prochainement au laboratoire grâce à l'utilisation de la technique siRNA. Cela permettra ou non de confirmer la spécificité du marquage des clones 3D1 et 7G6 chez la souris.

Concernant Vangl2, l'objectif principal du projet n'a pas été atteint puisque aucun des deux anticorps mis à ma disposition n'a pu être validé chez l'homme. Bien que des résultats positifs aient été obtenus en 2010 par le laboratoire, nous avons pu mettre en évidence grâce à la technologie CrispR désormais disponible au laboratoire un manque de spécificité pour Vangl2 de ce marquage par IHC. De nouveaux anticorps monoclonaux purifiés anti-Vangl2 pourront, de ce fait, être produits pour une application en IHC, ceci permettant de confirmer la surexpression de Vangl 2 dans le cancer du sein de type basal mis en évidence par western blot et d'étudier l'intérêt de son développement en tant que biomarqueur et cible thérapeutique.

Cependant, l'étude de Vangl2 chez la souris nous a permis d'observer une bien meilleure spécificité du marquage et également une meilleure sensibilité des anticorps purifiés anti-Vangl2 : 2G4 et 36E3.

Nous avons pu constater une meilleure spécificité du marquage pour un des lots du clone 2G4 anti-Vangl 2. Cette différence entre deux lots d'un même clone peut, entre autre, s'expliquer par le fait qu'ils n'aient pas été purifiés dans les mêmes conditions. La purification des anticorps monoclonaux est réalisée par chromatographie d'affinité avec la protéine A ou la protéine G (protéines de source bactérienne) ayant la capacité de se fixer à la région constante des anticorps. La qualité et la propreté de la colonne peuvent donc influencer sur la purification.

Nous avons tout de même pu développer des conditions validées et reproductibles en IHC pour ces deux clones chez la souris. Cela pourra permettre une utilisation sur des modèles tumoraux murins qui reste indispensable à la réalisation d'études dans un milieu complexe relativement proche de celui rencontré chez l'homme et permettant notamment une meilleure compréhension des mécanismes de dissémination métastatique.

Le développement des biomarqueurs ainsi que des traitements de thérapies ciblées doit permettre d'envisager une médecine dite « personnalisée » dans le but d'augmenter l'efficacité et la tolérance au traitement. Dans notre cas, les patients seraient sélectionnés sur la base d'un test immunohistochimique optimisé et fiable. Mais il sera alors essentiel de développer des techniques de détermination du statut complémentaires pour les cas intermédiaires (1+/2+) telles que la PCR (Polymerase Chain Reaction) ou l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) pour définir les patientes susceptibles de recevoir le traitement adapté.

Concernant des perspectives plus générales, l'intérêt de s'intéresser aux protéines Vangls en tant que biomarqueurs pourraient également être explorées dans d'autres types de cancer. Dans diverses lignées cellulaires tumorales (par exemple du côlon, de l'estomac, de la tête et du cou, hépatocellulaire et carcinome spinocellulaire de la cavité buccale), la suppression de l'expression de Vangl 1 va produire différents phénotypes, incluant une réduction de la prolifération cellulaire, de l'invasion et de la croissance des xénogreffes(139–143). Vangl 1 est également connu pour interagir avec un suppresseur de métastase (CD82) dans le cancer du côlon bien que la fonction de cette interaction ne soit pas encore complètement élucidée(144). Vangl 2 est également surexprimé avec d'autres composants de la PCP dans la leucémie lymphoïde chronique(145).

Validation

La validation d'un biomarqueur à visée pronostique se déroule en 3 étapes :

1. La **validation analytique** du test utilisé pour l'identification et/ou le dosage du biomarqueur. Il s'agit d'une exigence essentielle pour l'utilisation du biomarqueur en pratique clinique.
2. La **validation clinique**. Elle permet de s'assurer que le biomarqueur en question est associé à une maladie ou à un critère clinique particulier.
3. Enfin, **l'utilité clinique** doit être démontrée à travers la détermination du LOE (Level of Evidence) pour permettre une recommandation en routine.

I- VALIDATION ANALYTIQUE

La validation analytique doit permettre de s'assurer de la reproductibilité et de la stabilité du dispositif médical de diagnostic *in vitro* (DMDIV) mais également de la sensibilité pour détecter le biomarqueur d'intérêt dans l'échantillon étudié. De plus, afin d'assurer une reproductibilité inter-laboratoire, il est essentiel d'étudier le test au cours d'une évaluation externe de la qualité (EEQ).

A- Contrôle de qualité interne (CIQ) d'une méthode quantitative

La norme NF EN ISO 15189 précise que : « Le laboratoire doit concevoir des systèmes de contrôle interne de la qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue. Il est important que ce système de maîtrise permette aux membres du personnel d'obtenir des informations claires et faciles à comprendre sur lesquelles baser leurs décisions techniques et médicales. »

Le CIQ est réalisé au sein d'un même laboratoire à l'aide d'échantillons de contrôle lors de la mesure d'échantillons biologiques de patients afin de vérifier la maîtrise du processus analytique et les performances de la méthode. Ce contrôle est dépendant du fournisseur du couple réactif/analyseur pour le cas des DMDIV. C'est ce dernier qui va distribuer les matériaux de contrôle interne de qualité mis au point et fabriqué spécifiquement pour

l'évaluation du DMDIV. Mais l'institution pourra également constituer ses propres échantillons dont l'interprétation devra être basée sur les mêmes règles que celles des CIQ.

Le CIQ va permettre de contrôler la fidélité intermédiaire ou reproductibilité intra-laboratoire. Les résultats des CIQ sont analysés périodiquement pour vérifier que la technique est reproductible dans des conditions normales d'utilisation prenant en compte les facteurs tels que l'opérateur, le temps, les lots de réactifs...

Les résultats de CIQ externalisées permettront également de constituer une approche de la justesse. L'étude de la justesse permet d'évaluer l'étroitesse de l'accord entre la moyenne de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence, l'écart observé correspondant au biais.

L'association de ces deux critères permet d'estimer l'incertitude de mesure qui peut être intégrée au processus d'interprétation et de la prestation de conseil. Son évaluation prend en compte les erreurs aléatoires (défaut de fidélité) et les erreurs systématiques (erreur de justesse).

Enfin, la sensibilité de la méthode devra également être étudiée dans le but de définir l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations du biomarqueur d'intérêt.

B- Evaluation externe de la qualité (EEQ) d'une méthode quantitative

L'EEQ est une procédure permettant d'évaluer les performances d'un laboratoire par le biais d'une comparaison inter-laboratoires. Pour l'EEQ, la participation au Contrôle National de Qualité est obligatoire. L'utilisation et la gestion des contrôles de qualité permettent d'assurer la qualité de l'examen et la fiabilité du résultat.

Les résultats des EEQ vont permettre une approche de l'exactitude. L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. Cette étude correspond à la comparaison du résultat d'une seule analyse d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle. Pour que cette évaluation soit pertinente, le nombre de participants à l'EEQ doit être suffisant (supérieur à 30 si possible). L'exploitation des résultats peut également contribuer à l'estimation de l'incertitude de mesure.

Les résultats doivent faire l'objet de revue afin d'apporter si nécessaire des mesures correctives ou commentaires en cas d'anomalie. Toute anomalie nécessite une gestion

d'actions curatives et/ou correctives tracées sur une fiche de non-conformité. Les anomalies entraînant un risque majeur pour la santé des patients devront faire l'objet d'un signalement à l'ARS.

Lorsqu'il n'existe pas d'EEQ organisée et pertinente, le laboratoire doit mettre en place d'autres moyens d'évaluation de l'exactitude tels qu'une comparaison avec d'autres laboratoires avec un échange d'échantillons ou une comparaison avec une méthode de référence.

C- Maîtrise de la qualité d'une méthode de type qualitative

Dans le cas des méthodes qualitatives, la maîtrise des résultats et du processus analytique est plus complexe et nécessite la mise en œuvre de moyens supplémentaires au CIQ et EEQ car les sources de variations sont plus nombreuses. Le laboratoire va établir des critères de performance de la méthode utilisée et pourra les comparer aux données de référence dont il dispose.

Dans ce contexte, il sera indispensable de :

- Maîtriser les compétences du personnel notamment en procédant à une habilitation obligatoire et en réévaluant les compétences périodiquement.
- Maîtriser les conditions environnementales
- Maîtriser de manière continue les équipements
- Maîtriser l'échantillon primaire
- Maîtriser la méthode notamment en utilisant des témoins positifs et négatifs afin de valider le processus concerné.
- Maîtriser les réactifs. Pour cela, le laboratoire devra les tester à chaque changement de lot afin de vérifier leur conformité aux spécifications

La vérification d'une méthode qualitative passe également par l'évaluation de la spécificité. La spécificité d'une méthode représente son aptitude à identifier l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon. Cette dernière peut être déterminée par exemple par comparaison des résultats obtenus avec l'analyte seul et avec l'analyte additionné de substances pouvant provoquer des interférences.

II- VALIDATION CLINIQUE

La validité clinique est définie comme la capacité de l'examen à identifier d'une manière précise et reproductible un sous-groupe à risque de patients, ou de prévoir une évolution clinique liée ou non à un traitement.

Au cours de l'année 2000, le NCI-EORTC (US National Cancer Institute and the European Organisation for Research and Treatment of Cancer) s'est réuni afin de discuter des enjeux et des obstacles de la recherche dans le cancer. Cette réunion a, entre autre, permis de mettre en évidence une mauvaise organisation ainsi qu'une mauvaise analyse des études réalisées sur les nouveaux marqueurs tumoraux conduisant dans de nombreux cas à des résultats contradictoires non fiables. Il a alors été jugé indispensable d'établir des lignes directrices à la réalisation de ces études, une guideline a donc été réalisée par McShane et al(146). La guideline REMARK (REporting recommandations for tumor MARKer prognostic studies) développée est, de plus, particulièrement adaptée aux biomarqueurs à visée pronostique. Les principaux points de cette guideline, organisés en quatre axes (Introduction, Matériels&Méthodes, Résultats et Discussion) de manière similaire aux articles scientifiques, vont être présentés dans la suite de cette partie.

A- Introduction

Point n°1 - Indiquer le marqueur étudié, les objectifs de l'étude ainsi que toutes les hypothèses préétablies.

La description du biomarqueur doit présenter ses aspects biologiques (type de la molécule/structure étudiée et les caractéristiques évaluées) mais également son positionnement dans la prise en charge du patient (diagnostic, pronostic, suivi thérapeutique..). Concernant les biomarqueurs à visée pronostique, les objectifs consistent le plus souvent à étudier l'influence du biomarqueur sur l'évolution clinique du patient.

Les hypothèses peuvent être nouvelles car générées par les données de l'étude ou préétablies, c'est-à-dire issues de la littérature existante ou du fait de la compréhension du mécanisme biologique. Dans les deux cas, elles doivent être formulées de manière à pouvoir être approuvées ou réfutées par une analyse statistique.

B- Matériels et méthodes

1- Les patients

Point n°2 : Décrire les caractéristiques des patients inclus dans l'étude, notamment la source ainsi les critères d'inclusion et d'exclusion

L'utilisation d'un facteur pronostique s'adresse le plus souvent à une population spécifique. Il est donc indispensable de décrire la population concernée afin de définir le contexte clinique. Les critères d'éligibilité sont, le plus souvent, basés sur les caractéristiques cliniques et pathologiques des patients. On peut citer, par exemple, le site tumoral, le stade, l'âge, la prise d'un traitement en particulier ou le type histologique. Il sera également important de définir les critères d'exclusion et ce, avant le début de l'étude afin d'éviter tout biais potentiel.

Point n°3 : Décrire les traitements reçus et les protocoles utilisés

L'évolution clinique du cancer dépend à la fois de l'agressivité de la tumeur mais également d'une réponse éventuelle à une thérapie. Idéalement, les études devraient être réalisées chez des patients ne recevant aucun traitement afin de prendre en compte uniquement les caractéristiques intrinsèques à la tumeur. Cela n'étant éthiquement pas possible, la majeure partie des patients présentant une tumeur solide reçoivent une thérapie loco-régionale (ex : chirurgie) associé ou non à une thérapie systémique. Dans ce contexte, il est conseillé de standardiser le traitement des patients inclus dans l'étude, ou éventuellement de réaliser plusieurs groupes de patients, car une différence de traitement peut avoir un impact sur l'évolution de la maladie. Dans le cas des études rétrospectives pour lesquelles le traitement n'est pas toujours connu, il est essentiel d'en tenir compte dans l'interprétation des résultats de l'analyse.

2- Caractéristiques de l'échantillon

Point n°4 : Décrire le matériel biologique utilisé, les méthodes de préservation et de stockage.

Les études de marqueurs pronostics sont le plus souvent réalisées sur des échantillons de tissus tumoraux (FFPE ou congelé), de cellules tumorales ou d'ADN tumoral isolé à partir du sang, de la moelle osseuse, de l'urine, du sérum... Le mode d'obtention de l'échantillon doit être précisé dans la mesure du possible (ex : chirurgie, biopsie...) ainsi que son origine

(tumeur primaire, métastase) mais également les traitements subis par l'échantillon (ex : fixation, utilisation d'anticoagulants...).

Le plus souvent, les études sont réalisées un certain temps après la collecte. Cependant, le temps et le mode de conservation peuvent altérer la qualité de l'échantillon. C'est le cas par exemple des tissus FFPE, utilisés en IHC, qui perdent leur antigénicité avec le temps. Les critères d'acceptabilité des échantillons concernant la collecte, le procédé et le stockage doivent être définis avant de commencer l'étude(147,148). La guideline *The Biospecimen Reporting for Improved Study Quality* (BRISQ) apporte des recommandations complémentaires sur ce point(149).

De plus, il est également important de définir les critères d'acceptabilité (par exemple : % de viabilité cellulaire, % de cellules tumorales...) des échantillons utilisés au cours de l'étude et ce en amont de l'étude afin d'éviter tout biais possible.

Les échantillons biologiques « contrôle » utilisés devront être décrits de façon similaire.

3- Méthodes de l'essai

Point n°5 : Spécifier la méthode de l'essai utilisé et fournir un protocole détaillé, incluant les réactifs spécifiques ou kits utilisés, les procédures de contrôle qualité, l'évaluation de la reproductibilité, les méthodes de quantification, et les protocoles de score et de rapport. Dans le cas d'une étude à l'aveugle (évolution clinique non connue), spécifier son protocole.

La description de la méthode utilisée au cours de l'étude doit fournir assez de détails pour permettre à d'autres laboratoires de reproduire l'étude sans biais.

4- Conception de l'étude

Point n°6 : Indiquer la méthode de sélection des patients en précisant s'il s'agit d'une étude prospective ou rétrospective et s'il s'agit d'une étude stratifiée ou appariée (par exemple par stade de la maladie ou par âge). Préciser la période à partir de laquelle les cas ont été sélectionnés, la fin de la période et la durée moyenne de suivi.

La fiabilité de l'étude dépend essentiellement de sa conception, il est donc essentiel de décrire le mode de recrutement et de sélection des patients mais également comment et quand les données cliniques, pathologiques et de suivi des patients ont été collectées car cela peut avoir des implications non négligeables sur l'analyse et l'interprétation de l'étude.

La réalisation d'une étude prospective est préférable car elle permet l'obtention de données de meilleure qualité grâce à l'utilisation de procédure standard pour la rédaction des protocoles et le recrutement. Cependant, la majeure partie des études concernant un marqueur pronostic sera réalisée de manière rétrospective en utilisant les échantillons déjà existants et pour lesquelles des informations concernant l'évolution clinique des patients seront déjà disponibles. Cependant, ces informations cliniques seront souvent incomplètes.

La stratification des échantillons permet de s'assurer que l'ensemble des sous-groupes importants sont représentés. Mais parfois, les patients seront plutôt associés en fonction de leur évolution clinique. Il sera dans tous les cas important d'éviter l'exclusion de patients car elle constitue un biais dans l'estimation de la valeur pronostique(150).

Il est également important de placer l'étude dans un contexte historique en précisant la période de l'étude (date de début et de fin). En effet, les thérapeutiques évoluent ce qui modifie la prise en charge des patients et donc l'évolution clinique. Il peut également être utile de préciser le nombre de patients perdus de vue.

Point n°7 : Définir précisément tous les critères d'évaluation clinique étudiés

Concernant les études de marqueurs tumoraux à visée pronostique, les critères d'évaluation clinique généralement pris en compte sont le décès (quelle que soit la cause ou lié au cancer, cela devra être précisé), les récurrences à distance, les récurrences locales, la progression tumorale, une nouvelle tumeur primaire ou une réponse tumorale à un traitement. Pour certains événements comme le décès, les récurrences ou la progression tumorale, il est important d'apprécier le temps écoulé jusqu'à leur apparition. De plus, certains critères requièrent une évaluation subjective, il pourra donc être utile de préciser si l'évaluation de ces critères est réalisée à l'aveugle du statut du biomarqueur.

En complément, la guideline STEEP (the STandardizeddefinitions for Efficacy End Points) fournit des définitions standardisées des critères d'évaluation clinique pour les études réalisées dans le cadre du cancer du sein(151).

Point n°8 : Définir toutes les variables (cliniques ou pathologiques) initialement examinées ou envisagées pour l'inclusion dans les modèles.

Concernant les analyses de survie standard, toutes les variables considérées (ex : âge, statut ganglionnaire, grade, utilisation d'une thérapie adjuvante...) devraient être mesurées au plus

tard au commencement de l'étude afin de limiter les biais(152,153). Dans certains cas, il sera également recommandé de décrire la méthode de mesure.

Point n°9 : Définir la taille de l'échantillon. Si l'étude a été conçue pour détecter une taille d'effet spécifiée, donner la puissance cible et la taille de l'effet.

Pour les études de marqueurs pronostics, la détermination de la taille de l'échantillon est moins claire. Dans les cas où une taille d'effet sera recherchée, l'utilisation de calcul statistique sera nécessaire mais le plus souvent la taille de l'échantillon sera dictée par des considérations plus pratiques telles que le nombre d'échantillons disponibles ou les moyens financiers. Dans ce type d'étude, les facteurs essentiels à prendre en compte seront plutôt le nombre d'événements observés, la taille minimale pour avoir un effet détectable, la distribution du marqueur ou la méthode d'analyse. Par exemple, une étude concernant des patients ayant plutôt un bon pronostic (ex : cancer du sein luminal A) devra nécessiter un nombre d'échantillons plus important que pour une étude où les critères d'évaluation risquent d'être observés plus fréquemment (ex : cancer du sein triple négatif). La taille de l'échantillon sera donc différente selon l'objectif de l'étude mais également selon le stade de développement du biomarqueur. De manière générale, plus le biomarqueur avancera dans le processus de développement, plus il sera nécessaire de faire appel à une taille d'échantillon importante afin de prendre en compte les multiples variables associées.

5- Méthodes d'analyse statistique

10^{ème} point : Spécifier toutes les méthodes statistiques, incluant les détails concernant les procédures de sélection des variables et autres questions de construction des modèles, comment les hypothèses du modèle sont vérifiées et comment les données manquantes sont traitées.

Le principe de ce point est de permettre à toute personne compétente de pouvoir vérifier les résultats de l'étude à partir des données brutes(154). Concernant les marqueurs pronostics, de nombreuses stratégies d'analyse sont possibles mais le choix est généralement réalisé après l'obtention de données préliminaires du fait d'une analyse plus complexe.

Dans cette partie, différents aspects de l'analyse doivent être abordés et sont répartis en 8 rubriques principales :

- La préparation des données préliminaires. Cette étape de transformation préliminaire des données peut avoir un impact sur les résultats et doit donc être clairement définie.

- L'association des valeurs du marqueur avec d'autres variables. Les méthodes utilisées pour définir l'association avec les autres variables doivent être décrites.
- Les méthodes d'évaluation de l'association univariable du marqueur avec l'évolution clinique. Généralement, la première évaluation ne prend pas en compte de variables additionnelles. D'autres analyses similaires devront être conduites afin d'étudier l'association de l'évolution clinique avec les autres variables.
- Les analyses multivariées. L'utilisation de modèles multivariés afin de définir la valeur pronostique du biomarqueur est essentielle. Il sera judicieux d'utiliser la même approche que celle utilisée pour l'analyse univariable. Ces modèles pourront également être utilisés pour évaluer la valeur pronostique de différents marqueurs en combinaison (ex : signatures multigéniques).
- Les données manquantes.
- La sélection des variables.
- La vérification des hypothèses du modèle comme par exemple la distribution des variables ou les relations fonctionnelles entre les variables.
- La validation du modèle.

Point n°11 : Clarifier le traitement des données du marqueur dans l'analyse ; si besoin, décrire les méthodes de détermination des seuils utilisés.

Deux approches sont essentiellement utilisées et consistent à garder les variables comme continues ou de classer les données par catégorie (le plus commun). Cependant, on peut observer une variation considérable des seuils définis entre les différentes études ce qui rend la comparaison des résultats difficiles.

C- Résultats

1- Données

Point n°12 : Décrire le flux de patients dans l'étude, incluant le nombre de patients à chaque étape de l'analyse et les raisons en cas d'abandon. A la fois dans l'ensemble et pour chaque sous-groupe étudié, reporter le nombre de patients et le nombre d'événements.

La qualité des résultats d'une étude pronostique dépend essentiellement de la bonne compréhension des patients inclus, des méthodes utilisées, des analyses effectuées et des

données disponibles à chaque étape. Généralement, de nombreuses analyses sont réalisées et l'interprétation de l'étude peut être biaisée par la sélection des résultats communiqués.

Au cours des études rétrospectives, le nombre de patients varie souvent en fonction de la variable étudiée et du fait de données incomplètes. Cette guideline conseille alors deux méthodes pour représenter les aspects clés de l'étude :

- Un organigramme afin de représenter facilement les changements majeurs observés dans la population au cours de l'étude (ex : Représentation schématique CONSORT(155) ou STROBE(156));
- Un profil d'étude permettant de résumer les analyses effectuées et données utilisées.

McShane et al. (157) ont également développé un profil d'étude en deux parties. La première partie comprend des détails sur le marqueur d'intérêt et autres variables disponibles ainsi que sur les patients inclus dans l'étude. La deuxième partie permet, quant à elle, de donner un aperçu général de toutes les analyses réalisées au cours de l'étude afin de mieux comprendre la multiplicité des analyses et évaluer au mieux les résultats. Ces informations sont essentielles à la fiabilité statistique de l'analyse.

Point n°13 : Indiquer les distributions des caractéristiques démographiques de base (âge et sexe au minimum), les facteurs pronostics standards (spécifiques à chaque maladie) et du marqueur tumoral, y compris le nombre de valeurs manquantes.

Cette sous-partie doit permettre de caractériser le groupe de patients réellement étudié. La description détaillée de la distribution du marqueur d'intérêt est également préconisée sous la forme d'une table de fréquence, d'un graphique à barres ou en utilisant les paramètres statistiques standards par exemple.

2- Analyse et présentation

Point n°14 : Montrer la relation entre le marqueur et les variables pronostics standards

Un nouveau biomarqueur présente une utilité par rapport aux autres facteurs pronostics s'il apporte des informations supplémentaires ou s'il présente d'autres avantages comme une réduction du coût ou une utilisation plus simple. Il est important de définir la force et la nature de l'association entre le marqueur et les autres variables. Si un biomarqueur présente une corrélation très élevée avec les variables associées et n'a pas d'avantages techniques, il sera alors peu probable que celui-ci ait une valeur clinique supplémentaire. Pour qu'un marqueur

présente une valeur pronostique indépendante des marqueurs actuels, il devra montrer une variation (quelle que soit la forme) lorsque les autres sont fixes. Cette information associée à la corrélation avec l'évolution clinique, permettra alors de définir la population pouvant tirer un bénéfice de l'utilisation du biomarqueur.

Point n°15 : Présenter les analyses univariées montrant la relation entre le marqueur et l'évolution clinique, avec l'estimation de l'effet. Fournir préférablement des analyses similaires pour les autres variables étudiées. Une courbe de Kaplan-Meier est recommandée pour représenter l'effet d'un marqueur sur un événement associé au temps d'apparition.

Dans un premier temps, une représentation de l'association du marqueur avec l'évolution clinique, sans prendre en compte les autres variables, doit être présentée afin de définir la force de la valeur pronostique. Un test statistique peut accompagner la description de cette association. Les intervalles de confiance doivent être présentés afin de définir la précision et l'incertitude des estimations. Des analyses similaires devront également être réalisées pour l'ensemble des autres variables étudiées afin de confirmer les relations pronostiques attendues.

Concernant les événements dont le temps écoulé jusqu'à l'apparition est important, les courbes de Kaplan-Meier sont le plus adaptées avec la représentation d'une courbe pour chaque catégorie de patients bien que celles-ci puissent également être influencées par d'autres variables pronostics.

Point n°16 : Pour les analyses multivariées clés, reporter les effets estimés avec les intervalles de confiance pour le marqueur et, au moins pour le modèle final, toutes les autres variables dans le modèle.

Au cours d'étude de marqueurs pronostics, les caractéristiques biologiques des tumeurs ne sont pas complètement contrôlables. Certaines de ces caractéristiques ont un rôle pronostique connu, d'autres présentent une valeur pronostique inconnue ou une relation incertaine avec le marqueur d'intérêt. Afin de prendre en compte l'ensemble des variables disponibles, différents modèles multivariés ont été développés :

- « Le modèle complet » : ce modèle comprend l'ensemble des variables disponibles mais est généralement difficilement interprétable du fait de la quantité de variables.
- « Le modèle final » : ce modèle est obtenu après une étape de sélection des variables et un processus de modélisation afin d'avoir une estimation des effets ajustés plus

interprétable. Toutefois, ces effets peuvent être biaisés du fait de ce processus de sélection.

- « Le modèle standardisé » : *ce modèle sera développé dans le point n°17.*

Point n°17 : Parmi les résultats rapportés, fournir les effets estimés avec les intervalles de confiance à partir d'une analyse dans laquelle le marqueur et les facteurs pronostics standards sont inclus, indépendamment de leur signification statistique.

Les facteurs pronostics utilisés en routine clinique sont souvent pris en compte pour l'inclusion des patients dans l'étude. Il est important d'évaluer si le marqueur étudié conserve une association avec le résultat clinique après avoir considéré ces facteurs pronostics standards. Cela est réalisé par l'utilisation du « modèle standardisé » comprenant le marqueur d'intérêt et les facteurs standards quelle que soit la signification statistique. Cela permet notamment d'apprécier si le nouveau marqueur apporte des informations supplémentaires.

18^{ème} point : Si réalisé, donner les résultats d'autres études, telles que la vérification des hypothèses, des analyses de sensibilité ou la validation interne.

La fiabilité des résultats de l'étude repose sur la validité des modèles statistiques utilisés dans l'analyse. Un bref résumé des études complémentaires démontrant la robustesse des résultats de cette étude est conseillé.

D- Discussion

Point n°19 : Interpréter les résultats dans le contexte des hypothèses préétablies et des autres études pertinentes en incluant une discussion sur les limites de l'étude.

La discussion doit rappeler l'objectif de l'étude, les différentes hypothèses puis présenter un résumé des principales découvertes sans omettre les découvertes inattendues. Elle doit permettre de vérifier si l'étude a atteint les objectifs établis.

La discussion doit également contenir les différentes limites dues par exemple à la méthode d'analyse ou des incohérences dans les données ainsi qu'une évaluation de l'étude par les auteurs afin de déterminer si les résultats sont applicables aux populations non étudiées.

20^{ème} point : Discuter les implications pour les recherches futures et la valeur clinique

L'évaluation de nouveaux biomarqueurs doit permettre d'apporter de nouveaux outils pour améliorer la prise en charge des patients. Une association significative entre un biomarqueur

et l'évolution clinique est encourageante. Il reste cependant à définir l'utilité clinique de ce marqueur par rapport aux outils déjà disponibles en routine.

III- UTILITÉ CLINIQUE

Bien que la validation clinique permette d'apporter la preuve qu'un biomarqueur présente une valeur pronostique, cela n'est pas suffisant pour que ce dernier soit recommandé pour une utilisation en routine. Pour ce faire, il est désormais essentiel de démontrer l'utilité clinique à travers la détermination d'un niveau de preuve ou level-of-evidence (LOE). Cela permettra par la suite de proposer des recommandations dans le but de mettre en concurrence les différents biomarqueurs sur le marché.

A- Diagramme TMUGS : Tumor Marker Utility Grading System(158)

Jusqu'en 1996, peu de lignes directrices étaient disponibles pour déterminer l'utilité clinique d'un marqueur tumoral, il était alors difficile de définir l'intérêt d'une utilisation en routine. En 1996, Hayes et al. proposèrent le TMUGS afin d'évaluer l'utilité clinique. Cette méthode fut validée par la suite par une commission de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO).

Dans un premier temps, Hayes et al. ont développé une échelle semi-quantitative (Tableau 5) permettant d'interpréter les résultats cliniques et biologiques d'un marqueur pour une utilisation. Dans cette classification, il est important d'associer la valeur pronostique et la valeur prédictive du marqueur. En effet, l'association d'un marqueur à un processus biologique, même forte, n'est pas forcément synonyme d'utilité clinique. Si la connaissance du résultat ne permet pas de modifier la prise en charge afin d'améliorer l'évolution clinique du patient (survie, qualité de vie, survie sans récidence...) alors une utilisation en routine sera compromise.

Initialement, le TMUGS a été conçu pour développer des lignes directrices pratiques, cela a conduit au développement du diagramme TMUGS (Figure 51) qui permet d'affecter un niveau d'utilité à un facteur biologique. Un facteur biologique ne pourra être considéré comme pronostic ou prédictif uniquement si son évaluation arrive en phase 4 du diagramme TMUGS.

Tableau 5 : Echelle de score d'utilité clinique des marqueurs tumoraux

Score	Description
0	Le marqueur a été adéquatement évalué pour une utilisation spécifique et les données ne démontrent aucune utilité clinique. Le marqueur ne doit alors pas être recommandé pour cette utilisation
NA	Les données ne sont pas disponibles pour cette utilisation
+/-	Les données suggèrent une possible corrélation avec les paramètres biologiques ainsi qu'une possible contribution à une évolution clinique favorable mais d'autres études sont nécessaires. Ainsi le marqueur est toujours considéré comme expérimental et ne doit pas être utilisé pour la pratique clinique standard.
+	Des données suffisantes sont disponibles pour démontrer une corrélation avec les paramètres biologiques et une influence favorable sur l'évolution clinique. Cependant le marqueur est toujours considéré comme expérimental et ne devrait pas être utilisé en pratique clinique standard pour l'une des trois raisons suivantes : <ul style="list-style-type: none"> - Le nouveau marqueur est fortement corrélé à un autre marqueur dont l'utilité clinique a déjà été démontrée mais ne fournit pas d'avantages supplémentaires - Le nouveau marqueur fournit des informations indépendantes mais dont l'utilité clinique n'a pas été démontrée - Les données préliminaires sont encourageantes mais le niveau de preuve (défini ci-après) fait défaut pour documenter l'utilité clinique
++	Le marqueur fournit des informations non disponibles par d'autres mesures et sont utiles au clinicien pour la prise de décision mais il ne peut pas être utilisé comme seul critère pour cette prise de décision. Ainsi, le marqueur présente une utilité clinique et peut être utilisé dans la pratique standard.
+++	Le marqueur peut être utilisé comme seul critère pour la prise de décision dans l'utilisation étudiée. Le marqueur a une utilité clinique et devrait être utilisé dans la pratique standard.

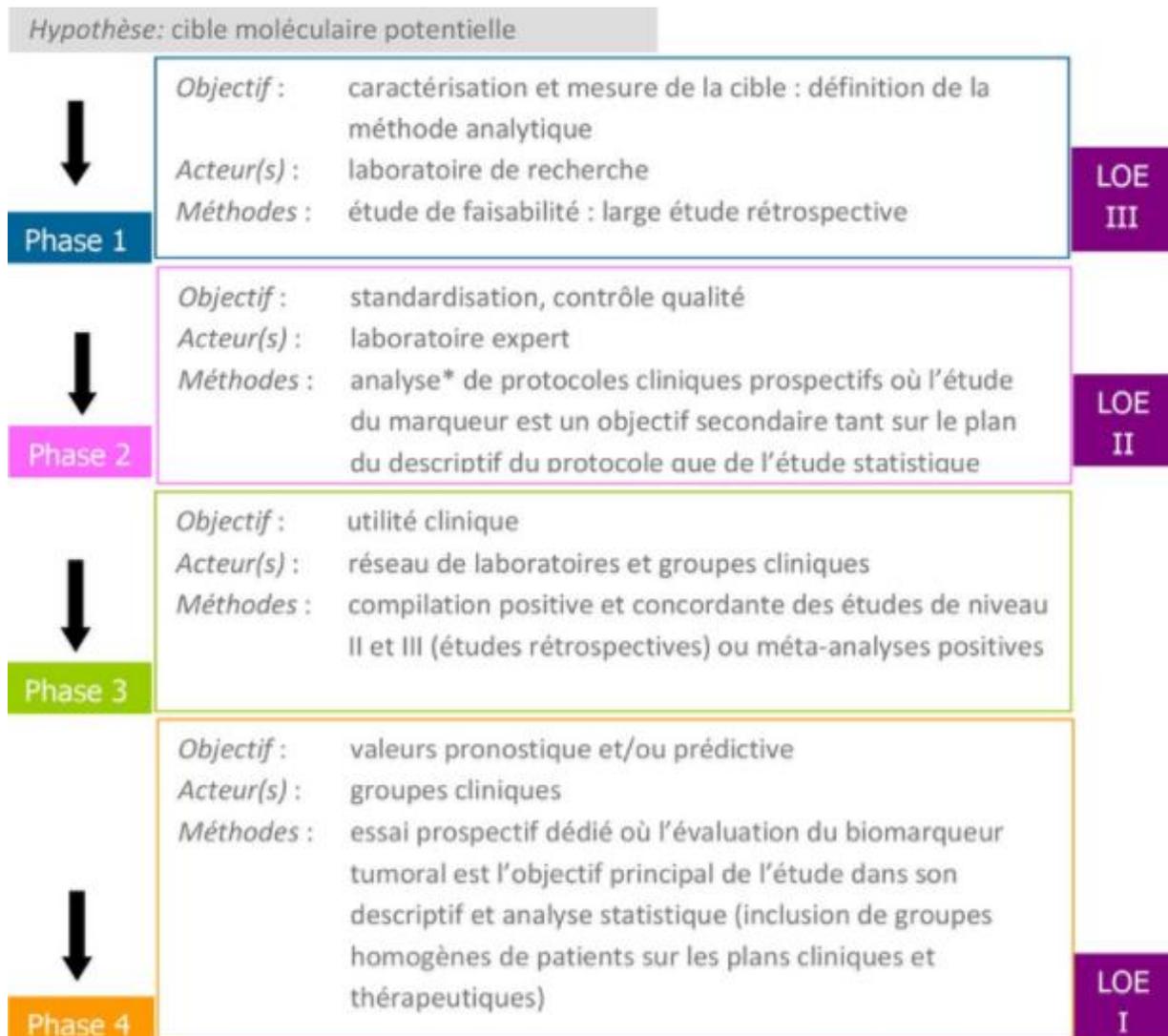


Figure 51 : Diagramme TMUGS (grille de Hayes)(157)

B- Grille de HAYES mise à jour par Simon en 2009

En 1998, les niveaux d'utilité définis par le diagramme TMUGS ont été complétés par la création de trois niveaux de preuve ou LOE (level of evidence) (grille de Hayes)(159) :

- LOE I : niveau de preuve élevé
- LOE II : niveau de preuve intermédiaire
- LOE III : niveau de preuve faible

Cette extension permet alors une classification des marqueurs tumoraux par niveau d'utilité et par niveau de preuve (figure 51).

En 2009, la grille de Hayes fut mise à jour par Simon(160) (Tableau 6). Cette mise à jour a permis de compléter la définition des types d'études. Notamment, elle a attribué un nouveau

niveau de preuve LOE IB pour définir les études rétrospectives d'un biomarqueur s'appuyant sur des échantillons archivés qui avaient été collectés prospectivement dans le cadre d'un essai randomisé non dédié à l'étude de ce marqueur.

Tableau 6 : Grille de Simon(159)

Niveau de preuve	Description des études	Etudes de validation disponibles
LOE IA	Prospectives	Non nécessaires
LOE IB	Prospectives-Rétrospectives utilisant des échantillons archivés prospectivement dans le cadre d'un essai clinique	Une étude ou plus avec des résultats concordants. Echantillons provenant d'essais cliniques différents.
LOE IIB	Prospectives-Rétrospectives utilisant des échantillons archivés prospectivement dans le cadre d'un essai clinique	Aucune étude ou plusieurs études avec des résultats non concordants.
LOE IIC	Prospectives-observationnelles	Deux études ou plus avec des résultats concordants
LOE IIIC	Prospectives-observationnelles	Aucune étude ou une étude avec des résultats concordants ou non
LOE IV-VD	Rétrospectives-observationnelles	Non applicable

Un ensemble de 7 critères est alors défini pour l'attribution d'un niveau LOE IB (161):

- Les résultats doivent être confirmés dans le cadre d'au moins une autre étude similaire à la précédente et dont les échantillons proviennent d'un essai différent ;
- Les échantillons disponibles doivent être en quantité suffisante permettant d'assurer la représentativité de la population de l'essai et donc une puissance acceptable de l'étude ou que les patients soient sélectionnés de manière à éviter les biais de sélection par exemple par randomisation ;
- Les données pré-analytiques doivent être parfaitement contrôlées et doivent correspondre à la pratique actuelle (procédures opératoires standards) :
 - o Le test doit être validé en analytique et en pré-analytique pour son utilisation sur des échantillons archivés,

- La technique analytique du marqueur doit être précise, reproductible et robuste ;
- La conception de l'étude doit être complètement définie et écrite avant la conduite des essais sur des tissus archivés et doit être dédiée à l'évaluation d'un seul marqueur bien défini ;
- La conception et l'analyse de l'étude doivent être adéquates et appropriées à l'étude de l'utilité du marqueur pour une utilisation clinique précise ;
- Si les patients ont reçu un traitement adjuvant, ce dernier doit être considéré dans l'analyse multivariée ;
- Les données cliniques (critère de jugement et traitement) doivent être en aveugle : le test doit être conduit sans communication des données cliniques.

Différents niveaux de preuve ont donc pu être attribués aux biomarqueurs à visée pronostique dans le cancer du sein. Par exemple, uPA/PAI-1 font parti des biomarqueurs pronostiques actuellement disponibles les mieux validés grâce à la réalisation de deux études indépendantes de LOE I. De plus, ce biomarqueur présente un niveau de preuve intermédiaire concernant sa valeur prédictive (LOE II)(162). La détermination de la prolifération cellulaire par l'évaluation du Ki-67 présente, quant à elle, une LOE de niveau IB suite à la révision par Simon(160). Une standardisation des techniques et méthodes pour déterminer le score reste indispensable, notamment pour les taux intermédiaires, afin de mettre en place une utilisation du Ki-67 en pratique clinique quotidienne(163). Parmi les biomarqueurs émergents, on peut noter la signature Mammaprint® qui a été validée avec un niveau de preuve clinique 1A en 2016 suite à un essai prospectif international de 6000 patientes (microarray for node negative and 1 to 3 positive node disease may avoid chemotherapy trial [MINDACT]) présentant des tumeurs du sein sans envahissement ganglionnaire ou avec un envahissement de 1 à 3 ganglions(164,165).

Commercialisation : cas d'un dispositif médical de diagnostic in vitro (DMDIV)

La création de la directive 98/79/CE relative aux DMDIV en 1998, a permis une harmonisation des législations nationales relatives à la fiabilité des dispositifs médicaux in vitro. Cette directive a été créée dans le but de garantir un niveau élevé de protection de la santé et de la sécurité des patients, des utilisateurs et des tiers mais également afin de garantir la capacité des dispositifs à atteindre les performances escomptées.

Cependant, en Mai 2017 est entré en vigueur le règlement (UE) 2017/746 sur les DMDIV afin de définir un cadre réglementaire qui garantisse un niveau élevé de sécurité et de protection de la santé tout en favorisant l'innovation. Ce règlement abroge la directive 98/79/CE et la décision 2010/227/UE de la Commission relative à la banque de données européenne sur les dispositifs médicaux. Bien que ce nouveau règlement ne soit d'application obligatoire qu'à partir de 2022, nous nous baserons tout de même sur ce dernier afin d'aborder certains points clés de la mise sur le marché des biomarqueurs car bien qu'une période de transition soit prévue, certaines parties du règlement devraient être appliquées dès que possible. De ce fait, un dispositif ne pourra être mis sur le marché ou mis en service que s'il est conforme aux exigences de ce règlement.

I- DÉFINITION ET CLASSIFICATION DES DMDIV

Selon le règlement (UE) 2017/746, on entend par « dispositif médical de diagnostic *in vitro* » tout dispositif médical qui consiste en un réactif, un produit réactif, un matériau d'étalonnage, un matériau de contrôle, une trousse, un instrument, un appareil, un équipement, un logiciel ou un système, utilisé seul ou en association, destiné par le fabricant à être utilisé *in vitro* dans l'examen d'échantillons provenant du corps humain, y compris les dons de sang et de tissus, uniquement ou principalement dans le but de fournir des informations sur un ou plusieurs des éléments suivants :

- Concernant un processus ou un état physiologique ou pathologique ;
- Concernant des déficiences congénitales physiques ou mentales ;
- Concernant la prédisposition à une affection ou à une maladie ;
- Permettant de déterminer si un traitement donné est sûr pour des receveurs potentiels et compatible avec eux ;
- Permettant de prévoir la réponse ou les réactions à un traitement ;

- Permettant de définir ou de contrôler des mesures thérapeutiques.

Les récipients pour échantillons sont également considérés être des DMDIV.

Les DMDIV sont répartis en 4 classes, définies dans le Tableau 7, en fonction de leur destination et des risques qui leur sont inhérents conformément à l'annexe VIII du règlement (UE)2017/746.

Tableau 7 : Classification des DMDIV selon le GHTF(166)

Classe	Niveau de risque	Exemples
A	Risque pour l'individu bas et risque pour la santé publique bas	Solutions tampons, colorants histologiques, récipients pour échantillons (urines,...)
B	Risque pour l'individu modéré et/ou risque pour la santé publique bas	Tests de grossesse, Bandelettes urinaires, dispositifs destinés à la détermination du taux de cholestérol
C	Risque pour l'individu élevé et/ou risque pour la santé publique modéré	Lecteurs de glycémie, typage HLA, Rubéole
D	Risque pour l'individu élevé et risque pour la santé publique élevé	Détection du VIH, détermination du système ABO

Selon les règles de classification définies dans l'annexe VIII du règlement (UE)2017/746, les dispositifs destinés à être utilisés comme des diagnostics compagnons ou pour évaluer le stade de la maladie, lorsqu'un résultat erroné risque de conduire à une décision de prise en charge du patient qui mettrait en danger sa vie ou dans le dépistage, le diagnostic et la détermination du stade du cancer relèvent de la classe C et seront donc soumis à des obligations particulières.

II- OBLIGATIONS GÉNÉRALES DES FABRICANTS – (UE)2017/746 ARTICLE 10

Au cours du processus de mise sur le marché, les fabricants sont soumis à de nombreuses obligations. Entre autre,

- Les fabricants se doivent d'établir, documenter, mettre en œuvre et maintenir un système de gestion des risques ;
- Les fabricants doivent réaliser une évaluation des performances des dispositifs et dans le cas des biomarqueurs, comme cela a été décrit dans la partie *Validation* de ce Chapitre ;
- Les fabricants doivent élaborer et tenir à jour la documentation technique relative à ces dispositifs afin de permettre une évaluation de la conformité avec les exigences du règlement ;
- La conformité avec les exigences applicables des performances analytiques des biomarqueurs doit être évaluée, le cas échéant, les fabricants doivent établir une déclaration de conformité UE et apposer le marquage de conformité CE avant la mise sur le marché si les exigences du règlement ont été respectées;
- Les fabricants doivent veiller à ce que des procédures existent afin de maintenir la production en série conforme aux exigences du règlement et doivent établir, documenter, appliquer, maintenir, mettre à jour et améliorer en permanence un système de gestion de la qualité afin d'assurer le maintien des performances analytiques des biomarqueurs ;
- Les fabricants doivent appliquer et mettre à jour un système de surveillance après commercialisation et disposer d'un système d'enregistrement et de notification des incidents graves et des mesures correctives de sécurité.

La confirmation de la conformité aux exigences générales en matière de sécurité et de performance sont fondées sur la validité scientifique et des données relatives aux performances cliniques et analytiques apportant une preuve clinique suffisante. Au cours de ces études de performance, tout événement indésirable déterminant pour l'évaluation de résultats, événements indésirables grave ainsi que toute défectuosité des dispositifs pouvant déboucher sur un événement indésirable grave devra faire l'objet d'un enregistrement et d'une notification.

III- SURVEILLANCE APRÈS COMMERCIALISATION - (UE)2017/746

CHAPITRE VII

Les fabricants de DMDIV se doivent d'avoir un système de surveillance après commercialisation. Ce dernier permet de « collecter, d'enregistrer et d'analyser, d'une manière active et systématique, les données pertinentes sur la qualité, les performances et la sécurité du dispositif pendant toute sa durée de vie, de tirer les conclusions qui s'imposent et de définir et d'appliquer toute mesure préventive ou corrective et d'en assurer le suivi ». Cela doit permettre :

- D'actualiser la détermination du rapport bénéfice/risque et améliorer la gestion des risques ;
- D'actualiser les informations sur la conception et la fabrication, la notice d'utilisation et l'étiquetage ;
- D'actualiser l'évaluation des performances ;
- D'actualiser le résumé des caractéristiques de sécurité et des performances ;
- De faire apparaître les besoins en matière de mesures préventives, de mesures correctives ou de mesures correctives de sécurité ;
- De répertorier les possibilités d'amélioration de la facilité d'utilisation, des performances et de la sécurité du dispositif ;
- Le cas échéant, de contribuer à la surveillance d'autres dispositifs.

Toute notification d'un incident grave, devra faire l'objet d'une enquête par le fabricant, de façon conjointe avec les autorités compétentes, afin d'évaluer les risques résultant de l'incident et des mesures correctives de sécurité à prendre. Dans le cas d'un dispositif présentant un risque inacceptable pour la santé et la sécurité, les autorités compétentes devront exiger aux fabricants de prendre les mesures correctives appropriées et proportionnées à la nature du risque comme restreindre la mise à disposition du dispositif sur le marché, l'assortir d'exigences particulières, retirer le dispositif du marché ou le rappeler. Concernant les autres non-conformités, les autorités compétentes exigeront d'y mettre un terme dans un délai raisonnable défini au préalable. Dans le cas où cela n'est pas réalisé, elles pourront alors restreindre ou interdire la mise à disposition du dispositif sur le marché.

Enfin, concernant les dispositifs de classe C, à laquelle appartiennent les biomarqueurs, les fabricants devront établir un rapport périodique actualisé de sécurité (PSUR) permettant de faire la synthèse des résultats et des conclusions de l'analyse des données de surveillance. Ce dernier comprend :

- Les conclusions de la détermination du rapport bénéfice/risque ;
- Les principales constatations du SPAC (Suivi des Performances Après Commercialisation) qui consiste en un processus continu de mise à jour de l'évaluation des performances. Dans le cadre du SPAC, le fabricant collecte et évalue de manière proactive des données relatives aux performances et des données scientifiques pertinentes résultant de l'utilisation du dispositif.
- Et, le volume des ventes du dispositif et une estimation de la taille et d'autres caractéristiques de la population utilisant le dispositif et, si possible, la fréquence d'utilisation du dispositif.

Conclusion Générale

Actuellement, des patientes atteintes de cancer du sein sont en échec thérapeutique pour cause de résistances ou d'indisponibilité de thérapeutiques efficaces. Ces échecs thérapeutiques, également retrouvés dans de nombreux autres types de cancer, ont induit une orientation de la prise en charge vers l'utilisation de la médecine personnalisée et de précision. L'avènement de la médecine personnalisée a, entre autre, été permis grâce aux biomarqueurs disponibles à chaque étape du cycle de vie du médicament. Dans le cadre du cancer du sein, nous avons vu que seulement 5 biomarqueurs pronostiques sont à ce jour utilisés en routine clinique mais tous, à l'exception de uPA/PAI-1, présentent également un rôle prédictif de la réponse thérapeutique. Ces derniers vont alors permettre d'améliorer la prise en charge en prenant en compte le risque de récurrence et le statut du biomarqueur. Cependant, environ 90% des biomarqueurs développés, toutes catégories confondues, ne sont utilisés qu'au cours de la phase de R&D et n'atteignent jamais le marché car un certain nombre de facteurs limite encore leur utilisation. Ces facteurs sont d'ordre scientifique et réglementaire notamment liés à la complexité du processus de validation à la fois analytique et clinique, aux conditions d'accès au marché puisque les biomarqueurs ne dépendent pas d'une réglementation qui leur est propre mais également liés aux conditions d'accès aux soins, à des questions économiques (coûts de développement, remboursement), éthiques, ... Les biomarqueurs représentent donc un challenge majeur à la fois biologique, technique et clinique dans la politique de santé dont les enjeux sont d'améliorer la prise en charge des patients en cancérologie via la détermination du rapport bénéfice/risque. Toutefois, nous avons pu observer que les progrès de la biologie moléculaire, de la génétique et l'avènement des sciences « omics » ont permis l'émergence de nouveaux biomarqueurs actuellement en cours de validation et très prometteurs sur le plan pronostique ainsi que de nombreuses nouvelles voies de recherche. La découverte de biomarqueurs va à présent nécessiter l'association de disciplines et technologies multiples ainsi que des outils sophistiqués de traitement de l'information. Il est donc indéniable que les biomarqueurs auront un rôle essentiel dans la médecine personnalisée du cancer, qui constitue une des voies les plus prometteuses en cancérologie.

Bibliographie

1. Les cancers en France - Edition 2015 - Ref : ETKFRANCE16 | Institut National Du Cancer [Internet]. [cited 2017 May 26]. Available from: <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-Edition-2015>
2. Mathers C, Organization WH. The Global Burden of Disease: 2004 Update. World Health Organization; 2008. 156 p.
3. 102.pdf [Internet]. [cited 2017 Aug 1]. Available from: <http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/?sequence=38>
4. Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. Cancer. 1997 Nov 1;80(9):1803–4.
5. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2006 Nov 20;24(33):5313–27.
6. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Res BCR. 2010;12(5):R68.
7. Ignatiadis M, Sotiriou C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. Nat Rev Clin Oncol. 2013 Sep;10(9):494–506.
8. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. 2006 Feb;19(2):264–71.
9. link.pdf [Internet]. [cited 2016 Sep 30]. Available from: http://www.ensae.org/global/gene/link.php?doc_id=1233&fg=1
10. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2003 Jun;9(6):1980–9.
11. Boyd S. Remarks on Oöphorectomy in the Treatment of Cancer of the Breast. Br Med J. 1899 Feb 4;1(1988):257–62.
12. Allen E, Doisy EA. Landmark article Sept 8, 1923. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. By Edgar Allen and Edward A. Doisy. JAMA. 1923 Nov 18;250(19):2681–3.
13. Jensen EV, Block GE, Smith S, Kyser K, DeSombre ER. Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. Natl Cancer Inst Monogr. 1971 Dec;34:55–70.
14. Horwitz KB, McGuire WL. Specific progesterone receptors in human breast cancer. Steroids. 1975 Apr;25(4):497–505.
15. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Feb 4;243(1):122–6.
16. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. Pharmacol Rev. 2006 Dec;58(4):773–81.

17. Kerdivel G, Flouriot G, Pakdel F. Modulation of estrogen receptor alpha activity and expression during breast cancer progression. *Vitam Horm*. 2013;93:135–60.
18. Goulding H, Pinder S, Cannon P, Pearson D, Nicholson R, Snead D, et al. A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. *Hum Pathol*. 1995 Mar;26(3):291–4.
19. Shaw JA, Udokang K, Mosquera J-M, Chauhan H, Jones JL, Walker RA. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *J Pathol*. 2002 Dec;198(4):450–7.
20. Pertschuk LP, Feldman JG, Kim YD, Braithwaite L, Schneider F, Braverman AS, et al. Estrogen receptor immunocytochemistry in paraffin embedded tissues with ER1D5 predicts breast cancer endocrine response more accurately than H222Sp gamma in frozen sections or cytosol-based ligand-binding assays. *Cancer*. 1996 Jun 15;77(12):2514–9.
21. Barnes DM, Harris WH, Smith P, Millis RR, Rubens RD. Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *Br J Cancer*. 1996 Nov;74(9):1445–51.
22. Diaz LK, Sneige N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to increasing testing accuracy. *Adv Anat Pathol*. 2005 Jan;12(1):10–9.
23. Cheang MCU, Treaba DO, Speers CH, Olivotto IA, Bajdik CD, Chia SK, et al. Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody SP1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5637–44.
24. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*. 1990 May;9(5):1603–14.
25. Condon JC, Hardy DB, Kovaric K, Mendelson CR. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2006 Apr;20(4):764–75.
26. Salazar M, Lerma-Ortiz A, Hooks GM, Ashley AK, Ashley RL. Progestin-mediated activation of MAPK and AKT in nuclear progesterone receptor negative breast epithelial cells: The role of membrane progesterone receptors. *Gene*. 2016 Oct 10;591(1):6–13.
27. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 2010 May;7(5):e1000279.
28. Vignon F, Bardon S, Chalbos D, Rochefort H. Antiestrogenic effect of R5020, a synthetic progestin in human breast cancer cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983 Jun;56(6):1124–30.
29. Musgrove EA, Swarbrick A, Lee CS, Cornish AL, Sutherland RL. Mechanisms of cyclin-dependent kinase inactivation by progestins. *Mol Cell Biol*. 1998 Apr;18(4):1812–25.
30. Chen C-C, Hardy DB, Mendelson CR. Progesterone receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells via induction of MAPK phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1). *J Biol Chem*. 2011 Dec 16;286(50):43091–102.
31. Kabos P, Finlay-Schultz J, Li C, Kline E, Finlayson C, Wisell J, et al. Patient-derived luminal breast cancer xenografts retain hormone receptor heterogeneity and help define unique estrogen-dependent gene signatures. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Sep;135(2):415–32.
32. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, et al. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature*. 2015 Jul 16;523(7560):313–7.

33. Bardou V-J, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003 May 15;21(10):1973–9.
34. Press M, Spaulding B, Groshen S, Kaminsky D, Hagerty M, Sherman L, et al. Comparison of different antibodies for detection of progesterone receptor in breast cancer. *Steroids*. 2002 Aug;67(9):799–813.
35. BullCancer06.pdf [Internet]. [cited 2016 Oct 17]. Available from: http://lism.cnrs-mrs.fr/JS_files/Articles/BullCancer06.pdf
36. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):99–110.
37. Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:195–217.
38. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004 May;4(5):361–70.
39. Couturier J, Vincent-Salomon A, Nicolas A, Beuzeboc P, Mouret E, Zafrani B, et al. Strong correlation between results of fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (HER-2/neu) gene status in breast carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2000 Nov;13(11):1238–43.
40. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418–23.
41. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
42. 28630_herceptest_interpretation_manual-breast_ihc_row.pdf [Internet]. [cited 2016 Oct 18]. Available from: http://www.dako.com/fr/28630_herceptest_interpretation_manual-breast_ihc_row.pdf
43. Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. *Am J Clin Pathol*. 2008 Feb;129(2):263–73.
44. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13–20.
45. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1984 Oct;133(4):1710–5.
46. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993 Nov;123(3):513–22.
47. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311–22.
48. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Oct 1;23(28):7212–20.
49. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007 May 21;96(10):1504–13.

50. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010 Feb;11(2):174–83.
51. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast Edinb Scotl.* 2008 Aug;17(4):323–34.
52. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2011 Aug;22(8):1736–47.
53. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2013 Sep;24(9):2206–23.
54. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2009 Aug;20(8):1319–29.
55. Denkert C, Budczies J, von Minckwitz G, Wienert S, Loibl S, Klauschen F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *Breast Edinb Scotl.* 2015 Nov;24 Suppl 2:S67-72.
56. Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des.* 2004;10(1):39–49.
57. Danø K, Behrendt N, Høyer-Hansen G, Johnsen M, Lund LR, Ploug M, et al. Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost.* 2005 Apr;93(4):676–81.
58. Schmitt M, Mengele K, Napieralski R, Magdolen V, Reuning U, Gkazepis A, et al. Clinical utility of level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010 Nov;10(8):1051–67.
59. Deryugina EI, Quigley JP. Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:564259.
60. Tjwa M, Moura R, Moons L, Plaisance S, De Mol M, Jansen S, et al. Fibrinolysis-independent role of plasmin and its activators in the haematopoietic recovery after myeloablation. *J Cell Mol Med.* 2009 Dec;13(11–12):4587–95.
61. Ferraris GMS, Sidenius N. Urokinase plasminogen activator receptor: a functional integrator of extracellular proteolysis, cell adhesion, and signal transduction. *Semin Thromb Hemost.* 2013 Jun;39(4):347–55.
62. Jo M, Thomas KS, Marozkina N, Amin TJ, Silva CM, Parsons SJ, et al. Dynamic assembly of the urokinase-type plasminogen activator signaling receptor complex determines the mitogenic activity of urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17449–57.
63. Kiyari J, Kiyari R, Haller H, Dumler I. Urokinase-induced signaling in human vascular smooth muscle cells is mediated by PDGFR-beta. *EMBO J.* 2005 May 18;24(10):1787–97.
64. Montuori N, Cosimato V, Rinaldi L, Rea VEA, Alfano D, Ragno P. uPAR regulates pericellular proteolysis through a mechanism involving integrins and fMLF-receptors. *Thromb Haemost.* 2013 Feb;109(2):309–18.
65. Dupont DM, Madsen JB, Kristensen T, Bodker JS, Blouse GE, Wind T, et al. Biochemical properties of plasminogen activator inhibitor-1. *Front Biosci Landmark Ed.* 2009 Jan 1;14:1337–61.

66. Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, Olson D, Cremona O, Gliemann J, et al. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J*. 1997 May 15;16(10):2610–20.
67. Bugge TH, Lund LR, Kombrinck KK, Nielsen BS, Holmbäck K, Drew AF, et al. Reduced metastasis of Polyoma virus middle T antigen-induced mammary cancer in plasminogen-deficient mice. *Oncogene*. 1998 Jun 18;16(24):3097–104.
68. Bekes EM, Deryugina EI, Kupriyanova TA, Zajac E, Botkjaer KA, Andreassen PA, et al. Activation of pro-uPA is critical for initial escape from the primary tumor and hematogenous dissemination of human carcinoma cells. *Neoplasia N Y N*. 2011 Sep;13(9):806–21.
69. Masuda T, Hattori N, Senoo T, Akita S, Ishikawa N, Fujitaka K, et al. SK-216, an inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1, limits tumor progression and angiogenesis. *Mol Cancer Ther*. 2013 Nov;12(11):2378–88.
70. Fang H, Placencio VR, DeClerck YA. Protumorigenic activity of plasminogen activator inhibitor-1 through an antiapoptotic function. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Oct 3;104(19):1470–84.
71. Duffy MJ, O’Grady P, Devaney D, O’Siorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ. Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer*. 1988 Aug 1;62(3):531–3.
72. Harbeck N, Kates RE, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2002 Feb 15;20(4):1000–7.
73. Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JGM, Krüger A, et al. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res*. 2002 Aug 15;62(16):4617–22.
74. Manders P, Tjan-Heijnen VCG, Span PN, Grebenchtchikov N, Foekens JA, Beex LVAM, et al. Predictive impact of urokinase-type plasminogen activator: plasminogen activator inhibitor type-1 complex on the efficacy of adjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Cancer Res*. 2004 Jan 15;64(2):659–64.
75. Borstnar S, Sadikov A, Mozina B, Cufer T. High levels of uPA and PAI-1 predict a good response to anthracyclines. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jun;121(3):615–24.
76. van ’t Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530–6.
77. Mir KU, Southern EM. Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*. 1999 Aug;17(8):788–92.
78. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 Sep 15;17(18):6012–20.
79. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
80. Fisher B, Costantino J, Redmond C, Poisson R, Bowman D, Couture J, et al. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med*. 1989 Feb 23;320(8):479–84.
81. Fisher B, Jeong J-H, Bryant J, Anderson S, Dignam J, Fisher ER, et al. Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet Lond Engl*. 2004 Sep 4;364(9437):858–68.

82. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, DeCillis A, Emir B, Wickerham DL, et al. Tamoxifen and chemotherapy for lymph node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Nov 19;89(22):1673–82.
83. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006 Aug 10;24(23):3726–34.
84. Györfy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res BCR.* 2015;17:11.
85. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Jul;116(2):295–302.
86. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1160–7.
87. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2013 Aug 1;31(22):2783–90.
88. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Feb 15;98(4):262–72.
89. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Dec 19;347(25):1999–2009.
90. Prat A, Parker JS, Fan C, Cheang MCU, Miller LD, Bergh J, et al. Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2012 Nov;23(11):2866–73.
91. Kelly CM, Bernard PS, Krishnamurthy S, Wang B, Ebbert MTW, Bastien RRL, et al. Agreement in risk prediction between the 21-gene recurrence score assay (Oncotype DX®) and the PAM50 breast cancer intrinsic Classifier™ in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer. *The Oncologist.* 2012;17(4):492–8.
92. Iwamoto T, Lee J-S, Bianchini G, Hubbard RE, Young E, Matsuoka J, et al. First generation prognostic gene signatures for breast cancer predict both survival and chemotherapy sensitivity and identify overlapping patient populations. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Nov;130(1):155–64.
93. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011 Nov 10;29(32):4273–8.
94. Bonneau C, Gurard-Levin ZA, Andre F, Pusztai L, Rouzier R. Predictive and Prognostic Value of the TauProtein in Breast Cancer. *Anticancer Res.* 2015 Oct;35(10):5179–84.
95. Kim H-S, Koh J-S, Choi Y-B, Ro J, Kim H-K, Kim M-K, et al. Chromatin CKAP2, a new proliferation marker, as independent prognostic indicator in breast cancer. *PloS One.* 2014;9(6):e98160.
96. Collie-Duguid ESR, Sweeney K, Stewart KN, Miller ID, Smyth E, Heys SD. SerpinB3, a new prognostic tool in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Apr;132(3):807–18.

97. Lin Y, Liu F, Fan Y, Qian X, Lang R, Gu F, et al. Both high expression of pyruvate kinase M2 and vascular endothelial growth factor-C predicts poorer prognosis in human breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8028–37.
98. Bozorgi A, Khazaei M, Khazaei MR. New Findings on Breast Cancer Stem Cells: A Review. *J Breast Cancer.* 2015 Dec;18(4):303–12.
99. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007 Nov;1(5):555–67.
100. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):15–20.
101. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009 Jan;19(1):92–105.
102. Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011 Nov 24;11(12):849–64.
103. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 2009 Oct;10(10):704–14.
104. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60:167–79.
105. Cortez MA, Ivan C, Zhou P, Wu X, Ivan M, Calin GA. microRNAs in cancer: from bench to bedside. *Adv Cancer Res.* 2010;108:113–57.
106. Mukherji S, Ebert MS, Zheng GXY, Tsang JS, Sharp PA, van Oudenaarden A. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nat Genet.* 2011 Aug 21;43(9):854–9.
107. Luo D, Wilson JM, Harvel N, Liu J, Pei L, Huang S, et al. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells. *J Transl Med.* 2013 Mar 5;11:57.
108. Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene.* 2007 Jul 26;26(34):5017–22.
109. Chen F, Hu S-J. Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2012 Feb;26(2):79–86.
110. Kaller M, Liffers S-T, Oeljeklaus S, Kuhlmann K, Röh S, Hoffmann R, et al. Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2011 Aug;10(8):M111.010462.
111. Mackiewicz M, Huppi K, Pitt JJ, Dorsey TH, Ambs S, Caplen NJ. Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Nov;130(2):663–79.
112. Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT, et al. Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Mol Cancer Ther.* 2011 Aug;10(8):1470–80.
113. Kasinski AL, Slack FJ. miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2012 Nov 1;72(21):5576–87.
114. Kumar B, Yadav A, Lang J, Teknos TN, Kumar P. Dysregulation of microRNA-34a expression in head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor growth and tumor angiogenesis. *PLoS One.* 2012;7(5):e37601.

115. Yang S, Li Y, Gao J, Zhang T, Li S, Luo A, et al. MicroRNA-34 suppresses breast cancer invasion and metastasis by directly targeting Fra-1. *Oncogene*. 2013 Sep 5;32(36):4294–303.
116. Li L, Yuan L, Luo J, Gao J, Guo J, Xie X. MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clin Exp Med*. 2013 May;13(2):109–17.
117. Javeri A, Ghaffarpour M, Taha MF, Houshmand M. Downregulation of miR-34a in breast tumors is not associated with either p53 mutations or promoter hypermethylation while it correlates with metastasis. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2013 Mar;30(1):413.
118. Agarwal S, Hanna J, Sherman ME, Figueroa J, Rimm DL. Quantitative assessment of miR34a as an independent prognostic marker in breast cancer. *Br J Cancer*. 2015 Jan 6;112(1):61–8.
119. Peurala H, Greco D, Heikkinen T, Kaur S, Bartkova J, Jamshidi M, et al. MiR-34a expression has an effect for lower risk of metastasis and associates with expression patterns predicting clinical outcome in breast cancer. *PLoS One*. 2011;6(11):e26122.
120. van Schooneveld E, Wildiers H, Vergote I, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Res BCR [Internet]*. 2015;17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4332424/>
121. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:337–65.
122. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991 Dec 13;254(5038):1643–7.
123. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1107–11.
124. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960–4.
125. Baier PK, Wimmenauer S, Hirsch T, von Specht BU, von Kleist S, Keller H, et al. Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 1998;19(3):205–12.
126. Diederichsen ACP, Hjelmberg J v B, Christensen PB, Zeuthen J, Fenger C. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2003 Jul;52(7):423–8.
127. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Aug 15;58(16):3491–4.
128. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Feb 20;29(6):610–8.
129. Angell H, Galon J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr Opin Immunol*. 2013 Apr;25(2):261–7.
130. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):5944–51.

131. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014 Jan;232(2):199–209.
132. Puvirajesinghe TM, Bertucci F, Jain A, Scerbo P, Belotti E, Audebert S, et al. Identification of p62/SQSTM1 as a component of non-canonical Wnt VANGL2-JNK signalling in breast cancer. *Nat Commun.* 2016;7:10318.
133. Daulat AM, Borg J-P. Wnt/Planar Cell Polarity Signaling: New Opportunities for Cancer Treatment. *Trends Cancer.* 2017 Feb 1;3(2):113–25.
134. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013 Jan;13(1):11–26.
135. Anastas JN, Biechele TL, Robitaille M, Muster J, Allison KH, Angers S, et al. A protein complex of SCRIB, NOS1AP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression. *Oncogene.* 2012 Aug 9;31(32):3696–708.
136. Gujral TS, Chan M, Peshkin L, Sorger PK, Kirschner MW, MacBeath G. A noncanonical Frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cell.* 2014 Nov 6;159(4):844–56.
137. Hatakeyama J, Wald JH, Printsev I, Ho H-YH, Carraway KL. Vangl1 and Vangl2: planar cell polarity components with a developing role in cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2014 Oct;21(5):R345-356.
138. Luga V, Zhang L, Vilorio-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell.* 2012 Dec 21;151(7):1542–56.
139. Yagy R, Hamamoto R, Furukawa Y, Okabe H, Yamamura T, Nakamura Y. Isolation and characterization of a novel human gene, VANGL1, as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2002 Jun;20(6):1173–8.
140. Lee JK, Bae JA, Sun EG, Kim HD, Yoon TM, Kim K, et al. KITENIN increases invasion and migration of mouse squamous cancer cells and promotes pulmonary metastasis in a mouse squamous tumor model. *FEBS Lett.* 2009 Feb 18;583(4):711–7.
141. Ryu H-S, Park Y-L, Park S-J, Lee J-H, Cho S-B, Lee W-S, et al. KITENIN is associated with tumor progression in human gastric cancer. *Anticancer Res.* 2010 Sep;30(9):3479–86.
142. Hwang J-E, Shim H-J, Park Y-K, Cho S-H, Bae W-K, Kim D-E, et al. Intravenous KITENIN shRNA injection suppresses hepatic metastasis and recurrence of colon cancer in an orthotopic mouse model. *J Korean Med Sci.* 2011 Nov;26(11):1439–45.
143. Yoon TM, Kim S-A, Lee JK, Park Y-L, Kim GY, Joo Y-E, et al. Expression of KITENIN and its association with tumor progression in oral squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2013 Apr;40(2):222–6.
144. Lee JH, Park SR, Chay K-O, Seo Y-W, Kook H, Ahn KY, et al. KAI1 COOH-terminal interacting tetraspanin (KITENIN), a member of the tetraspanin family, interacts with KAI1, a tumor metastasis suppressor, and enhances metastasis of cancer. *Cancer Res.* 2004 Jun 15;64(12):4235–43.
145. Kaucká M, Plevová K, Pavlová S, Janovská P, Mishra A, Verner J, et al. The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. *Cancer Res.* 2013 Mar 1;73(5):1491–501.
146. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, et al. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer.* 2005 Aug 22;93(4):387–91.

147. Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Hewitt SM, Lissowska J, Sakoda LC, Sherman ME. Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2004 Apr;13(4):667–72.
148. van den Broek LJ, van de Vijver MJ. Assessment of problems in diagnostic and research immunohistochemistry associated with epitope instability in stored paraffin sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. 2000 Dec;8(4):316–21.
149. Moore HM, Kelly A, Jewell SD, McShane LM, Clark DP, Greenspan R, et al. Biospecimen Reporting for Improved Study Quality. *Biopreservation Biobanking*. 2011 Apr;9(1):57–70.
150. Kivelä T, Grambsch PM. Evaluation of sampling strategies for modeling survival of uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Aug;44(8):3288–93.
151. Hudis CA, Barlow WE, Costantino JP, Gray RJ, Pritchard KI, Chapman J-AW, et al. Proposal for standardized definitions for efficacy end points in adjuvant breast cancer trials: the STEEP system. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 May 20;25(15):2127–32.
152. Beyersmann J, Wolkewitz M, Schumacher M. The impact of time-dependent bias in proportional hazards modelling. *Stat Med*. 2008 Dec 30;27(30):6439–54.
153. van Walraven C, Davis D, Forster AJ, Wells GA. Time-dependent bias was common in survival analyses published in leading clinical journals. *J Clin Epidemiol*. 2004 Jul;57(7):672–82.
154. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. International Committee of Medical Journal Editors. *JAMA*. 1997 Mar 19;277(11):927–34.
155. Moher D, Schulz KF, Altman D, CONSORT Group. The CONSORT Statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trials 2001. *Explore N Y N*. 2005 Jan;1(1):40–5.
156. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for reporting observational studies. *Int J Surg*. 2014 Dec 1;12(12):1495–9.
157. Mallett S, Timmer A, Sauerbrei W, Altman DG. Reporting of prognostic studies of tumour markers: a review of published articles in relation to REMARK guidelines. *Br J Cancer*. 2009 Dec 8;102(1):173–80.
158. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Kemeny NE, Jessup JM, et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Oct 16;88(20):1456–66.
159. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is “statistically significant” clinically useful? *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1–3):305–19.
160. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Nov 4;101(21):1446–52.
161. Luporsi E, Bellocq J-P, Barrière J, Bonastre J, Chetritt J, Le Corroller A-G, et al. [uPA/PAI-1, Oncotype DX™, MammaPrint®]. Prognosis and predictive values for clinical utility in breast cancer management]. *Bull Cancer (Paris)*. 2015 Sep;102(9):719–29.
162. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res BCR*. 2014 Aug 22;16(4):428.
163. Luporsi E, André F, Spyrtatos F, Martin P-M, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Apr;132(3):895–915.

164. Mook S, Bonnefoi H, Pruneri G, Larsimont D, Jaskiewicz J, Sabadell MD, et al. Daily clinical practice of fresh tumour tissue freezing and gene expression profiling; logistics pilot study preceding the MINDACT trial. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2009 May;45(7):1201–8.
165. Cardoso F, Van't Veer L, Rutgers E, Loi S, Mook S, Piccart-Gebhart MJ. Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Feb 10;26(5):729–35.
166. ghtf-sg1-n045-2008-principles-ivd-medical-devices-classification-080219.pdf [Internet]. [cited 2017 Jul 27]. Available from: <http://www.imdrf.org/docs/ghtf/final/sg1/procedural-docs/ghtf-sg1-n045-2008-principles-ivd-medical-devices-classification-080219.pdf>
167. Signatures moléculaires des cancers/ coordinatrice, Patricia de Cremoux - ISBN 978-2-7420-0812-4
168. Thérapies ciblées en cancérologie/ coordonné par David Azria, Jean-Philippe Spano - ISBN 2-7420-0568-4
169. Les biomarqueurs moléculaires en oncologie / sous la direction de Jean-Louis Merlin - ISBN 978-2-8178-0444-6
170. Diseases of the breast 4th edition 2009 Harris JR et al.
171. <http://ansm.sante.fr/>
172. <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
173. <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-06>

Annexe I

Classification TNM du cancer du sein, 7e édition 2010, et stade UICC

Le système TNM distingue le stade clinique pré-thérapeutique noté "cTNM" et le stade anatomopathologique post-chirurgical noté "pTNM"

Tumeur Primaire T

Tx: la tumeur primitive ne peut pas être évaluée

T0 : la tumeur primitive n'est pas palpable

- Tis : carcinome *in situ*
- Tis (DCIS) : carcinome canalaire *in situ*
- Tis (CLIS) : carcinome lobulaire *in situ*
- Tis (Paget) : maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente
- NB : la maladie de Paget associée à une tumeur est classée en fonction de la taille de la tumeur

T1 : tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension

T1mic : micro-invasion ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension

- T1a : $1 \text{ mm} < \text{tumeur} \leq 5 \text{ mm}$ dans sa plus grande dimension
- T1b : $5 \text{ mm} < \text{tumeur} \leq 1 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension
- T1c : $1 \text{ cm} < \text{tumeur} \leq 2 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension

T2 : $2 \text{ cm} < \text{tumeur} \leq 5 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension

T3 : tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension

T4 : tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b)

- T4a : extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral
- T4b : oedème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau du même sein
- T4c : T4a + T4b
- T4d : cancer inflammatoire

Ganglions lymphatiques régionaux pN

Nx: l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué (par exemple déjà enlevés chirurgicalement ou non disponibles pour l'analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement)

N0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées

- N0(i-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, étude immunohistochimique négative (IHC)
- N0(i+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, IHC positive, avec des amas cellulaires $\leq 0,2$ mm (considéré comme sans métastase ganglionnaire)
- N0(mol-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire négative (RT-PCR)
- N0(mol+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire positive (RT-PCR)

N1mi : micrométastases $> 0,2$ mm et 2 mm

N1 : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglions sentinelle sans signe clinique

- N1a : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires
- N1b : envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
- N1c : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique (pN1a + pN1b)

N2 : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire

- N2a : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire > 2 mm
- N2b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire

N3 : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

- N3a : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires (avec au moins un amas cellulaire > 2 mm) ou envahissement des ganglions sous-claviculaires
- N3b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
- N3c : envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

Métastases à distance (M)

Mx : renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance

M0 : absence de métastases à distance

M1 : présence de métastase(s) à distance

Classification par stade UICC

0	Tis N0 M0
I	T1 N0 M0
IIA	T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0 ;
IIB	T2 N1 M0 ; T3 N0 M0
IIIA	T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0
IIIB	T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0
IIIC	Tous T N3 M0
IV	Tous T Tous N M1

Serment de Galien

En présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

-D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

-D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

-De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

