



HAL
open science

Biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements par thérapies ciblées dans le cancer du sein

Maëva Lion

► **To cite this version:**

Maëva Lion. Biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements par thérapies ciblées dans le cancer du sein. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0287 . tel-01754581

HAL Id: tel-01754581

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754581>

Submitted on 9 Mar 2020

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Maëva LION

**Biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements par
thérapies ciblées dans le cancer du sein**

Le 16 Décembre 2015

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Geneviève Ubeaud-Séquier M. Hamid Morjani	PU-PH, CHU de Strasbourg PU, Faculté de Pharmacie, Reims
Examineurs :	M. Jean-Louis Cazin M. Alexandre Harlé	PU, Praticien de CLCC, Centre Oscar Lambret, Lille MCU-PH associé, Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy
Directeur de thèse :	M. Jean-Louis Merlin	PU-PH, Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy

REMERCIEMENTS

***A mon Directeur de Thèse, Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin,
Professeur de Biologie Cellulaire Oncologique à la Faculté de Pharmacie de Nancy, CNRS
UMR 7039 CRAN, Université de Lorraine, Praticien Hospitalier, Pharmacien-biologiste,
responsable de l'Unité de Biologie des Tumeurs du service de Biopathologie de l'Institut de
Cancérologie de Lorraine.***

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire pendant 3 ans en tant qu'interne en Pharmacie, mais également pour la réalisation de mon master 2 et de ma thèse d'Université. Je vous remercie pour vos conseils, votre disponibilité et le soutien dont vous avez fait preuve tout au long de ce travail. Veuillez trouver ici, Monsieur, l'assurance de mon profond respect ainsi que toute ma reconnaissance.

***A Madame le Professeur Geneviève Ubeaud-Séquier,
Professeur de Pharmacocinétique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, Laboratoire
d'Innovation Thérapeutique - Optimisation Thérapeutique, UMR CNRS 7200, co-directeur
de la plateforme universitaire eBioCyt de l'Université de Strasbourg, Pharmacien
Hospitalier au CHU de Strasbourg, responsable du laboratoire de contrôle de la pharmacie
et des activités de pharmacocinétique clinique.***

Je vous remercie pour votre présence au sein de ce jury et pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

***A Monsieur le Professeur Hamid Morjani,
Professeur de Biochimie - Biologie moléculaire à la Faculté de Pharmacie de Reims, Unité
MEDyC - Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire - CNRS UMR 7369, Université de
Reims Champagne-Ardenne.***

C'est un grand honneur pour moi de vous compter parmi les membres de mon jury. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

***A Monsieur le Professeur Jean-Louis Cazin,
Professeur de Pharmacologie et Pharmacie Clinique à la Faculté de Pharmacie, Université de Lille II, Docteur ès Sciences Pharmaceutiques, Directeur du Centre de Pharmacologie et Pharmacie clinique en oncologie au Centre Oscar Lambret de Lille (Centre de Lutte Contre le Cancer de la Région Nord Pas-de-Calais), Conseiller ordinal élu à l'Ordre National des Pharmaciens section H.***

Je vous remercie pour votre présence dans ce jury de thèse et pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

***A Monsieur le Docteur Alexandre Harlé,
Maître de conférences associé en Biologie Cellulaire Oncologique à la Faculté de Pharmacie de Nancy, CNRS UMR 7039 CRAN, Université de Lorraine, Pharmacien-biologiste à l'Institut de Cancérologie de Lorraine.***

Merci de m'avoir toujours soutenue dans le travail et pour ton aide inconditionnelle.

A toute l'équipe de l'Unité de Biologie des Tumeurs, aux Maries, à Cindy, Carole et Shu-shu

Merci infiniment à toutes d'avoir été là pour moi toutes ces années, merci pour votre aide dans le travail et votre soutien dans les moments difficiles.

A mes parents et ma famille

Je vous remercie de m'avoir toujours soutenue et encouragée dans tout ce que j'ai entrepris et ce malgré la distance. Merci pour votre soutien et votre amour. Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance envers vous.

A mes amis

Je vous remercie pour votre soutien tout au long de ces années.

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Unité de Biologie des Tumeurs de l'Institut de Cancérologie de Lorraine dirigée par Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN, au sein de l'unité de recherche CNRS UMR 7039 CRAN, Université de Lorraine.

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications:

- Périodiques internationaux à comité de lecture:

1 - **Lion M.**, Harlé A., Salleron J., Ramacci C., Campone M., Merlin J.L. Trastuzumab as pre-operative monotherapy does not inhibit HER2 downstream signaling in HER2 positive breast cancer. *Oncology Letters*. 2015 *accepté Octobre 2015*.

2 - Harlé A., **Lion M.**, Lozano N., Husson M., Harter V., Genin P., Merlin J.L. PIK3CA exon 9 and 20 mutations analysis of breast cancers using PCR HRM and PCR ARMS: Relation with clinicopathologic criteria. *Oncology Reports*. 2013 *Mar;29(3):1043-52*.

3 - Merlin J.L., Harlé A., **Lion M.**, Ramacci C., Leroux A. Expression and activation of P38-MAP kinase in invasive ductal breast cancers: relation with estrogen receptor, HER2 expression and downstream signaling phosphorylated proteins expression. *Oncology Reports*. 2013 *Oct;30(4):1943-8*.

- Périodiques nationaux à comité de lecture:

1 - Harlé A., **Lion M.**, Lozano N., Merlin J.L. Signification clinique, diagnostique et intérêt théranostique des mutations du gène *PIK3CA* dans le cancer du sein. *Bulletin du Cancer*. 2013 *Oct;100(10):947-54*.

Communications orales:

1 - Etude de nouveaux biomarqueurs tumoraux et détermination de leurs impacts sur la réponse aux thérapies ciblées dans le traitement des cancers du sein. **3^{ème} Prix de Thèse Chugai - SFPO 2015**. *Congrès SFPO, 14 au 16 Octobre 2015, Nantes, France*.

2 - Tumor signaling alteration in HER2 positive breast cancer treated by preoperative Trastuzumab - Everolimus. *36th EORTC-PAMM Winter Meeting, 21 au 24 Janvier 2015, Marseille, France*.

Communications affichées :

1 - Merlin J.L., **Lion M.**, Wong J., Bachelot T., André F., Treilleux I., Loussouarn D., Bonneterre J., Rios M., Diéras V., Jimenez M., Leroux A., Campone M. Alterations of intratumoral signaling in breast cancer patients receiving pre-operative trastuzumab alone or combined with everolimus. *Annual SABCS 2014, 9 au 13 Décembre 2014, San Antonio, Texas.*

2 - Merlin J.L., **Lion M.**, Wong J., Bachelot T., André F., Treilleux I., Loussouarn D., Bonneterre J., Rios M., Diéras V., Jimenez M., Leroux A., Campone M. Quantitative analysis of tumor expression of phosphoproteins from PI3-kinase and MAP-kinase signaling pathways as biomarkers of the biological and clinical activity of trastuzumab and everolimus in breast cancer. *Annual SABCS 2013, 10 au 14 Décembre 2013, San Antonio, Texas.*

3 - Harlé A., **Lion M.**, Rouyer R., Lozano N., Merlin J.L. Comparative evaluation of three real-time PCR assays for the detection of PIK3CA somatic mutations in formalin-fixed paraffin embedded breast carcinomas. *AACR Molecular Targets And Cancer Therapeutics, 19 au 23 Octobre 2013, Boston, MA.*

4 - Merlin J.L., Harlé A., **Lion M.**, Chrétien A.S., Ramacci C., Leroux A. Activation of P38MAP kinase in estrogen positive invasive breast cancers : Relation with HER2 and downstream signaling phosphorylated proteins expression. *ASCO annual meeting 2013, 31 Mai au 4 Juin 2013, Chicago, IL, J Clin Oncol 31: 2013 (suppl; abstr e11560).*

5 - Merlin J.L., Harlé A., **Lion M.**, Chrétien A.S., Ramacci C., Leroux A. Expression of phosphorylated proteins from PI3-kinase and MAP-kinase signaling pathways in infiltrating breast cancer: relation with histopathologic and molecular subtypes. *ESMO Impakt Breast cancer conference 2013, 2 au 4 Mai 2013, Bruxelles, Belgique, Ann Oncol 24: 2013 (suppl ; abstr 735).*

6 - Harlé A., **Lion M.**, Lozano N., Husson M., Harter V., Genin P., Merlin J.L. PIK3CA exon 9 and 20 mutations analysis of breast cancers using PCR-HRM and PCR ARMS: Relation with clinicopathologic criteria. *14èmes journées du GPCO, 15 et 16 Novembre 2012, Paris.*

7 - Harlé A., Lozano N., **Lion M.**, Husson M., Rouyer M., Ramacci C., Genin P., Merlin J.L. Highly sensitive determination of PIK3CA exon 9 and 20 hotspot mutations in breast tumors. *ASCO annual meeting 2012, 1er au 5 Juin 2012, Chicago, IL, J Clin Oncol 30, 2012 (suppl; abstr TPS10634)*

8 - Harlé A., **Lion M.**, Lozano N., Nicolaizeau C., Rouyer M., Husson M., Ramacci C., Genin P., Merlin J.L. Analyse des mutations PIK3CA: Nouveau biomarqueur de personnalisation thérapeutique dans les cancers du sein et dans les cancers colorectaux. *7ème Journée Claude Huriet de la Recherche clinique, 2 Mars 2012, Nancy.*

Table des Matières

Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	9
Liste des abréviations	10
Introduction Générale	15
Chapitre I	18
I. Introduction bibliographique et objectifs du travail	19
I.1. Le cancer du sein - Généralités	19
I.2. Signalisation cellulaire et cancérogenèse mammaire.....	22
I.2.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase	22
I.2.1.1. Les récepteurs HER.....	23
I.2.1.2. Le récepteur IGF1	26
I.2.2. Signalisation en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase	27
I.2.2.1. La voie PI3K/AKT/mTOR.....	28
I.2.2.2. La voie RAS/RAF/MAPKinases	34
I.2.2.3. La voie P38MAPKinase	38
I.3. Hétérogénéité moléculaire des cancers du sein.....	40
I.4. Thérapies ciblées dans le traitement du cancer du sein.....	42
I.4.1. Les anticorps monoclonaux	42
I.4.1.1. HERCEPTIN® Trastuzumab	43
I.4.1.2. KADCYLA® Trastuzumab/Emtansine	44
I.4.1.3. PERJETA® Pertuzumab	45
I.4.1.4. AVASTIN® Bévacicumab	46
I.4.2. Les inhibiteurs de kinase	47
I.4.2.1. TYVERB® Lapatinib	47
I.4.2.2. AFINITOR® Everolimus	48
I.5. Mécanisme de résistance aux thérapies ciblées dans le traitement du cancer du sein.....	50
I.6. Notion de biomarqueurs en oncologie: intérêt de la détermination de nouveaux biomarqueurs dans la prise en charge du cancer du sein	52
I.7. Objectifs du travail	53

Chapitre II	55
II. Mutations du gène <i>PIK3CA</i> dans les cancers du sein	56
II.1. Analyse des mutations des exons 9 et 20 du gène <i>PIK3CA</i> par technique de PCR-HRM et PCR-ARMS dans les cancers du sein et étude des corrélations clinico-biologiques.....	57
II.2. Signification clinique, diagnostique et intérêt théranostique des mutations du gène <i>PIK3CA</i> dans le cancer du sein	70
Chapitre III	79
III. Exploration de la fonctionnalité des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPK par immunoanalyse multiplexe (Bioplex Protein Array)	80
III.1. Expression et activation de la P38MAPKinase dans les tumeurs mammaires canalaire invasives: corrélation entre le statut des récepteurs hormonaux, le statut HER2 et les phosphoprotéines des voies de signalisation en aval.	81
III.2. Détermination de marqueurs prédictifs de réponse à l'association trastuzumab-évérolimus, en situation pré-opératoire dans les cancers du sein localisés surexprimant HER2:Essai RADHER.90	
III.3. Le trastuzumab en monothérapie et en préopératoire n'inhibe pas la signalisation en aval des récepteurs HER2 dans les cancers du sein HER2+.	103
Chapitre IV	127
IV. Discussion Générale	128
Chapitre V	139
V. Conclusion	140
Annexe	142
Bibliographie.....	152

Liste des figures

Figure 1: Structure de la glande mammaire en coupe sagittale	19
Figure 2: Les récepteurs à activité tyrosine kinase	23
Figure 3: Structure des récepteurs HER	24
Figure 4: Les 4 récepteurs HER dimérisés et leurs ligands	25
Figure 5: Les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases	27
Figure 6: Activités catalytiques de PI3K et PTEN	30
Figure 7: Substrats et fonctions cellulaires régulées par AKT	31
Figure 8: Composition et cibles des complexes mTORC1 et mTORC2	33
Figure 9: Les différents effecteurs intervenant dans les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases	37
Figure 10: Voies de signalisation des MAPKinases.....	39
Figure 11: Structure d'un anticorps monoclonal de type IgG.	42
Figure 12: Site de fixation du trastuzumab.	44
Figure 13: Mécanisme d'action du T-DM1	45
Figure 14: Site de fixation du pertuzumab.....	46
Figure 15: Schéma récapitulatif des mécanismes d'action des thérapies ciblées utilisées dans la prise en charge du cancer du sein.....	49
Figure 16: Schéma du gène <i>PIK3CA</i>	51
Figure 17: Les différentes étapes de l'analyse par la technique Bioplex Protein Array.....	96
Figure 18: Niveaux d'expression des phosphoprotéines p-MEK1, p-ERK1/2, p-P38MAPK avant et après traitement.	98
Figure 19: Boucle de rétrocontrôle négatif incluant S6K, IRS1, PI3K et RAS.....	101
Figure 20: Interactions entre les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases. .	133
Figure 21: Expansion clonale des cancers selon le modèle Darwinien.	135

Liste des tableaux

Tableau I: Classification TNM du cancer du sein, 7e édition 2010	20
Tableau II: Le grade SBR modifié par Elston et Ellis.....	21
Tableau III: Récapitulatif des caractéristiques des principaux sous-types moléculaires.....	41

Liste des abréviations

4EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-Binding Protein 1

AA: Acide Aminé

Ac: Anticorps

ADCC: Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity (Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AFA: Alcool, Formol, Acide acétique

AKT: du nom d'un oncogène viral (anciennement appelée Protéine Kinase B)

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché

AR: Amphiréguline

ARN: Acide RiboNucléique

ASK1: Apoptosis Signal regulatory Kinase 1

ATF: Activating Transcription Factor

ATP: Adénosine Triphosphate

BPA: Bioplex Protein Array

BRCA 1 et 2: Breast Cancer 1 et 2

BRAF: v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

BTC: Beta-celluline

CA 15.3: Cancer Antigen 15.3

CISH: Chromogenic In Situ Hybridization

CK: Cytokératine

CREB: C-AMP Response Element Binding protein

CRK: CT10 Regulator of Kinase aussi appelé proto-oncogène c-Crk ou P38

Deptor: DEP domain-containing mTOR-interacting protein

DNA: DeoxyriboNucleic Acid

dNTP: desoxyribonucléotide triphosphate

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

elf4E: eukaryotic Initiation factor eIF4E like protein

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPR: Epiréguline

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

FAB: Fragment Antibody Binding
FAK: Focal Adhesion Kinase
FDA: Food and Drugs Administration
FFPE: Formalin Fixed Paraffin Embedded
FISH: Fluorescence In Situ Hybridization
FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor (Récepteur aux facteurs de croissance des fibroblastes)
FKBP-12: FK506-Binding Protein 12
FKBP-38: FK506-Binding Protein 38
FLT-1: FMS-Like Tyrosine kinase-1
FOXA1: Forkhead box A1
FOXO3a: Forkhead box class O 3a
GADD153: Growth Arrest-and DNA Damage-inducible gene 153
GAP: GTPase Activating Protein
GATA3: GATA binding protein 3
GDP: Guanosine Diphosphate
GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor
Grb2: Growth Factor Receptor-Binding Protein 2
GSK3 β : Glycogene synthase kinase 3 β
GTP: Guanosine Triphosphate
HB-EGF: Heparin Binding- Epidermal Growth Factor
HER: Human Epidermal Growth Factor Receptor (Récepteur du facteur de croissance épidermique humain)
HES: Hématoxyline-Eosine-Safran
HRAS: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
Ig: Immunoglobuline
IGF1: Insulin Growth Factor 1
IGF2: Insulin Growth Factor 2
IGF1-R: Insulin Growth Factor 1 Receptor
IHC: Immunohistochimie
ICL: Institut de Cancérologie de Lorraine
INCa: Institut National du Cancer
IR: Insulin Receptor (Récepteur à l'Insuline)
IRS-1: Insulin Receptor Substrate-1
ITK: Inhibiteur de Tyrosine Kinase
IV: Intraveineuse

JNK: c Jun N-terminal Kinase
kDa: KiloDalton
KRAS: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KDR: Kinase insert Domain protein Receptor
MAP: Mitogen-Activated Protein
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase (= MKK)
MED1: Mediator complex subunit 1
MEF: Myocyte Enhancer Factor
MEK: Mitogen-activated Extracellular signal regulated Kinase-activating kinase
mLST8: mammalian Lethal with Sec 13 protein 8 (= GβI)
mSIN-1: mammalian Stress-activated protein kinase INteracting protein-1
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1: mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
mTORC2: mammalian Target Of Rapamycin Complex 2
MUC4: Membrane-associated glycoprotein mucin
NGS: Next Generation Sequencing
NK: Natural Killer
NRAS Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NRGs: Neurorégulines
OS: Overall Survival
P38MAPKinase: P38 Mitogen Activated Protein Kinase
P70S6K: Phospho-70 Sérine 6 Kinase
P90RSK: Phospho-90 ribosomal S6 Kinase
pAKT: phospho-AKT
PCR: Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PCR-HRM: PCR- High Resolution Melting
PCR-ARMS-Scorpions: PCR-Amplification Refractory Mutational System
PDGFR: Plateled Derivated Growth Factor Receptor (Récepteur aux facteurs de croissance des plaquettes)
PDK1: Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
PE: Phycoérythrine
p-EGFR: phospho-EGFR
p-ERK1/2: phospho-ERK 1/2
PFS: Progression Free Survival (survie sans progression)

p-GSK3 β : phospho-GSK3 β
PH: Pleckstrin Homology
PHRC: Programme Hospitalier de Recherche Clinique
PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIK3CA: gène codant pour la sous-unité catalytique de PI3K
PIK3R1: gène codant pour la sous-unité régulatrice de PI3K
PIP: Phosphatidylinositol-3-phosphate
PIP2: Phosphatidylinositol-3, 4-diphosphate
PIP3: Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate
PLD1: Phospholipase D1
p-MEK: phospho-MEK
PMSF: Phenylmethylsulfonylfluoride
p-P38MAPK: phospho-P38MAPK
p-P70S6K: phospho-P70S6K
PRAS 40: Prolin- Rich AKT Substrate 40
PTEN: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Raptor: Regulatory associated protein of m-TOR
RAS: Rat Sarcoma Virus
RE: Récepteurs aux œstrogènes
RH: Récepteurs hormonaux
Rheb: Ras homolog enriched in brain
Rictor: Rapamycin insensitive companion of m-TOR
RNase: Ribonucléase
RP: Récepteurs à la progestérone
RTK: Récepteur à activité Tyrosine Kinase
S6K1: S 6 Kinase 1
S6K: S 6 Kinase
SBR (EE): Scarff - Bloom Richardson (Elston Ellis)
SHc: Src Homology
SH2: Src Homology 2
SISH: Silver In Situ Hybridization
SKP2: S-phase Kinase associated Protein -2
SOS1: Son of sevenless homolog 1
Src: Sarcoma Virus

T-DM1: Trastuzumab emtansine

TGF α : Transforming Growth Factor α

TK: Tyrosine Kinase

TN: Tumeurs Triple-Négatives

TNF: Tumour Necrosis Factor

TNM: Tumor Node Metastasis

TSC: Tuberous Sclerosis Complex

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (Récepteur aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire)

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

Introduction Générale

Introduction Générale

Le cancer du sein constitue un véritable problème de santé publique. En 2012, il représentait 25,2% du total des nouveaux cas de cancers féminins et 14,7% du total des décès dans le monde (1). En France, avec près de 49000 nouveaux cas recensés la même année, le cancer du sein demeure le cancer le plus fréquemment diagnostiqué et la première cause de mortalité chez la femme (2, 3).

L'apport de la biologie moléculaire ces vingt dernières années a permis d'établir que le cancer était une maladie de la signalisation cellulaire (4). La caractérisation des principales voies de signalisation et la détection de nombreuses altérations génomiques au niveau de celles-ci ont mis en évidence l'implication majeure de la signalisation cellulaire dans les processus de cancérogenèse. Des cibles moléculaires ont ainsi été identifiées et ont permis le développement de thérapeutiques dites ciblées.

Contrairement aux chimiothérapies conventionnelles qui sont non spécifiques, les thérapies ciblées sont dirigées contre une cible moléculaire particulière présente au niveau des cellules tumorales et détruisent alors spécifiquement celles-ci limitant ainsi la toxicité. Le développement des thérapies ciblées a ainsi élargi les possibilités de traitement et a amélioré le pronostic de certains types de cancer du sein.

Les caractéristiques moléculaires de la tumeur font désormais partie intégrante des critères nécessaires à la décision thérapeutique et viennent s'ajouter aux paramètres cliniques et histologiques. Cette caractérisation est d'autant plus importante du fait de la grande hétérogénéité des cancers du sein qui rend la prise en charge complexe.

Les applications cliniques découlant de la mise en évidence d'altérations génomiques restent cependant encore limitées. Actuellement, seuls quelques biomarqueurs sont utilisés en routine dans la pratique. Il s'agit notamment du statut HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) dont la surexpression et/ou l'amplification génique jouent un rôle dans les mécanismes tumoraux mais aussi du statut hormonal des tumeurs (recherche d'une surexpression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone). Ce sont les seuls biomarqueurs qui bénéficient actuellement d'une thérapeutique ciblée pour le traitement des cancers du sein.

De nombreuses autres altérations sont retrouvées dans les cancers du sein, parmi lesquelles nous pouvons citer les mutations du gène *P53* qui sont les plus fréquentes (20 à 40% des cas) mais aussi les mutations du gène *PIK3CA* retrouvées dans 25% des tumeurs mammaires (5-9). De nombreuses molécules ciblant entre autres ces anomalies font actuellement l'objet d'essais cliniques.

Malgré des progrès importants aussi bien thérapeutiques que technologiques, de nombreux mécanismes impliqués dans la cancérogenèse ainsi que dans le développement des résistances aux traitements restent encore à élucider. L'amélioration de la connaissance des voies de signalisation et des différents effecteurs qui les constituent est indispensable pour l'identification et la validation de nouveaux biomarqueurs moléculaires tumoraux aussi bien diagnostiques, prédictifs de réponse aux traitements que pronostiques.

Chapitre I

Introduction bibliographique et objectifs du travail

I. Introduction bibliographique et objectifs du travail

I.1. Le cancer du sein - Généralités

D'un point de vue histologique, on distingue les cancers canaux caractérisés par la prolifération des cellules tapissant les canaux galactophores, des cancers lobulaires qui eux se développent à partir de l'épithélium tapissant les lobules du sein (**Figure 1**) (10, 11). Les cancers du sein peuvent être non invasifs, sans franchissement de la membrane basale par les cellules néoplasiques, ces cancers sont appelés cancers *in situ*, ou alors invasifs caractérisés par un franchissement de la membrane basale par les cellules tumorales, on parle alors de cancers infiltrants. Les carcinomes canaux infiltrants représentent 80% du total des cancers du sein contre seulement 5 à 10% de carcinomes lobulaires infiltrants (11).

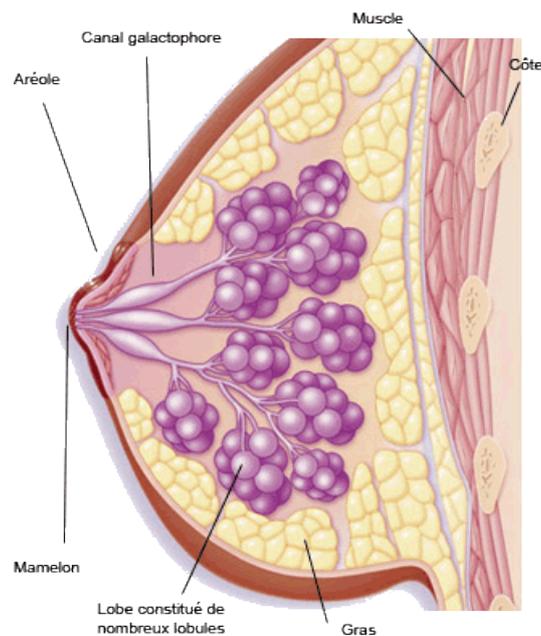


Figure 1: Structure de la glande mammaire en coupe sagittale

La glande mammaire est constituée de lobules produisant le lait et de canaux galactophores assurant le transport du lait au mamelon. Les cancers du sein se développent à partir des lobules (cancers lobulaires) ou des canaux (cancers canaux). D'après le site internet de la ligue contre le cancer: <https://www.ligue-cancer.net/>.

Les cancers du sein sont classés selon la classification TNM (Tumor, Node, Metastasis). Cette classification prend en compte trois critères afin de caractériser l'agressivité de la tumeur et de définir plusieurs stades de tumeurs mammaires allant de I à IV. Le T fait référence à la taille de la tumeur primitive, le N (pour Node) à la présence ou non d'un envahissement ganglionnaire lymphatique, et le M à la présence ou non de métastases (**Tableau I**).

Tableau I: Classification TNM du cancer du sein, 7e édition 2010. D'après le Guide d'Affection Longue Durée de la HAS et de l'INCa "Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique - Cancer du sein", Janvier 2010.

Classification TNM	
T : Taille de la tumeur primitive	
Tx	Détermination de la tumeur primitive impossible
T0	Pas de signe de tumeur primitive (non palpable)
Tis	Carcinome <i>in situ</i>
T1	Tumeur < 2cm dans sa plus grande dimension T1a : Tumeur >0.1cm et ≤0.5cm T1b : Tumeur > 0.5cm et ≤1cm T1c : Tumeur > 1cm et ≤2cm
T2	Tumeur >2 cm et ≤5 cm
T3	Tumeur > 5cm
T4	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique (côtes, m. intercostaux, grand dentelé) (a) ou à la peau (b) T4a : extension à la paroi thoracique T4b : œdème y compris la « peau d'orange » ou ulcération cutanée du sein, ou nodules de perméation cutanés limités au même sein T4c : 4a et 4b
N: Node, présence ou non d'une atteinte ganglionnaire	
Nx	Impossibilité d'apprécier l'atteinte ganglionnaire
N0	Absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional
N1	Ganglions axillaires de niveau I et II homolatéraux mobiles
N2	Métastases dans un ou plusieurs ganglions axillaires de niveau I et II homolatéraux fixés ou confluents ou dans un ou plusieurs ganglions mammaires internes homolatéraux cliniquement détectables en l'absence de métastase ganglionnaire axillaire cliniquement évidente N2a : Métastases dans un ou plusieurs ganglions axillaires fixés entre eux ou à d'autres structures N2b : Métastases cliniquement détectables uniquement dans les ganglions mammaires internes et en l'absence de métastase ganglionnaire axillaire cliniquement décelable
N3	Métastases dans les ganglions sous-claviculaires homolatéraux (niveau III) avec ou sans envahissement ganglionnaire axillaire (niveau I et II) ou métastase ganglionnaire interne mammaire homolatérale cliniquement détectable en présence de métastase axillaire (niveau I et II) cliniquement évidente ou métastases ganglionnaires sous claviculaires homolatérales avec ou sans envahissement ganglionnaire axillaire ou mammaire interne N3a : Métastase ganglionnaire sous-claviculaire N3b : Métastase ganglionnaire mammaire interne et axillaire N3c : Métastase ganglionnaire sus-claviculaire
M : Présence ou absence de métastase	
Mx	Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
M0	Absence de métastase à distance
M1	Présence de métastase à distance

Il existe également un grade histopronostique des tumeurs basé lui aussi sur 3 critères. Ces critères sont l'architecture de la tumeur (formations tubulo-glandulaires au sein de la tumeur), les atypies cytonucléaires (pléomorphisme nucléaire) et le nombre de mitoses (fonction du diamètre du champ). Il s'agit du grade de Scarff-Bloom et Richardson, grade SBR, qui permet de distinguer les tumeurs de bon pronostic, de grade SBR 1, les tumeurs de pronostic intermédiaire, de grade SBR 2, de celles de mauvais pronostic, de grade SBR 3 (Tableau II).

Tableau II: Le grade SBR modifié par Elston et Ellis. D'après le Référentiel Interrégional (Alsace, Bourgogne, Franche-Comté, Lorraine) de prise en charge du cancer du sein 2012 (12).

Grade histopronostique SBR modifié par Elston et Ellis	Score
1. Différenciation tubulo-glandulaire	
Formation tubulo-glandulaire au sein de la tumeur en pourcentage de surface tumorale	
• >75 % : Tumeur bien différenciée	1
• 10-75 % : Tumeur moyennement différenciée	2
• <10 % : Tumeur peu différenciée	3
2. Pléomorphisme nucléaire: degré d'atypie apprécié sur la population tumorale prédominante	
• Noyaux petits, réguliers, uniformes	1
• Pléomorphisme modéré	2
• Variations marquées de taille, de forme, avec nucléoles proéminents	3
3. Nombre de mitoses (à compter sur 10 champs au grossissement x 400)	
• 0 à 6 mitoses	1
• 7 à 12 mitoses	2
• >12 mitoses	3

I.2. Signalisation cellulaire et cancérogenèse mammaire

L'étude de la signalisation cellulaire et la caractérisation de nombreuses voies ces 20 dernières années ont clairement établi leurs implications dans les processus de cancérogenèse. Ces voies de signalisation qui assurent normalement la régulation des fonctions cellulaires et le maintien de l'homéostasie cellulaire sont le siège de nombreuses anomalies génomiques et sont pour certaines fréquemment retrouvées dérégulées dans de nombreux cancers. L'activation des voies de signalisation se fait en amont via des récepteurs transmembranaires, les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK).

I.2.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

En amont de ces voies de signalisation, sont présents des récepteurs à activité tyrosine kinase. Ces récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires possédant des caractéristiques structurales et fonctionnelles similaires (4). Il existe 20 familles de RTK parmi lesquelles nous pouvons citer les récepteurs à insuline (IR), les récepteurs aux facteurs de croissance épidermique (EGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) ainsi que les récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR) (**Figure 2**) (4, 13, 14). Ces récepteurs sont des éléments essentiels du processus de tumorigenèse. Une surexpression, une amplification, ou la présence de mutations activatrices au niveau du domaine kinase de ces récepteurs peuvent aboutir à une hyperactivation des voies de signalisation en aval (15, 16).

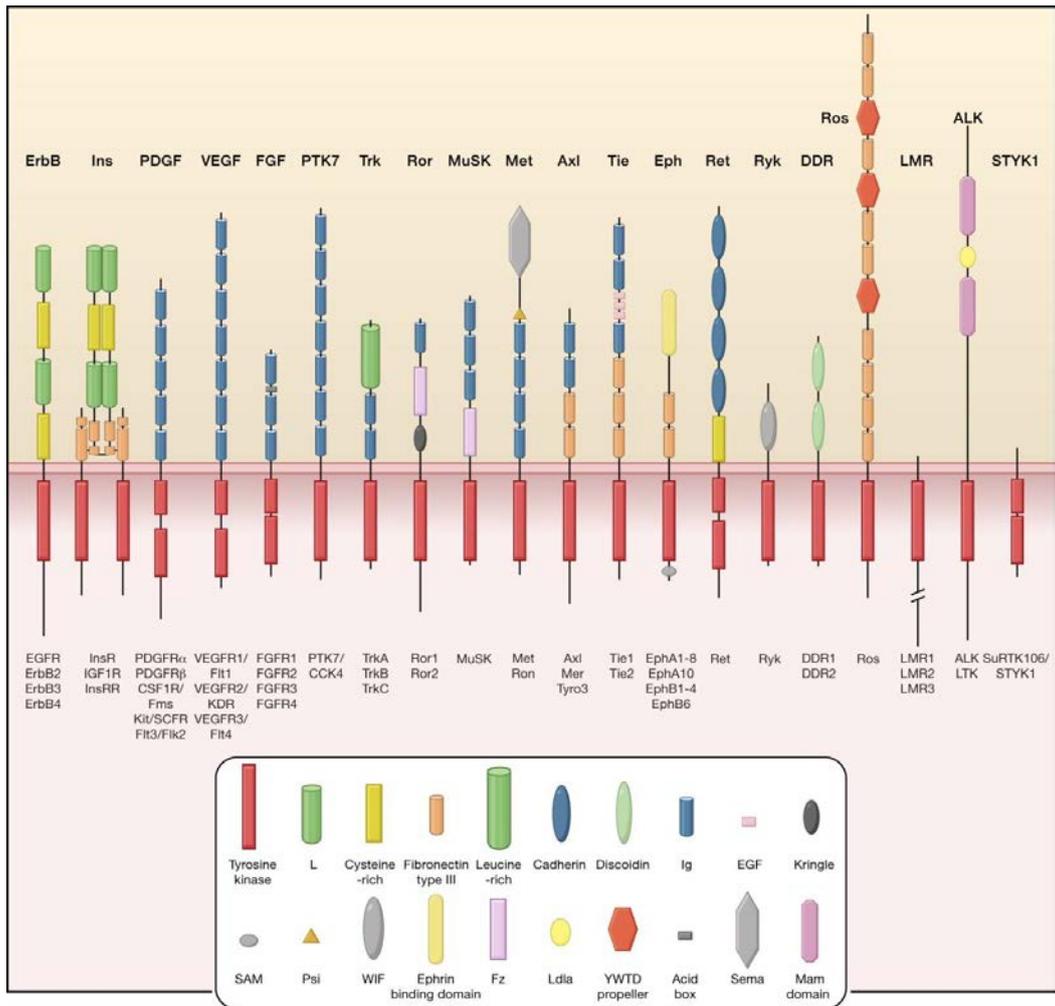


Figure 2: Les récepteurs à activité tyrosine kinase.

Il existe 20 familles de récepteurs à activité tyrosine kinase. Ces récepteurs sont formés d'une partie extramembranaire, d'une partie transmembranaire et d'une partie intracytoplasmique responsable de l'activité tyrosine kinase. D'après Lemmon M. *et al.* (17).

I.2. 1.1. Les récepteurs HER (Human Epidermal Growth Factor Receptor)

Les récepteurs HER, appelés également récepteurs ErbB, appartiennent à la famille des RTK de classe I. Ils sont exprimés dans la quasi-totalité des tissus non hématopoïétiques et sont impliqués dans différents processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, le contrôle du métabolisme cellulaire, la migration, la survie cellulaire, la stimulation de la progression cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (4).

Les récepteurs HER sont des protéines kinases transmembranaires. Il existe quatre récepteurs homologues: HER1 (ou EGFR ou ErbB1), HER2 (ou cErbB2/neu), HER3 (ou ErbB3) et HER4 (ou ErbB4) (15, 18).

Ces récepteurs partagent une forte homologie de structure primaire qui se traduit par une organisation structurale commune caractéristique. Ils sont constitués d'une seule chaîne polypeptidique formant un domaine extracellulaire, domaine de fixation du ligand au récepteur, un domaine hydrophobe transmembranaire en hélice α composé de 23-24 acides aminés, constituant un point d'ancrage dans la membrane plasmique cellulaire, un domaine juxtamembranaire dont le rôle n'est pas entièrement élucidé et un domaine intracytoplasmique renfermant l'activité tyrosine kinase et permettant la transduction du signal au sein de la cellule (**Figure 3**) (4, 15, 18-21).

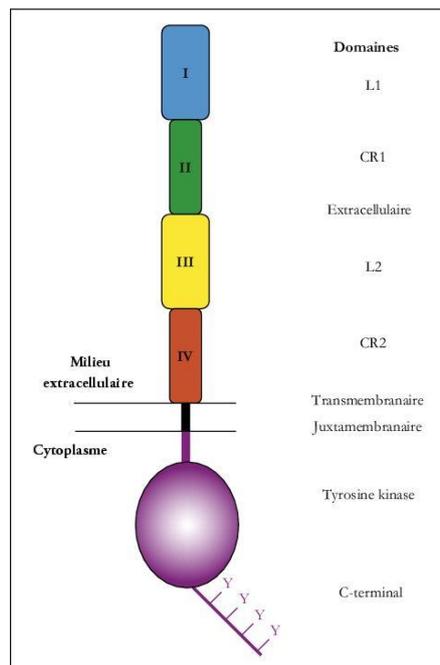


Figure 3: Structure des récepteurs HER

Les récepteurs HER présentent une partie extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. D'après Hubert P. (22).

Les récepteurs HER sont activés par la liaison d'une famille de ligands contenant un domaine EGF-like. Ces ligands peuvent être divisés en 3 groupes. Le premier groupe comprend 3 ligands spécifiques de l'EGFR: l'EGF, le TGF- α (transforming growth factor α), et l'amphiréguline (AR). Le deuxième groupe comprend la bêta-celluline (BTC), l'heparine binding epidermal growth factor (HB-EGF) et l'épireguline (EPR) qui montrent une spécificité double en liant EGFR et HER4. Le troisième groupe est composé de neurorégulines (NRGs) et peut être subdivisé en 3 sous-groupes basés sur leurs capacités à lier HER3 et HER4 (NRG-1 et NRG-2) ou seulement HER4 (NRG-3 et NRG-4) (4).

HER2 ne possède quant à lui pas de ligand identifié. Sa conformation le rend constitutivement actif et rend sa dimérisation possible en permanence (**Figure 4**) (18-20).

L'activation des récepteurs est liée à une homo ou une hétérodimérisation non covalente des récepteurs monomériques en présence du ligand conduisant à une libération de l'activité tyrosine kinase du domaine intracellulaire et à une autophosphorylation du récepteur. L'activité enzymatique des RTK est localisée dans le cytoplasme et permet le transfert du phosphate γ de l'ATP vers l'hydroxyle des résidus tyrosines des protéines cibles et/ou du récepteur lui-même. La disposition dans l'espace des deux domaines catalytiques permet la phosphorylation croisée des résidus tyrosine de chacun d'eux en C-terminal. La phosphorylation de ces résidus permet le recrutement et l'activation de nombreux effecteurs ce qui entraîne l'initiation de plusieurs voies de signalisation. Les différentes protéines recrutées peuvent être des protéines adaptatrices comme SHC (Src Homology), CRK (CT10 Regulator of Kinase), Grb2 (Growth factor Receptor-Bound Protein 2) ou des kinases comme la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase) et Src (Sarcoma virus). Les principales voies de signalisation activées par les récepteurs HER sont les voies RAS (Rat Sarcoma virus)/RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)/MAPKinase (Mitogen-Activated Protein Kinase) et la voie PI3K/AKT (Protéine kinase B)/mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (15, 18, 23).

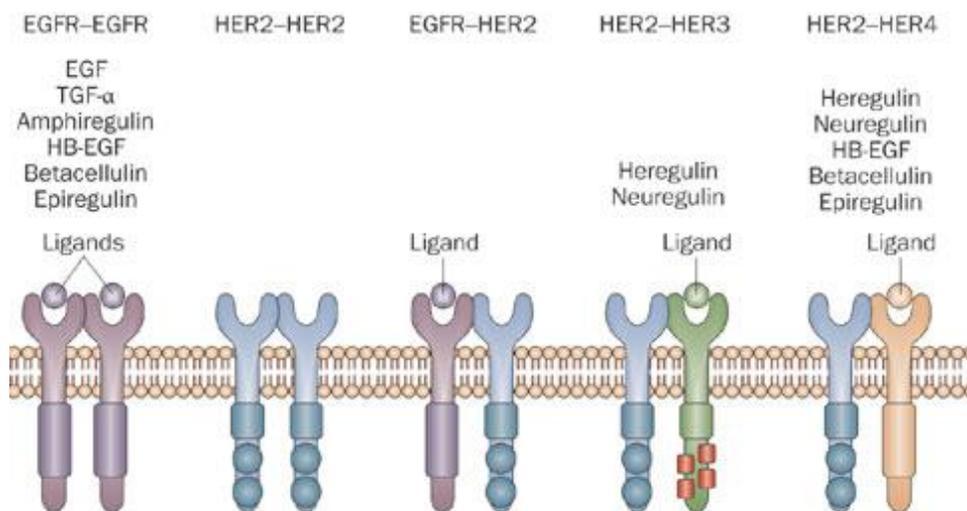


Figure 4: Les 4 récepteurs HER dimérisés et leurs ligands

Les récepteurs HER s'homo/hétérodimérisent de façon non covalente en présence du ligand ce qui conduit à leurs activations. D'après Linardou H. *et al.* (24).

Des études ont montré que l'activation anormale des kinases des récepteurs HER jouait un rôle fondamental dans le développement et la croissance de nombreux cancers (25). Des altérations oncogéniques des récepteurs HER telles que des mutations activatrices ou des surexpressions sont particulièrement retrouvées dans les tumeurs solides et notamment dans les cancers du sein (15).

C'est notamment le cas du récepteur HER2. Le récepteur HER2 est une glycoprotéine transmembranaire de 185 kDa constituée de 1255 acides aminés (AA) (26, 27). L'oncogène HER2 qui code cette protéine a été identifié dans le milieu des années 1980. Il est situé sur le bras long du chromosome 17 (17q12) (26-29). Le récepteur HER2 est surexprimé dans 20 à 30% des cancers du sein (27, 30). Cette surexpression était auparavant synonyme de mauvais pronostic. Mais depuis ces 20 dernières années, plusieurs thérapeutiques anti-HER2 ont été développées : des anticorps monoclonaux tels que le trastuzumab, le pertuzumab, et le T-DM1 mais également un inhibiteur de tyrosine kinase, le lapatinib. L'arrivée de ces molécules sur le marché et particulièrement celle du trastuzumab a considérablement amélioré le pronostic des cancers du sein HER2+.

Une surexpression de ce récepteur est également retrouvée dans d'autres types de tumeurs notamment dans certaines tumeurs digestives, génitales et bronchiques, mais avec une fréquence beaucoup plus faible (30). Ces récepteurs suscitent donc un grand intérêt en tant que cibles de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses (21).

I.2.1.2. Le récepteur IGF1 (IGF1-R)

Le récepteur à l'IGF1 est une glycoprotéine transmembranaire à activité tyrosine kinase qui présente une forte affinité pour l'IGF1 (Insulin Growth Factor 1). Il lie également l'IGF2 (Insulin Growth Factor 2) et l'insuline mais avec une affinité plus faible. Il s'agit d'un hétérotétramère constitué de 4 sous unités: 2 sous-unités α et 2 sous-unités β (31). IGFR-1 est impliqué dans la croissance cellulaire et la survie et joue un rôle dans la tumorigenèse mammaire (32). Il a été mis en évidence que ce récepteur était impliqué dans le pouvoir invasif et métastatique des cancers du sein ainsi que dans la résistance à certains traitements (33). Il est retrouvé sous forme active dans plus de 50% des cancers du sein. Son expression et sa fonction diffèrent en fonction des sous types de tumeurs mammaires (34). La fixation d'un ligand au récepteur conduit à sa phosphorylation et à son activation qui par

l'intermédiaire de IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1) permet l'activation de 2 voies majeures de la signalisation : la voie PI3K/AKT/mTOR et la voie RAS/RAF/MAPKinases (32, 34).

I.2.2. Signalisation en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase

Les voies de signalisation cellulaire permettent le maintien de l'homéostasie cellulaire en régulant les principales fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, les phénomènes d'adhésion, de migration, de survie, de mort cellulaire ainsi que les mécanismes de l'angiogenèse (5, 35). Deux voies de signalisation ont été particulièrement étudiées ces dernières années. Il s'agit des voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases. Ces deux voies ont une implication majeure en oncogénèse mammaire et sont souvent étudiées comme cibles potentielles de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses (**Figure 5**). Les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases initialement décrites comme des voies de signalisation linéaires présentent en réalité de multiples points de convergence et sont interconnectées à de nombreux niveaux ce qui leur permet de se réguler mutuellement en fonction des conditions cellulaires. Il existe de nombreux cross-talk entre ces 2 voies notamment au niveau de PI3K et de RAS (36-38) (**Figure 5**). Il a également été mis en évidence une boucle de rétrocontrôle négatif impliquant S6K-IRS1-PI3K-RAS ainsi qu'une convergence au niveau de mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) (37, 39, 40).

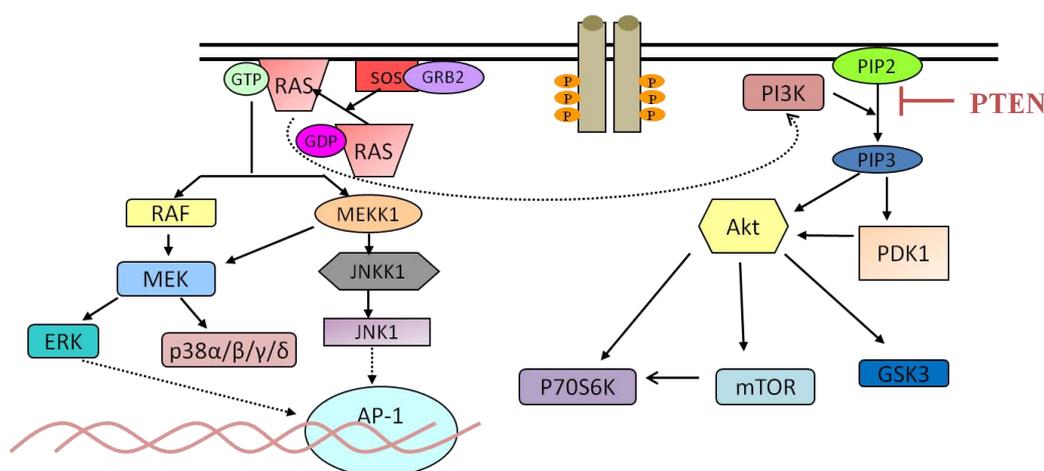


Figure 5: Les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases

Les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases font intervenir de nombreux effecteurs et sont interconnectées à plusieurs niveaux.

I.2.2.1. La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire située en aval des récepteurs HER et jouant un rôle clé dans l'homéostasie cellulaire. Elle régule les principales fonctions cellulaires dont notamment l'apoptose, la croissance, le cycle cellulaire ainsi que l'angiogenèse (5, 35). Cette voie est dérégulée dans de nombreux cancers et particulièrement dans les carcinomes mammaires, la plupart des protéines la constituant pouvant être mutées, délétées ou surexprimées selon les cas (5, 6, 41, 42).

- La PI3Kinase (PI3K)

Les PI3Kinases sont des enzymes à activité lipide kinase capables de phosphoryler les phosphoinositides en position 3 du noyau inositol pour produire des D3 phosphoinositides considérés comme seconds messagers. Cette réaction mène à l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire qui régulent les fonctions comme le métabolisme cellulaire, la survie cellulaire, la croissance cellulaire, la prolifération et le trafic vésiculaire (43). Les PI3K possèdent également une activité sérine thréonine kinase.

La famille des PI3K est composée de trois classes (classe I, classe II, classe III) qui diffèrent par leurs caractéristiques structurales, leurs distributions tissulaires, leurs mécanismes d'activation et leurs fonctions. Les PI3K de classe I sont divisées en 2 sous-classes dépendantes des récepteurs auxquels elles se couplent. On distingue la sous classe IA correspondant aux PI3kinases activées par les RTK, les récepteurs couplés aux protéines G ainsi que par certains oncogènes (tel que *RAS*) et la classe IB qui elle comprend uniquement des PI3Kinases régulées par les récepteurs couplés aux protéines G. Des 3 classes, la classe IA est la plus fréquemment impliquée dans les cancers (43-46).

Les PI3K se présentent généralement sous forme d'hétérodimères constitués de 2 sous-unités: une sous-unité régulatrice p85 et une sous-unité catalytique p110 α . La sous-unité régulatrice p85 codée par le gène *PIK3R1*, possède un domaine SH2 (Src Homology 2) qui, dans un premier temps lui permet de se lier à une tyrosine du récepteur, phosphorylée par SRC (Sarcoma Virus, protéine K cytosolique). PI3K est ensuite phosphorylée par le récepteur et activée. SRC peut également directement phosphoryler la PI3K et l'activer. La sous-unité catalytique p110 α , à activité lipide kinase est codée par le gène *PIK3CA*, localisé sur le

chromosome 3. Elle phosphoryle le phosphatidylinositol-3, 4-biphosphate (PIP2) en position 3' du noyau inositol générant du phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PIP3). Ce PIP3 permet le recrutement d'autres effecteurs cellulaires au niveau de la membrane plasmique, dont notamment la kinase AKT, et entraîne donc l'activation de multiples voies de signalisation situées en aval (**Figure 5**) (4-6, 38, 43, 44, 47, 48).

- PTEN

PI3K peut être régulée négativement par une phosphatase, la protéine PTEN. PTEN, aussi connue sous le nom de MMAC1 ou TEP, est codée par un gène suppresseur de tumeur de 105kb, constitué de 9 exons, localisé sur le chromosome 10 (position 10q23.3), et ayant un rôle-clef dans l'inhibition de la prolifération cellulaire (49, 50). PTEN est liée à la membrane cellulaire par un domaine C2 et est régulée négativement par SRC. Elle possède une activité phosphatase qui déphosphoryle spécifiquement le PIP3 en PIP2 (5, 50, 51) et régule ainsi la fonction de PI3K ce qui aboutit à la régulation négative de l'expression d'AKT (**Figure 6**). Elle empêche la croissance tumorale en antagonisant l'activité tyrosine kinase et réduit ainsi l'envahissement cellulaire tumoral et métastatique (46). Sa perte de fonction est fréquente dans les tumeurs solides et peut être due à des mutations, à des délétions, à une perte d'hétérozygotie, à une modulation épigénétique ou encore à une instabilité protéique (43, 46, 52-54). La perte d'expression de la protéine s'accompagne de la méthylation du promoteur de PTEN. Cette perte a été rapportée dans presque 50% des tumeurs mammaires (55). Il a été mis en évidence que l'efficacité du trastuzumab était dépendante de PTEN et de sa capacité à inhiber la voie PI3K. Par conséquent, la perte d'expression de PTEN est liée à une mauvaise réponse au traitement par trastuzumab (55-59). PTEN pourrait être un facteur prédictif de réponse au trastuzumab.

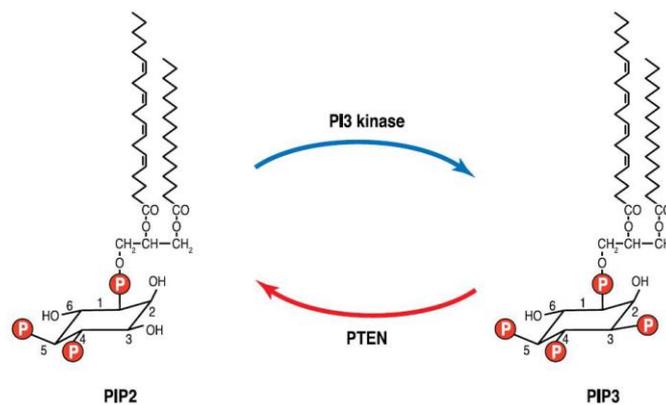


Figure 6: Activités catalytiques de PI3K et PTEN

PI3K phosphoryle PIP2 en PIP3. PTEN régule négativement la voie PI3Kinase en déphosphorylant PIP3 en PIP2. D'après J. Robert (4).

- AKT

AKT également appelée Protéine kinase B (PKB) est une sérine thréonine kinase de 59 kDa, appartenant au groupe des kinases AGC (60). Il existe 3 isoformes de cette kinase: AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) et AKT (PKB γ) codées par des gènes distincts (61). L'activité d'AKT est modulée en amont par la PI3Kinase. Par l'intermédiaire de son domaine PH terminal (domaine d'homologie à la pleckstrine) situé en N-terminal, AKT est recrutée à la membrane au niveau des sites contenant PIP-3 et PIP-2 générés par la PI3kinase. Une fois recrutée à la membrane, AKT1 est doublement phosphorylée à la fois au niveau du domaine catalytique (thr308) par PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1) et au niveau du domaine hydrophobe carboxy terminal (Ser473) par mTORC2 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 2) (62). AKT est transitoirement localisée à la membrane pendant son activation et peut phosphoryler et donc activer de nombreuses protéines cytosoliques ou nucléaires impliquées dans la régulation de la croissance et de la survie cellulaire (60, 62, 63) dont notamment GSK-3 (Glycogen Synthase 3 β), FOXO (Forkhead transcription factor) et TSC-2 (Tuberous Sclerosis Complex 2) (43) (**Figure 7**). AKT joue donc un rôle majeur dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Des études ont mis en évidence qu'AKT était activée dans de nombreux cancers, cette activation pouvant être le résultat d'une amplification génique ou de mutations activatrices (43, 61). Une augmentation de sa phosphorylation a été observée dans les cancers bronchiques, les leucémies myéloïdes, les cancers de la prostate ainsi que dans les cancers du sein (64-66).

Bien que les mécanismes à l'origine de cette activation ne soient pas totalement élucidés, cette activation joue un rôle clef dans le développement tumoral.

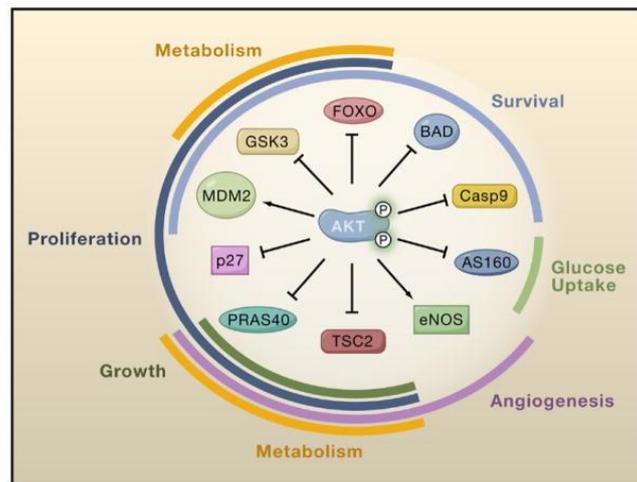


Figure 7: Substrats et fonctions cellulaires régulées par AKT

AKT est responsable de la phosphorylation de nombreux substrats permettant la régulation de multiples fonctions cellulaires telles que la survie, la croissance cellulaire, la prolifération et l'angiogénèse. D'après Manning BD. *et al.* (63).

- mTOR

mTOR est une sérine thréonine kinase de 289 kDa initialement décrite comme la cible d'un macrolide immunosuppresseur, la rapamycine (39, 67). La rapamycine bloque l'activité de mTOR en se liant à l'immunophiline (FKBP12). Le complexe rapamycine/FKBP12 se lie ensuite à mTOR empêchant ainsi la transduction du signal en aval (67-69).

Située en aval de PI3K, cette kinase est impliquée dans la progression des cellules de la phase G1 à la phase S, ainsi que dans de nombreux autres signaux cellulaires (67). Elle régule le métabolisme cellulaire, la croissance, la prolifération et la survie cellulaire, et est également impliquée dans l'autophagie, la transcription des gènes, et la biosynthèse des ribosomes (70). mTOR est hyperactivée dans de nombreux cancers. Cette hyperactivation peut être due à des mutations, des amplifications ou à la perte de la régulation en amont (39, 71, 72).

mTOR est constituée de 2 complexes protéiques: mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) et mTORC2 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 2) qui diffèrent dans leur composition, leur régulation ainsi que dans leur fonction (67, 70, 71, 73).

➤ mTORC1

mTORC1 est composé d'une sous unité régulatrice Raptor (Regulatory associated protein of mTOR) qui permet le recrutement de substrats pour la phosphorylation du domaine kinase de mTOR. Ce complexe est également constitué de la protéine mLST8 (mammalian Lethal with Sec13 protein 8, aussi appelée GβL), de PRAS40 (Proline-Rich AKT Substrate 40) et de la protéine Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) (39, 70, 73). mTORC1 contrôle la croissance cellulaire, la transcription, la traduction ainsi que les processus post-traductionnels (73). L'activité de mTORC1 est régulée par 2 suppresseurs de tumeurs TSC1 et TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 1 et 2). TSC 2 est une GTPase Activating Protein (GAP) qui réprime la petite protéine G Rheb-GTPase (Ras homolog enriched in brain) qui lorsqu'elle est liée au GTP est un puissant activateur de mTORC1. La phosphorylation de TSC2 par AKT et/ou ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) ou encore P90RSK (P90 Ribosomal S6 Kinase) entraîne l'inhibition de l'activité de TSC2 sur Rheb conduisant à l'activation de mTORC1 (43, 67, 73). D'autres mécanismes d'activation de mTORC1 faisant intervenir FKBP38 (FK506 Binding Protein 38) ou encore PLD1 (Phospholipase D1) ont été proposés, mais ces mécanismes restent partiellement élucidés (73). mTORC1 joue un rôle important dans la voie de signalisation IGF. Il contrôle également deux régulateurs de la synthèse protéique S6K 1/2 et 4EBP1 (4E Binding protein 1) (67, 69, 73). D'une part, mTORC1 phosphoryle et active S6K1 et 2 permettant ainsi la synthèse protéique, d'autre part il phosphoryle et inactive 4EBP1 entraînant de ce fait la levée de l'inhibition de elf4E (eukariotic Initiation factor 4E) (10, 37, 43, 70). mTORC1 exerce également un rétrocontrôle négatif sur la voie PI3K via S6K1 et IRS1 (37, 39, 71) (**Figure 8**).

➤ mTORC2

mTORC2 est quant à lui composé d'un polypeptide appelé Rictor (Rapamycin insensitive companion of m-TOR), ainsi que des protéine Protor, mSIN-1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein), Deptor et mLST8 (39, 67, 70, 73). mTORC2 phosphoryle et active des protéines du groupe AGC kinases et notamment AKT par phosphorylation de son résidu Sérine 473 ce qui entraîne la phosphorylation de nombreux substrats en aval.

mTORC2 est impliqué dans la progression cellulaire, le métabolisme et la coordination du cytosquelette (67, 71, 73) (**Figure 8**).

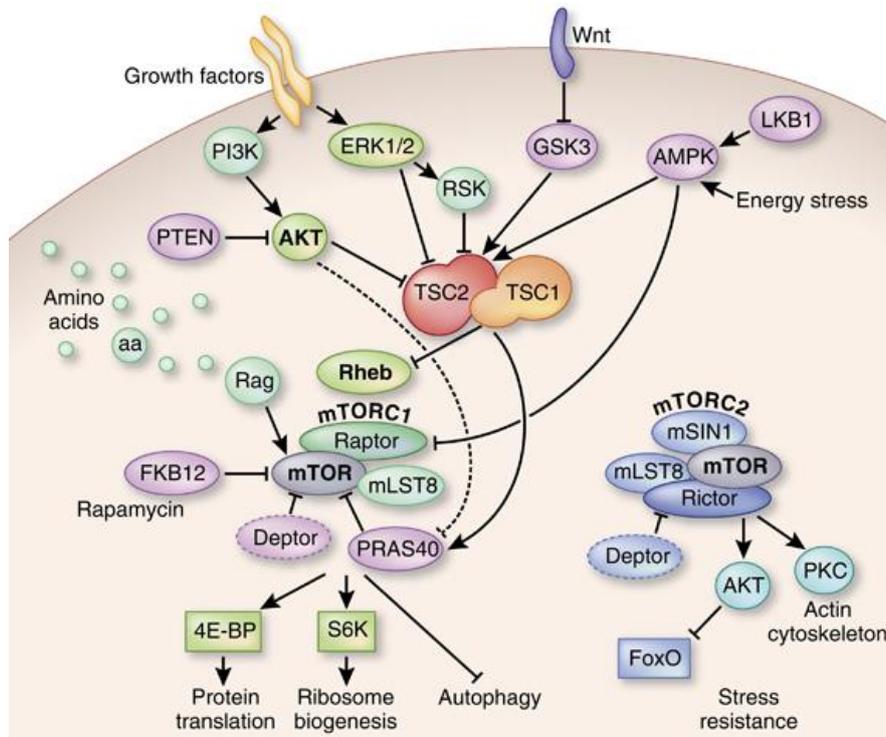


Figure 8: Composition et cibles des complexes mTORC1 et mTORC2

La sérine/thréonine kinase mTOR est constituée de 2 complexes protéiques: mTORC1 et mTORC2. Ces 2 complexes présentent une composition différente mais également des fonctions différentes au sein des voies de signalisation cellulaire. D'après Huber TB. *et al.* (74).

- P70S6K (Phospho-70 Sérine 6 Kinase)

La phospho-70 sérine 6 Kinase (P70S6K) appartient à la famille des S6-Kinases qui est constituée de 2 isoformes : la p70 et la p85-S6 kinase (75). P70S6K catalyse la phosphorylation de la protéine S6 qui est un des constituant de la sous unité 40 des ribosomes chez les eucaryotes (76, 77). Cette kinase joue donc un rôle dans la transcription des ARNm et dans la synthèse protéique (76, 78). Elle joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire (79). P70S6K possède plus d'une dizaine de sites de phosphorylation (80). Son activation résulte d'une série complexe de phosphorylations. P70S6K peut être activée par mTOR (Thr389 et Thr 412), et AKT suite à sa phosphorylation par PDK1 ou directement par phosphorylation par PDK1 (80-82).

- GSK3

GSK3 est une sérine thréonine kinase multifonctionnelle. Cette kinase est ubiquitaire mais se situe préférentiellement dans le cytoplasme.

Il existe 2 isoformes de GSK3: GSK3 α et GSK3 β codées par 2 gènes distincts (83). Cette kinase se situe au cœur de la régulation de nombreux processus physiologiques, tels que le métabolisme du glycogène, la transcription génique, l'apoptose, la stabilité des microtubules, et le transport vésiculaire intracellulaire. Elle intervient dans de nombreuses voies de signalisation et notamment dans la voie Wnt/ β -caténine (83-85). GSK3 est négativement régulée par l'insuline et les voies de signalisation Wnt et Reelin et joue un rôle majeur dans la voie de signalisation Hedgehog (86).

Elle présente la particularité d'être normalement active dans les cellules au repos. GSK3 est une des cibles principales d'AKT (87).

I.2.2.2. La voie RAS/RAF/MAPKinases

La voie RAS/RAF/MAPKinases est une des principales voies de prolifération cellulaire. Elle joue un rôle clef dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires, dont la prolifération, la survie, la différenciation, la migration cellulaire ainsi que l'angiogenèse (88, 89). Cette voie située en aval des RTK, et particulièrement en aval de l'EGFR fait intervenir de nombreuses kinases dont le recrutement conduit à l'activation de facteurs de transcription (4).

La voie RAS/RAF/MAPKinases a suscité de nombreux travaux ces 20 dernières années qui ont mis en évidence de nombreuses altérations oncogéniques (4). Cette voie est dérégulée dans de nombreux cancers et notamment dans le cancer du sein, ce qui fait d'elle une des voies privilégiées du ciblage thérapeutique (90). La transduction du signal au niveau de cette voie se fait via une cascade de phosphorylation faisant intervenir de nombreux effecteurs dont les protéines RAS, RAF, ERK, et MEK (Mitogen-activated Extracellular signal regulated Kinase-activating kinase) et P90RSK (P-90 ribosomal S6 Kinase) (**Figure 9**).

L'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase, situé en amont de la voie RAS/RAF/MAPKinases, entraîne le recrutement d'une protéine adaptatrice possédant un domaine SH2, la protéine Grb2. Cette protéine est ensuite recrutée par la protéine SOS1

(Son of sevenless homolog 1). La protéine SOS1, une fois activée, phosphoryle alors une petite protéine G, la protéine RAS. RAS entraîne alors une cascade de phosphorylation qui permet la transduction intracellulaire du signal. Elle recrute la protéine RAF qui est à son tour phosphorylée. RAF phosphoryle ensuite la protéine MEK qui phosphorylera la protéine ERK. La protéine ERK permet l'activation de P90RSK. Cette cascade de phosphorylation aboutit à l'activation de facteurs de transcription, gouvernant la transcription de nombreux gènes nécessaires à la réplication de l'ADN et à la mitose (**Figure 5**) (4, 15, 88, 90-92).

- RAS

La protéine RAS est une petite protéine de 21 000 daltons à activité GTPasique. On distingue 4 isoformes : KRAS A, KRAS B, NRAS, HRAS codées par les gènes *KRAS* *HRAS* et *NRAS* (38, 88). La protéine RAS existe sous 2 formes: une forme liée au GDP qui correspond à la forme inactive et une forme active liée au GTP. Le passage de la forme RAS-GDP à RAS-GTP est catalysé par GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), et la réaction inverse par la GTPase GAP (GTPase-Activating Protein) (93). Une fois en conformation active, elle entraîne une cascade de phosphorylation qui permet la transduction intracellulaire du signal. Elle recrute la protéine RAF qui est alors phosphorylée (88, 94, 95).

Des mutations des gènes *RAS* sont retrouvées dans plusieurs types de cancers et particulièrement dans les cancers colorectaux. Les mutations de ces gènes sont à l'inverse très rares dans les tumeurs mammaires néanmoins une suractivation de cette voie est fréquemment retrouvée dans ce type de tumeurs (96, 97).

- RAF

Dans la famille des RAF Kinases, on distingue trois sérine/thréonine kinases: la protéine BRAF codée par le gène *BRAF* situé sur le bras long du chromosome 7 en position 34 (7q34), la protéine ARAF codée par le gène *ARAF* situé sur le chromosome X en position Xp.11.23 ainsi que la protéine RAF-1 encore appelée C-RAF codée par le gène *RAF-1* situé sur le bras court du chromosome 3 en position 25 (3p25) (98, 99). Les RAF Kinases sont des MAPKinase kinases (MAPKKKs) qui une fois phosphorylées peuvent à leur tour activer et phosphoryler MEK (38). Des mutations activatrices de *BRAF* sont retrouvées dans le mélanome

métastatique et ont valeur de marqueurs prédictifs de la réponse aux anti-BRAF (100). Dans les cancers colorectaux, ces mutations ont uniquement une valeur pronostique. La présence de ces mutations est extrêmement rare dans les tumeurs mammaires (101).

- MEK

MEK est également une sérine/thréonine kinase et fait partie des MAPKinase kinases (MAPKKs). On distingue trois isoformes présentant 85% d'homologie : MEK1, protéine de 45kDa codée par le gène *MEK1* situé en 15q21, MEK1b qui est une protéine inactive de 43kDa et MEK2 protéine de 46kDa codée par le gène *MEK2* en position 7q32 (102). Une fois activée par double phosphorylation aux niveaux de 2 résidus sérine par RAF, MEK active à son tour ERK par une double phosphorylation au niveau d'un résidu tyrosine et d'un résidu thréonine (102).

- ERK

ERK est une sérine thréonine kinase. On distingue 2 isoformes présentant 84% d'homologie: ERK1 et 2 (88, 89). ERK occupe une position clef dans la signalisation cellulaire. Elle est impliquée dans la voie RAS/RAF/MAPKinases mais peut être activée indépendamment de cette voie par des stimuli pro-inflammatoires tels que les cytokines, le TNF (Tumor Necrosis Factor) ou encore les lipopolysaccharides (103). Son activation est donc contrôlée par plusieurs mécanismes distincts et peut donc affecter de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie, l'apoptose, la transcription, le métabolisme et la différenciation. Elle peut phosphoryler et activer plus d'une centaine de substrats aussi bien nucléaires que cytoplasmiques incluant les molécules de régulation et les facteurs de transcription (89, 104).

- P90RSK

P90RSK est une sérine/thréonine de 90 kDa appartenant à la famille des RSK. Elle est codée par le gène *RPS6KA1* (= *P9RSK1*) situé sur le chromosome 1 en position p36.11, et est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus. Elle possède 2 domaines kinases. Il existe 4 isoformes de cette enzyme (RSK1-4) directement activées par ERK1/2. P90RSK phosphoryle et active de nombreux substrats dont notamment S6K. P90RSK agit en aval de la voie ERK/MAPKinase. Une hyperactivation de cette kinase a été mise en évidence dans de nombreuses maladies et notamment dans les cancers de la prostate et du sein. Elle pourrait donc être potentiellement utilisée comme marqueur prédictif de réponse à certains traitements (105-107).

Les différents effecteurs impliqués dans les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases sont résumés dans la **figure 9**.

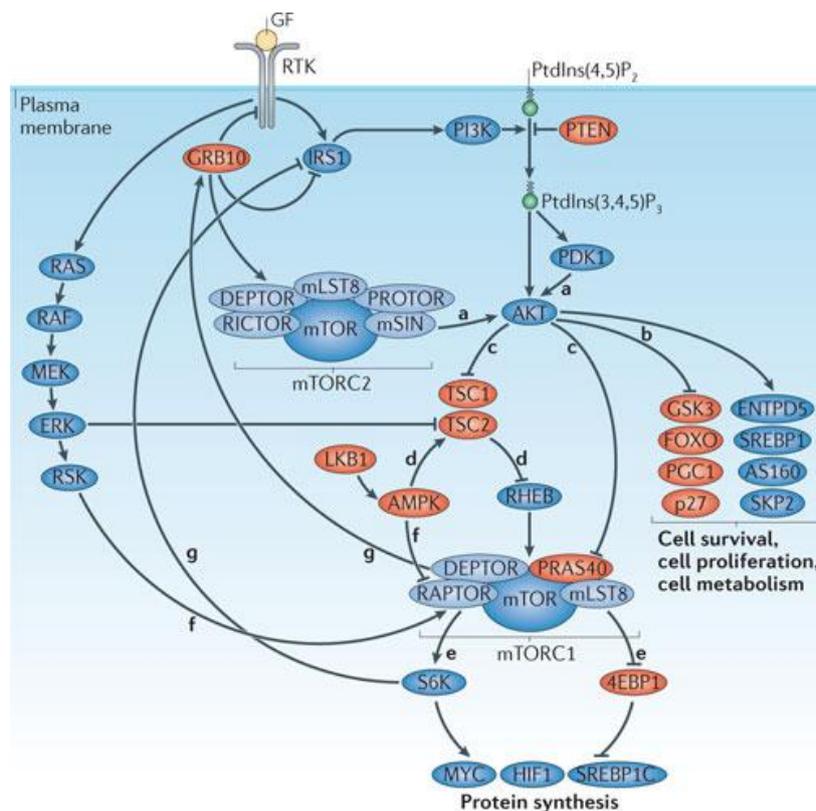


Figure 9: Les différents effecteurs intervenant dans les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases

Les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases font intervenir de multiples effecteurs. Ces deux voies se régulent mutuellement et sont activées par des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que l'IGFR ou les récepteurs HER. D'après Song MS. *et al.* (108).

I.2.2.3. La voie P38MAPKinase

La P38MAPKinase appartient à la famille des MAPKinases. Il existe 4 isoformes: la P38 α (MAPK-14), la P38 δ (MAPK-13), la P38 β (MAPK-11) et la P38 γ (MAPK-12) chacune codée par un gène distinct (103). La première à avoir été isolée est la P38 α . Cette isoforme de 38 kDa est la mieux caractérisée et la plus abondante. Elle est exprimée dans la plupart des types cellulaires et présente une grande variabilité interindividuelle comparativement aux autres (109-111). Les différentes isoformes présentent une homologie de 60%. Elles diffèrent les unes des autres par leur mode d'expression et leur distribution tissulaire. Elles sont de plus activées par des kinases distinctes et entraînent l'activation de cibles spécifiques (109, 112-114). Cette famille de kinase joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de l'apoptose, ainsi que dans la réponse à l'inflammation et au stress (112, 115). Les P38MAPKinases sont activées par MEK3 et MEK6 qui sont, elles-mêmes, activées par de nombreuses MAPKKs activées par des signaux de stress, d'hypoxie, d'ischémie et d'inflammation. MEK6 active indifféremment les 4 isoformes alors que MEK3 phosphoryle préférentiellement la P38 α et la P38 β (103).

La voie de la P38MAPKinase peut être activée par divers stimuli, parmi lesquels figurent notamment de nombreux facteurs de croissance, des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des agents pathogènes. L'activation des P38MAPKinases dépend du stimulus mais également du type cellulaire (**Figure 10**) (112, 113, 116). Une fois activée, P38 peut activer à son tour de nombreux facteurs de transcription dont notamment ATF-1 et 2 (Activating Transcription Factor 1 et 2), GADD153 (Growth Arrest- and DNA Damage-inducible gene 153), MEF (Myocyte Enhancer Factor) ou encore CREB (C-AMP Response Element-Binding protein) (116).

Cette famille peut être divisée en 2 groupes avec d'un côté la P38 α , et la P38 β qui présentent 75% d'homologie et de l'autre la P38 δ et la P38 γ qui sont homologues à 70% (109). P38 est un point de convergence de différentes voies de signalisation. Son implication dans le processus de tumorigenèse est de ce fait très complexe et de plus variable selon les isoformes.

Une augmentation de l'activité de la P38MAPKinase a été mise en évidence dans plusieurs types de cancers dont notamment les cancers du sein, les cancers de la face et du cou, les lymphomes et les gliomes (111, 117).

Un niveau d'expression élevé de la P38MAPKinase a été retrouvé dans certaines tumeurs mammaires et a été défini comme facteur de mauvais pronostic (111).

Il a également été mis en évidence l'impact de P38 et de son niveau d'expression sur le pouvoir invasif et métastatique de la tumeur via le système du plasminogène (118). Des études démontrent, quant à elles, une corrélation entre son expression et le statut de HER2 et expliquent également son implication dans la résistance au traitement par tamoxifène (119). On note par ailleurs qu'une expression de sa forme phosphorylée est retrouvée dans 20% des cancers mammaires primaires et que cette forme est un marqueur de mauvais pronostic dans les tumeurs HER2- avec métastases ganglionnaires (120).

Bien que les mécanismes de tumorigenèse impliquant la P38 ne soient pas encore totalement élucidés, cette kinase joue un rôle fondamental dans la prolifération cellulaire ce qui justifie l'intérêt porté au développement d'inhibiteurs de P38.

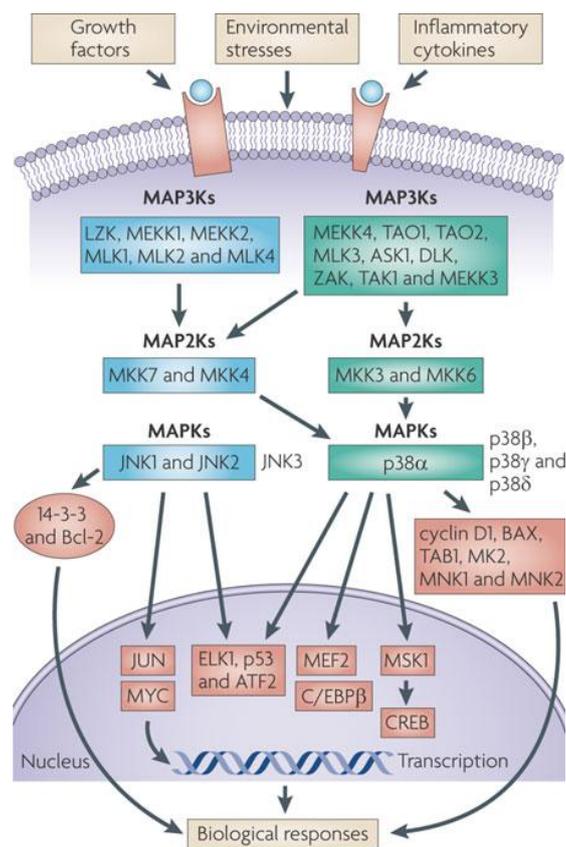


Figure 10: Voies de signalisation des MAPKineses

La P38MAPKinase joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de l'apoptose, ainsi que dans la réponse à l'inflammation et au stress. Elle peut être activée par différentes kinases dont MKK3, 4, 6 et 7. D'après Wagner EF. *et al.* (121).

I .3. Hétérogénéité moléculaire des cancers du sein

L'essor de la biologie moléculaire au cours de ces dernières années a permis d'affiner la classification des cancers du sein en mettant en évidence des caractéristiques moléculaires propres à chaque tumeur permettant de les classer en différents sous-types (122). La première classification moléculaire du cancer du sein a été proposée en 2000 par Perou *et al.* (123). Cette classification distingue 4 sous-types moléculaires basés sur le profil d'expression génique : le sous-type luminal/épithélial/récepteurs aux œstrogènes (RE) positifs, le sous-type HER2 positif, le sous-type basal-like et le normal-like.

En 2001, cette classification a été précisée par Sorlié *et al.* avec une division des tumeurs lumineuses en trois sous-types A, B, C (124). L'existence du sous-type luminal C a ensuite été remis en question en 2003 pour ne garder que les sous-types lumineux A et B (Figure 2) (125).

En 2003, Sotiriou *et al.* a démontré l'existence de 6 groupes mais cette fois-ci, divisait le sous-type basal-like en 2 sous-groupes en fonction de leur profil d'expression et supprimait le groupe normal-like (126). En effet, ce groupe est actuellement controversé et est plutôt considéré par certains comme le résultat d'une contamination par un contingent cellulaire normal que comme un réel sous-type.

De nombreuses études ont été menées pour définir un panel de biomarqueurs d'intérêt aussi bien prédictifs que pronostiques afin d'améliorer la prise en charge et le suivi de la maladie mais également permettre de mieux contrôler les toxicités des traitements. Bien que de nombreuses études sur le profil d'expression génique des tumeurs et sur leur signature génomique aient été réalisées (127, 128), et que de nombreux marqueurs potentiels aient été mis en évidence, actuellement seuls le statut hormonal et le statut HER2 sont utilisés en routine.

Les principales caractéristiques des différents sous-types moléculaires sont décrites dans le **tableau III**.

Tableau III: Récapitulatif des caractéristiques des principaux sous-types moléculaires.

Sous-type de tumeurs mammaires	Origine	Caractéristiques moléculaires	Type histologique du carcinome	pronostic
Basal → ≈ 20%	Cellule myoépithéliale	-RE-, HER2-, -CK de haut PM : → CK5/6+ -EGFR+ -Expression élevée des gènes liés à la prolifération -P53 souvent muté -Anomalies de <i>BRCA1</i> -Instabilité génétique ++++	→ Canalaire de grade III → Médullaire → Métaplasique	Défavorable
HER2 → ≈10%	Non connu	-HER2+, RH- -CK de bas PM : CK 8/18+ CK19+ -Expression élevée des gènes liés à la prolifération -Mutation <i>P53</i> fréquente	→ Apocrine → Canalaire infiltrant de grade II et III	Défavorable
Luminal	Cellule luminaire	-RE+ -CK de bas PM : CK8/18+ CK19+		Favorable
Luminal A → ≈50%		-Faible expression des gènes de prolifération -Forte expression de RE	→ Canalaire de grade I/II → lobulaire et mucineux	
Luminal B → ≈20%		-Forte expression des gènes de prolifération -Expression de RE faible à modérée - 30% HER2+	→ Canalaire de grade II/III	

Cette classification a permis de mieux appréhender les réponses thérapeutiques en fonction du profil moléculaire des tumeurs et ainsi de développer une médecine personnalisée. La caractérisation moléculaire est actuellement indispensable dans la décision thérapeutique. Elle permet de proposer aux patients des traitements adaptés aux caractéristiques de la tumeur. Ceci est notamment le cas pour les cancers surexprimant HER2 qui peuvent bénéficier de thérapies anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab, trastuzumab-emtansine) ou encore pour les tumeurs hormonodépendantes qui elles sont traitées par hormonothérapie (tamoxifène, anastrozole, letrozole, exemestane, fulvestrant). Les recherches actuelles ont pour but d'identifier de nouveaux biomarqueurs d'intérêt et ainsi de développer le ciblage moléculaire, l'objectif étant d'obtenir une action ciblée du médicament et d'améliorer ainsi l'efficacité thérapeutique tout en limitant les toxicités.

I.4. Thérapies ciblées dans le traitement du cancer du sein

La mise en évidence d'altérations moléculaires au sein des tumeurs a permis l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de molécules dirigées contre celles-ci appelées thérapies ciblées. Le profil biologique de la tumeur oriente ainsi la décision thérapeutique.

Il existe deux types de thérapies ciblées : les anticorps monoclonaux qui sont des molécules administrées par voie injectable et les inhibiteurs de tyrosine kinase, administrés per os. Il existe 4 anticorps monoclonaux et 2 inhibiteurs de kinase utilisés dans le traitement du cancer du sein.

I.4.1. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont constitués de deux fragments Fab (Fragment antibody binding) complémentaires de l'antigène (différents d'un anticorps à l'autre) et d'un fragment constant (identique pour tous les anticorps d'une même espèce) permettant la fixation sur les récepteurs membranaires (**Figure 11**).

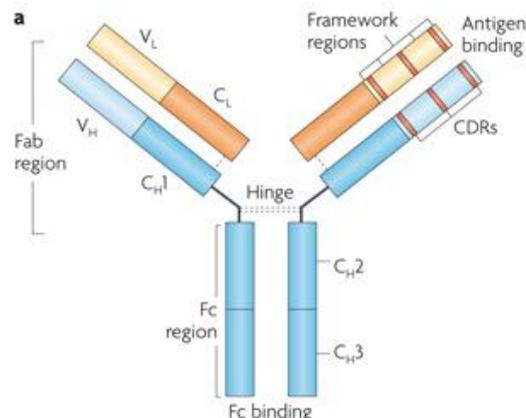


Figure 11: Structure d'un anticorps monoclonal de type IgG.

Les anticorps monoclonaux sont constitués de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes légères et 2 chaînes lourdes. Les deux extrémités correspondent à la partie variable tandis que le reste de la molécule correspond à la région constante. Les Fab sont les sites de liaison à l'antigène. Les CDR sont des régions hypervariables situées sur les Fab, ils déterminent la complémentarité de l'antigène avec l'anticorps. D'après Hansel TT *et al.* (129).

I.4.1.1. HERCEPTIN® Trastuzumab

Premier anti-HER2 mis sur le marché, le trastuzumab a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en août 2000. Cet anticorps monoclonal est indiqué dans le traitement du cancer du sein précoce ou métastatique présentant soit une surexpression de HER2, soit une amplification génique validée. Ainsi, seules les tumeurs présentant un score 3+ en immunohistochimie ou un score 2+ et positives en FISH ou CISH/SISH sont éligibles pour le traitement par trastuzumab (130).

Le trastuzumab est administré en hebdomadaire à la dose de charge de 4mg/kg, suivi d'une dose d'entretien hebdomadaire de 2mg/kg ou toutes les 3 semaines avec une dose de charge de 8mg/kg et une dose d'entretien de 6mg/kg (130).

Le trastuzumab est un anticorps monoclonal humanisé recombinant de type IgG 1 dirigé contre le domaine extracellulaire des récepteurs à activité tyrosine kinase HER2. Il se fixe plus précisément au sous-domaine IV du domaine extracellulaire de HER2, bloquant ainsi la signalisation cellulaire en aval de ce dernier (131, 132) (**Figure 12**). La diminution de l'activation des voies de signalisation en aval du récepteur est due à l'internalisation du récepteur et à sa dégradation par un système d'enzymes protéolytiques (133). En dehors de ce mécanisme d'action anti-HER2, il présente un mécanisme d'action immunologique de type ADCC, cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps. La reconnaissance et l'interaction du fragment Fc de cette IgG avec le domaine Fc γ du récepteur des cellules immunitaires de type cellules Natural Killer (NK), macrophages ou monocytes, conduisent à l'activation de ces cellules et donc à la lyse des cellules tumorales (133-135). Il a également été démontré que le trastuzumab avait une activité synergique ou additive avec les cytotoxiques, notamment avec les sels de platines et les taxanes (131, 136). Le trastuzumab a amélioré de façon significative le pronostic des patientes présentant un cancer du sein HER2+. Cependant on constate dans certaines situations un échappement au traitement en particulier du à la présence de mutations activatrices au niveau des voies de signalisation situées en aval (8).

Une forme sous-cutanée du trastuzumab est commercialisée depuis avril 2014 (Etude pivot de phase III HANNAH). Cette forme a été développée dans le but d'améliorer le confort des patientes avec la mise à disposition d'une voie d'administration moins invasive, permettant une durée de préparation et d'administration raccourcie.

Cette formulation contient de la hyaluronidase humaine recombinante (rHuPH20), qui permet d'augmenter la dispersion et l'absorption de la molécule. Ce médicament est administré à la dose fixe de 600 mg, quel que soit le poids de la patiente, toutes les 3 semaines pendant 2 à 5 minutes dans la cuisse (137).

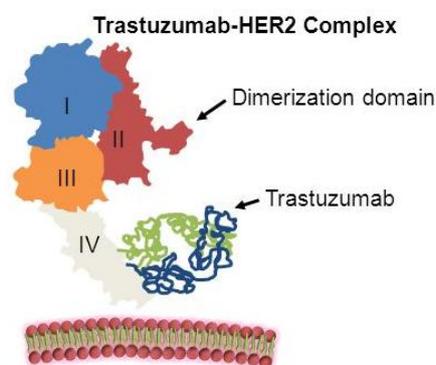


Figure 12: Site de fixation du trastuzumab.

Le trastuzumab se lie au domaine IV du domaine extracellulaire du récepteur HER2. D'après Hubbard SR. *et al.* (138).

I.4.1.2. KADCYLA® Trastuzumab/Emtansine

Le T-DM1 résulte de la conjugaison du trastuzumab à un composé cytotoxique, inhibiteur de la polymérisation des microtubules dérivé de la maytansine, le DM1. Le trastuzumab et le DM1 sont associés par un agent de liaison (agent de liaison+DM1= emtansine). Le T-DM1 se lie aux récepteurs HER2 à la surface de la cellule cancéreuse, il est ensuite internalisé par un mécanisme d'endocytose et relargue le DM1 à l'intérieur de la cellule par dégradation lysosomale. Le DM1 se lie aux microtubules et inhibe leur polymérisation, ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire (**Figure 13**). L'intérêt de cette association est d'améliorer l'efficacité du traitement en conjuguant l'activité ciblée anti-HER2 du trastuzumab à un effet cytotoxique de type antiméiotique, tout en limitant la toxicité.

L'effet cytotoxique touche spécifiquement les cellules tumorales surexprimant HER2 et épargne les cellules saines contrairement à un traitement cytotoxique standard. L'étude de phase III EMILIA qui comparait l'efficacité et la toxicité du T-DM1 à celles de l'association capécitabine-lapatinib chez des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+, localement avancé, non résecable ou métastatique (traitées en première ligne par trastuzumab associé à un taxane) a mis en évidence une efficacité supérieure du T-DM1 (amélioration de la médiane de survie sans progression de 3,2 mois et de la médiane de survie globale de 5,8 mois) et une toxicité moins importante du T-DM1 (139).

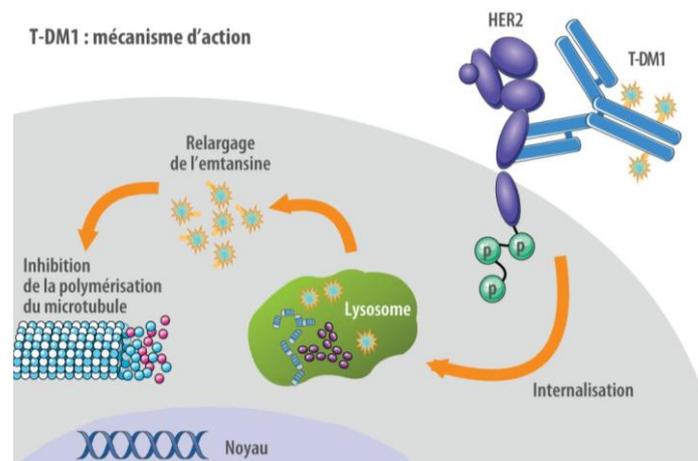


Figure 13: Mécanisme d'action du T-DM1

Le T-DM1 se fixe au récepteur HER2. Suite à cette liaison, le T-DM1 est internalisé par le biais du récepteur. Il y a ensuite une dégradation lysosomale conduisant à la libération intracellulaire de l'émansine qui va alors exercer son effet antiméiotique. D'après Blackwell K. *et al.* abstract, ASCO 2012.

I.4.1.3. PERJETA® Pertuzumab

Le pertuzumab est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 ciblant un épitope spécifique du récepteur HER2, impliqué dans le processus de dimérisation des récepteurs (**Figure 14**). Sa fixation empêche l'hétérodimérisation ligand-dépendante d'HER2 avec les autres récepteurs de la famille HER et notamment sa dimérisation avec HER3. Ceci entraîne alors l'inhibition des voies de signalisation RAS/RAF/MAPKinases et PI3K/AKT/mTOR ce qui conduit à un arrêt de la prolifération cellulaire et à l'apoptose. Ce mécanisme d'action est complémentaire de celui du trastuzumab qui se fixe sur un épitope différent de HER2. Leur association entraîne donc un double blocage du récepteur.

Le pertuzumab présente également un mécanisme d'action immunologique de type ADCC (134, 140).

Le pertuzumab a obtenu son AMM en mars 2013 suite aux résultats de l'étude de phase III CLEOPATRA, étude randomisée, multicentrique, en double aveugle contrôlée, comparant l'efficacité de l'association placebo/trastuzumab/docetaxel à celle de l'association pertuzumab/trastuzumab/docétaxel chez des patientes présentant un cancer du sein métastatique ou localement récidivant non résecable, HER2+, qui a mis en évidence une amélioration statistiquement significative de la survie sans progression (PFS: progression free survival) de 6,1 mois dans le groupe traité avec le pertuzumab (141, 142).

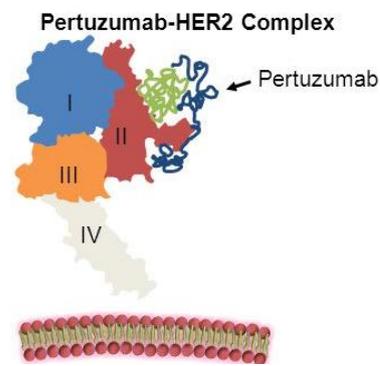


Figure 14: Site de fixation du pertuzumab

le pertuzumab se lie au domaine II du domaine extracellulaire du récepteur HER2. D'après Hubbard SR. *et al.* (138).

I.4.1.4. AVASTIN® Bévacicumab

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal recombinant humanisé anti-VEGF qui inhibe la fixation du VEGF à ses récepteurs FLT-1 (FMS-like Tyrosine kinase-1 ou VEGFR-1) et KDR (Kinase insert Domain protein Receptor ou VEGFR-2) au niveau des cellules endothéliales. Il possède donc une action anti-angiogénique. Il est indiqué dans le traitement de première ligne du cancer du sein métastatique en association au paclitaxel. Cet anticorps monoclonal a obtenu son AMM pour le traitement du cancer du sein en mars 2007 suite à l'étude E2100 qui a mis en évidence une PFS de 11.3 mois pour le bras de traitement associant le bévacizumab au paclitaxel versus 5.8 mois pour le bras contrôle paclitaxel seul (143-145).

I.4.2. Les inhibiteurs de kinase

Les inhibiteurs de kinase sont de petites molécules inhibant l'activité tyrosine kinase des récepteurs par compétition avec l'ATP. Ils entraînent l'inhibition intracellulaire de la phosphorylation de la tyrosine et donc l'inhibition de la transduction du signal en aval. Ces molécules sont spécifiques de leurs cibles. Elles ont l'avantage d'avoir un poids moléculaire faible ce qui leur permet d'atteindre plus facilement les tumeurs mais aussi d'avoir une formulation galénique rendant possible l'administration par voie orale.

I.4.2.1. TYVERB® Lapatinib

Le lapatinib est un double inhibiteur de tyrosine kinase qui se fixe sur les sites intracellulaires des récepteurs HER1 et HER2. Cette fixation lentement réversible bloque la phosphorylation et donc l'activation des récepteurs entraînant l'inhibition de la signalisation cellulaire située en aval et notamment la signalisation dépendante des voies RAS/RAF/MAPKinases et PI3K/AKT/mTOR (146, 147). Le lapatinib entraîne également une régulation négative de la survivine ainsi que de la protéine XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), qui sont toutes deux des protéines inhibant l'apoptose. L'inhibition de la survivine se fait via la voie PI3K (148). En 2008, le lapatinib a obtenu une AMM pour le traitement du cancer du sein HER2+, en association à la capécitabine, chez les patientes ayant une maladie avancée ou métastatique en progression après un traitement antérieur ayant comporté une anthracycline, un taxane et un traitement ayant inclus du trastuzumab en situation métastatique. Cette AMM fait suite à une étude de phase III ayant montré une PFS médiane de 8,4 mois pour le bras lapatinib+capécitabine versus 4,4 mois pour le bras traité par la capécitabine seule (146, 149).

Le lapatinib peut également être utilisé en association avec un inhibiteur de l'aromatase chez la femme ménopausée présentant un cancer du sein RH+ pour lequel la chimiothérapie n'est pas envisagée.

Ce médicament garde une activité significative sur les lignées de cellules tumorales exposées au trastuzumab, suggérant une absence de résistance croisée entre ces deux molécules (53).

I.4.2.2. AFINITOR® Everolimus

L'évérolimus ou le 40-O-(2-hydroxyéthyl)-rapamycine est un analogue de la rapamycine, molécule initialement développée comme antifongique et immunosuppresseur avant que ses propriétés anti-prolifératives ne soient découvertes (150). L'évérolimus est un inhibiteur sélectif de la protéine mTOR, une sérine thréonine kinase située en aval de la voie PI3K/AKT/mTOR (151, 152), et impliquée dans la progression des cellules de la phase G1 à la phase S. Il cible spécifiquement le complexe mTORC1. Son activité antiproliférative provient de sa fixation à l'immunophiline FKBP-12 (FK506-binding protein 12). Le complexe FKBP-12/évérolimus se lie alors à mTOR et bloque la transduction du signal en aval de mTOR. L'évérolimus possède des propriétés anti-tumorales et antiangiogéniques. Il permet l'inhibition de la prolifération et de la croissance cellulaire, la diminution de l'angiogenèse tumorale et inhibe le métabolisme cellulaire (153, 154). Des études ont mis en évidence que les inhibiteurs de mTOR étaient actifs sur les cellules résistantes au trastuzumab (155, 156).

Cette molécule était initialement indiquée dans le cancer du rein avancé ainsi que dans les tumeurs neuroendocrines d'origine pancréatique. Elle a obtenu le 3 avril 2013 une extension d'AMM suite aux résultats de l'étude BOLERO 2 montrant une augmentation significative de la survie sans progression dans le bras de traitement évérolimus + exemestane (PFS de 10,6 mois) comparativement au bras exemestane seul (PFS de 4,1 mois) pour le traitement du cancer du sein. L'évérolimus est donc également indiqué dans le cancer du sein avancé avec récepteurs hormonaux positifs, HER2-, en association avec l'exemestane, chez les femmes ménopausées sans atteinte viscérale symptomatique des récives ou progression de la maladie et précédemment traitées par un inhibiteur non-stéroïdien de l'aromatase (157).

Les sites d'action des différentes thérapies ciblées précitées sont résumés dans la **figure 15**.

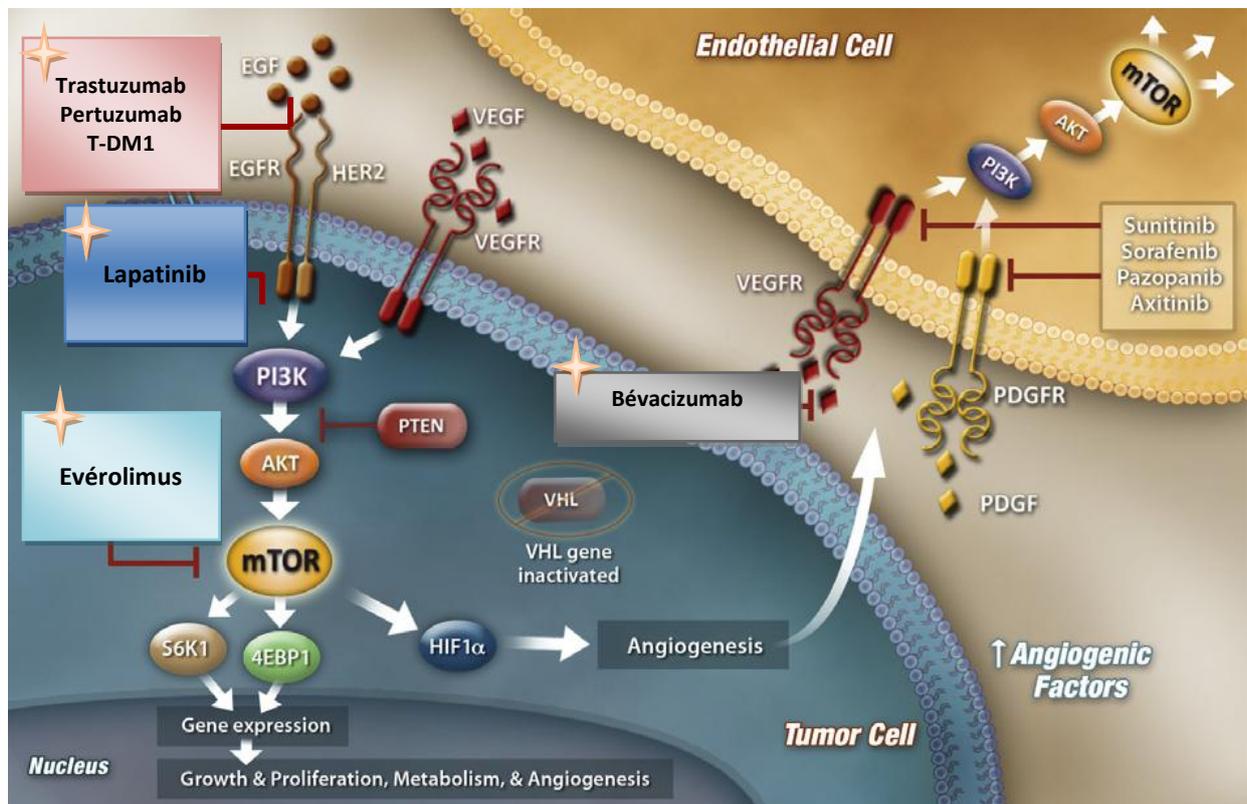


Figure 15: Schéma récapitulatif des mécanismes d'action des thérapies ciblées (✨) utilisées dans la prise en charge du cancer du sein.

Le schéma récapitule les sites d'action des différentes thérapies ciblées utilisées dans le traitement du cancer du sein: l'action anti-HER2 au niveau du domaine extracellulaire du récepteur HER2 du trastuzumab, du pertuzumab, et du T-DM1, l'inhibition de mTOR par l'évérolimus, l'action intracellulaire du lapatinib au niveau du dimère HER2/HER1 et l'action anti-VEGF du bévacizumab. Modifié d'après Oudard *et al.* (158).

I.5. Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées dans le traitement du cancer du sein

Malgré l'efficacité des thérapies ciblées, on constate dans certains cas, une résistance primaire au traitement ou le développement de résistances acquises.

Lors du traitement par trastuzumab, on constate une résistance primaire dans 60 à 70% des cas en monothérapie et dans 30 à 50% des cas en association. En situation métastatique, on observe fréquemment l'apparition d'un échappement thérapeutique au bout d'un an environ (159).

De nombreuses études ont décrit les mécanismes pouvant contribuer au développement de résistance. Il a notamment été mis en évidence une forme tronquée de HER2, p95HER2 qui empêche la liaison du trastuzumab à son récepteur. Le lapatinib est une alternative pour contourner cette résistance, son mécanisme d'action étant intracellulaire, il reste actif sur cette forme tronquée.

La résistance peut être due à l'activation de voies de signalisation alternatives telles que la voie de l'IGF1 (existence d'un cross-talk avec HER2) ou la voie médiée par HER3.

Une résistance par encombrement stérique empêchant l'interaction du trastuzumab avec le récepteur HER2 (encombrement dû à la protéine de surface MUC4 (membrane-associated glycoprotein mucin 4) a également été démontrée (135, 160).

Des altérations de la voie PI3K/AKT/mTOR par mutations activatrices du gène *PIK3CA* ou par perte d'expression de PTEN entraînant une hyperactivation de la voie sont également à l'origine de résistance au trastuzumab et au lapatinib (161, 162).

Les mutations activatrices du gène *PIK3CA* sont retrouvées dans 25% des cancers mammaires (5, 7, 8). Ces mutations augmentent l'activité kinase de *PIK3CA*. L'activation de la voie PI3K par mutations activatrices de la sous-unité catalytique p110 α joue un rôle-clé dans l'oncogenèse mammaire (47, 163, 164).

Les principales mutations retrouvées sont localisées sur les exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* (165). Il s'agit des mutations E542K, E545K au niveau de la région hélicoïdale de l'exon 9 et H1047R et H1047L du domaine kinase de l'exon 20 (**Figure 16**).

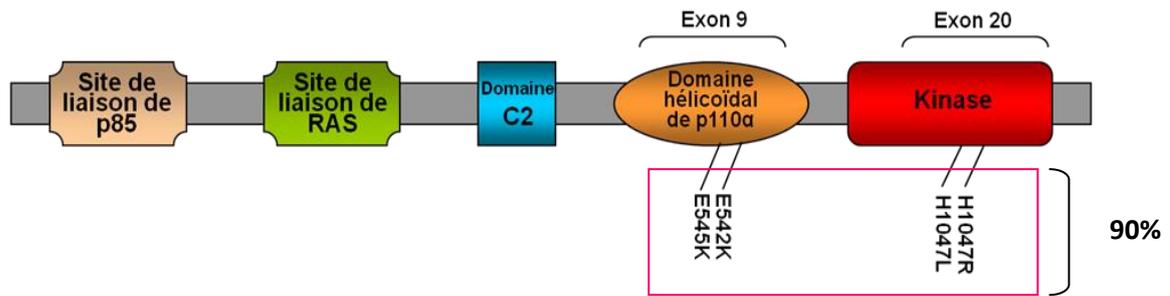


Figure 16: Schéma du gène *PIK3CA*

Le gène *PIK3CA* codant pour la sous-unité catalytique p110 α de PI3K présente des mutations activatrices dans environ 25 à 30% des cancers du sein. Les principales mutations retrouvées sont les mutations E542K et E545K situées sur le domaine hélicoïdale de l'exon 9 et les mutations H1047L et H1047R situées sur le domaine kinase de l'exon 20. D'après Harlé A. *et al.* (166).

Ces mutations représentent plus de 90% des mutations retrouvées dans les tumeurs mammaires (5, 6, 167-170).

La combinaison du trastuzumab ou du lapatinib à d'autres molécules telles que les inhibiteurs de mTOR ou des inhibiteurs de PI3K pourrait éventuellement permettre de contourner cette résistance (133, 134).

Une résistance acquise au lapatinib par renforcement du signal RE consécutive à l'activation de FOXO (Forkhead box class O) 3a a également été mise en évidence *in vitro*. FOXO3a est un facteur de transcription qui régule l'expression des RE α , maintenu inactif lorsqu'il est phosphorylé par AKT. L'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR par le lapatinib rend FOXO3a actif et entraîne alors une augmentation de l'expression des RE. Ceci justifierait l'association lapatinib / anti-œstrogène ou anti-aromatase pour obtenir le blocage des 2 voies (171, 172). Plusieurs mutations d'HER2 ont aussi été démontrées *in vitro*, la plupart se situant sur le domaine tyrosine kinase du récepteur (173, 174). De nombreux autres mécanismes de résistance sont actuellement à l'étude. Décrypter les bases moléculaires de la réponse au traitement est donc essentiel pour optimiser l'efficacité des traitements.

I.6. Notion de biomarqueurs en oncologie: intérêt de la détermination de nouveaux biomarqueurs dans la prise en charge du cancer du sein

La notion de biomarqueurs est devenue incontournable en oncologie. Le but est d'identifier des éléments biologiques pouvant avoir un intérêt diagnostique, un intérêt thérapeutique pour évaluer la réponse au traitement mais également pronostique pour prévoir l'évolution de la maladie (175).

Les premiers biomarqueurs utilisés en sénologie furent les récepteurs hormonaux, marqueurs pronostiques mais également prédictifs de la réponse à l'hormonothérapie.

A ensuite était découvert le récepteur HER2 et son implication dans la tumorigenèse mammaire. Sa mise en évidence et les thérapies anti-HER2 qui en ont découlé ont considérablement amélioré le pronostic des femmes souffrant d'un cancer du sein HER2+.

L'identification de nouveaux biomarqueurs a pour but d'améliorer la prise en charge des patientes et de développer une médecine de plus en plus personnalisée. Cette démarche fait partie intégrante des objectifs du Plan Cancer et est un enjeu majeur de santé publique.

Les progrès dans le domaine de la biologie moléculaire ont également permis l'apparition des signatures génomiques parmi lesquelles nous pouvons citer le test Oncotype Dx® qui quantifie l'expression de 21 gènes dont 16 par RT-qPCR à partir de tissu tumoral fixé et inclus en paraffine. Ce test permet d'établir un score de récurrence correspondant à un niveau de risque de rechute pour chaque tumeur.

Il existe également le test MammaPrint® qui permet l'analyse simultanée de l'expression de 70 gènes par puces à ADN à partir de tissu tumoral congelé. Ces signatures sont composées de gènes qui sont des indicateurs de bon ou de mauvais pronostic ainsi que du risque de récurrence.

Identifier de nouveaux biomarqueurs d'intérêt permet de déterminer des cibles potentielles pour le développement de nouvelles thérapies ciblées. La détermination et l'évaluation de ces biomarqueurs sont nécessaires pour comprendre la complexité des phénomènes biologiques mis en jeu dans l'oncogenèse et l'évolution tumorale. Une meilleure connaissance de ces mécanismes permettrait de mieux appréhender et d'anticiper les mécanismes de résistance aux traitements et d'améliorer ainsi la prise en charge des patientes.

I.7. Objectifs du travail

Les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases ont une implication majeure dans les processus de tumorigenèse mammaire et sont impliquées dans de nombreux mécanismes de résistance aux traitements. Ce travail de thèse est un travail de recherche translationnelle qui avait pour objectif d'étudier des biomarqueurs issus de ces voies de signalisation et de rechercher des corrélations clinico-biologiques afin d'établir leur valeur potentielle en qualité de marqueur prédictif de la réponse thérapeutique.

Pour cela nous avons, dans un premier temps, étudié de façon rétrospective, à partir d'échantillons de carcinomes mammaires invasifs inclus en paraffine et par 2 techniques de PCR temps réel, le statut mutationnel du gène *PIK3CA* qui est fréquemment muté dans les cancers du sein.

La deuxième partie de mon travail a consisté en l'exploration de la fonctionnalité des voies de signalisation. Nous avons analysé le niveau d'expression des phosphoprotéines clés des voies PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase par une technique d'immunoanalyse multiplexe (Bioplex Protein Array ou BPA) sur échantillons cryoconservés de tumeurs mammaires invasives.

L'exploration fonctionnelle des voies de signalisation comprend trois études. Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse rétrospective sur des échantillons de tumeurs mammaires canalaire invasives et établi des corrélations clinico-biologiques entre les niveaux d'expression des phosphoprotéines et les statuts hormonal et HER2.

Dans un second temps nous avons réalisé une étude prospective consistant en la détermination de marqueurs prédictifs de réponse à l'association trastuzumab-évérolimus, en situation pré-opératoire dans les cancers du sein localisés surexprimant HER2. Cette étude de phase 2 randomisée, comparant trastuzumab seul *versus* trastuzumab + évérolimus, avait pour but d'étudier l'impact de cette association sur les voies de signalisation et de préciser les déterminants moléculaires contrôlant la réponse thérapeutique afin d'optimiser à terme les critères utiles à la personnalisation des prescriptions.

Dans un troisième temps, toujours à l'aide de la technique BPA, suite à l'étude RADHER, nous avons décidé d'étudier l'impact du trastuzumab sur le niveau d'expression des phosphoprotéines des voies de signalisation *in vitro* cette fois-ci, sur des lignées cellulaires de carcinomes mammaires humains HER2+ (SKBR3) et HER2- (MCF-7) et de comparer ces résultats à ceux obtenus dans l'étude RADHER dans le bras traité par le trastuzumab seul. Ce travail avait pour but de mieux comprendre la complexité des mécanismes d'action mis en jeu par le trastuzumab sur des cultures cellulaires c'est à dire en l'absence d'environnement tumoral et en situation clinique impliquant donc un environnement tumoral complexe.

Chapitre II
Mutations du gène *PIK3CA* dans les cancers du sein

II. Mutations du gène *PIK3CA* dans les cancers du sein

La voie PI3K/AKT/mTOR est une voie fréquemment dérégulée dans les cancers du sein. Son hyperactivation peut être due à des mutations activatrices du gène *PIK3CA* qui code la sous-unité catalytique p110 α de la PI3Kinase (6, 44, 167, 170).

Ces mutations sont retrouvées dans 25% des cancers mammaires (7, 8). Les principales mutations retrouvées sont localisées sur les exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* (165). Ces mutations représentent plus de 90% des mutations retrouvées dans les tumeurs mammaires (6, 167-170).

Il a été démontré que l'hyperactivation de cette voie était impliquée dans la résistance au trastuzumab (53, 54, 57, 176-178), au lapatinib (54, 179) ou encore aux anti-œstrogènes (180-183). Ainsi la PI3Kinase est une cible majeure pour de nouvelles thérapeutiques et pourrait servir de biomarqueur prédictif de réponse aux traitements. Ce qui explique que de nombreux inhibiteurs de PI3K soient actuellement en cours de développement.

Nous avons étudié le statut mutationnel du gène *PIK3CA* à l'aide de 2 techniques de PCR temps réel, de façon rétrospective et nous avons ensuite corrélé ces résultats aux paramètres cliniques et pathologiques tels que l'âge des patientes au diagnostic, le type histologique, le grade SBR, mais aussi aux caractéristiques moléculaires des tumeurs telles que le statut des récepteurs hormonaux et le statut HER2. Les résultats de cette étude sont publiés dans le premier article intitulé "Analysis of *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations in breast cancer using PCR-HRM et PCR-ARMS: correlation with clinicopathological criteria".

Le deuxième article intitulé "Signification clinique, diagnostique et intérêt théranostique des mutations du gène *PIK3CA* dans le cancer du sein" dresse, quant à lui, un état des lieux des connaissances actuelles concernant ces mutations et sur l'intérêt de les utiliser comme biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements.

II.1. Analyse des mutations des exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* par technique de PCR-HRM et PCR-ARMS dans les cancers du sein et étude des corrélations clinico-biologiques

Les mutations du gène *PIK3CA* suscitent un grand intérêt dans les cancers du sein et font l'objet de nombreuses études qui ont pour but de déterminer leur valeur prédictive de réponse aux traitements et/ou leur valeur pronostique. Cependant on constate que nombre de ces études présentent des résultats contradictoires, ce qui nécessite d'approfondir les recherches.

Dans l'article: Harlé A., Lion M., Lozano N., Husson M., Harter V., Genin P., Merlin J.L. "Analysis of *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations in breast cancer using PCR-HRM et PCR-ARMS: correlation with clinicopathological criteria" *Oncology Reports*. 2013 Mar;29(3):1043-52.), nous avons mis en œuvre et comparé 2 techniques de biologie moléculaire permettant la détermination du statut mutationnel du gène *PIK3CA*. Il s'agissait de 2 techniques de PCR temps réel: la PCR-HRM (High Resolution Melting) et la PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System) à l'aide desquelles nous avons recherché la présence de mutations sur les exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* sur une série d'échantillons de tumeurs mammaires invasives. Les résultats obtenus avec les 2 techniques ont été comparés entre eux et ensuite corrélés aux critères cliniques et pathologiques des tumeurs.

Introduction

La PI3Kinase joue un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. La sous-unité catalytique de PI3K, codée par le gène *PIK3CA* est mutée dans 18 à 45% des cancers du sein. Ces mutations sont responsables de l'activation en aval de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et sont impliquées dans la tumorigenèse mammaire. Des résistances aux traitements anti-HER2, aux traitements hormonaux ou aux inhibiteurs de PI3K ont été décrites dans certains carcinomes mammaires présentant une hyperactivation de la voie PI3K.

Matériels et Méthodes

Cette étude consiste en l'analyse de 149 échantillons fixés au formol et inclus en paraffine de tumeurs de patientes atteintes d'un cancer du sein infiltrant par une technique de PCR-HRM (High Resolution Melting) et de 118 échantillons par une technique de PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System). La technique de PCR-HRM développée permet de détecter les mutations présentes sur l'ensemble des exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* et la technique de PCR-ARMS permet, quant à elle, de détecter de manière spécifique les mutations E542K, E545K sur l'exon 9 et les mutations H1047R et H1047L sur l'exon 20 du gène *PIK3CA*.

Résultats et Discussion

Une corrélation statistiquement significative a été trouvée entre les deux techniques de détection ($\kappa=0,845$; $p<0,001$). Les résultats de l'analyse du statut mutationnel du gène *PIK3CA* obtenus avec les 2 techniques de PCR sont donc comparables entre eux mais sont également comparables avec ce qui a précédemment été décrit dans la littérature. La PCR ARMS s'est révélée plus sensible que la PCR HRM pour la détection des mutations du gène *PIK3CA*.

Aucune relation significative entre présence de mutation et âge au diagnostic, type histologique, statut des récepteurs hormonaux et statut HER2 n'a été trouvée. Il existe cependant un lien significatif entre la présence de mutations sur les exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* et le grade SBR (Scarff-Bloom-Richardson). On retrouve une fréquence plus élevée de mutations sur l'exon 9 chez les patientes de grade SBR I alors que les mutations de l'exon 20 sont plus nombreuses chez les patientes présentant une tumeur de grades SBR II et III.

Conclusion

Les techniques de PCR HRM et de PCR ARMS pourraient donc être utilisées en routine pour déterminer le statut mutationnel du gène *PIK3CA*, ce qui permettrait de prédire la réponse à certains traitements et de développer des thérapies personnalisées pour les cancers invasifs mammaires.

Analysis of *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: Correlation with clinicopathological criteria

ALEXANDRE HARLÉ^{1,3}, MAËVA LION^{1,3}, NICOLAS LOZANO¹, MARIE HUSSON¹,
VALENTIN HARTER², PASCAL GENIN^{1,3} and JEAN-LOUIS MERLIN^{1,3}

Departments of ¹Biopathology and ²Biostatistics, Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre-lès-Nancy;
³Research Center for Automatic Control of Nancy (CRAN), University of Lorraine, Nancy, France

Received November 1, 2012; Accepted December 7, 2012

DOI: 10.3892/or.2013.2229

Abstract. Phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) are essential for cell signaling, proliferation, differentiation and survival. The catalytic subunit of PI3K, encoded by the *PIK3CA* oncogene, is mutated in 18-45% of breast carcinomas. These mutations, involved in tumorigenic processes, activate the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Resistance to anti-human epidermal growth factor receptor, hormonal or anti-PI3K therapies have been described in breast carcinomas bearing activation of the PI3K signaling pathway. The present study reports the evaluation of *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations in 149 invasive breast cancer cases using a validated PCR-high resolution melting assay (PCR-HRM). An amplification refractory mutation system (PCR-ARMS) using allele-specific scorpion primers was used to detect hotspot mutations in exons 9 (c.1624G→A and c.1633G→A) and 20 (c.3140A→G and c.3140A→T) in 118 tumor specimens. No correlation was observed with age at diagnosis, histological type, hormone receptor and HER2 status. *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations were found to be related to Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade with a lower rate of mutations and a higher frequency of exon 9 mutations in SBRI and exon 20 mutations in SBRII/III tumors. No difference was observed in the incidence rates of the two different mutations screened for each exon in any subcategory. A statistically significant correlation was found between PCR-HRM and PCR-ARMS ($\kappa=0.845$; $P<0.001$). PCR-ARMS was found to be more sensitive than PCR-HRM (sensitivity 0.5 and 5-10% of mutated DNA, respectively). We propose that PCR-HRM and PCR-ARMS can be combined for the cost-effective routine clinical identification of *PIK3CA* mutations for the purpose of personalizing therapy for invasive breast cancers.

Introduction

Female breast cancer is the most commonly diagnosed cancer with more than one million new cases every year and breast cancer is one of the leading causes of cancer-related death in women (1). The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) pathway is a major signaling pathway in cells and is involved in essential cell processes such as metabolism, survival, proliferation, growth and motility (2). Dysregulation of the PI3K pathway occurs in a large variety of human cancers (3) and has been proven to be implicated in breast cancer development and progression (4). PI3K converts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) to phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). The phosphatase and tensin homolog (PTEN) antagonizes and negatively regulates PI3K by converting PIP3 to PIP2 (5).

The PI3K/AKT/mTOR pathway appears to have a major role in the response to treatment and in the development of resistance to anticancer drugs. Overactivation of the PI3K pathway downstream of human epidermal growth factor receptors (HER) can be driven by mutations of PI3K, an enzyme from the lipid kinase family involved in cell signaling. These activating mutations occur mainly on p110 α , the catalytic subunit of PI3K encoded by the *PIK3CA* (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, α polypeptide) gene located on chromosome 3. *PIK3CA* mutations are present in 25% of breast carcinomas, and the most common activating mutations occur on exons 9 and 20 according to the COSMIC database (Catalogue Of Somatic Mutations in Cancer Database, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge; accessed June 2012; <http://www.sanger.ac.uk>). More precisely, E542K (c.1624G→A, p.Glu542Lys), E545K (c.1633G→A, p.Glu545Lys) in exon 9 and H1047R (c.3140A→G, p.His1047Arg), H1047L (c.3140A→T, p.His1047Leu), represent more than 90% of the mutations encountered in breast carcinomas. These four mutations have been shown to have an oncogenic role in breast cancers (6-9).

Recent studies have shown that PI3K may be implicated in the resistance of breast cancers to anti-estrogen therapy agents (10,11), anti-HER2 tyrosine kinase inhibitor (lapatinib) (12) and anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumab) (5,11,13). Mutations of *PIK3CA* and loss of the PTEN protein are keys

Correspondence to: Dr Alexandre Harlé, Department of Biopathology, Centre Alexis Vautrin, 6 Avenue de Bourgogne, CS 30159, F-54519 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France
E-mail: a.harle@nancy.unicancer.fr

Key words: *PIK3CA* mutations, breast cancer, PCR-high resolution melting assay, PCR-amplification refractory mutation system

Table I. Relationship between the *PIK3CA* mutation status analyzed using PCR-HRM and main standard clinicopathological and biological characteristics of the breast cancer cases.

	Total/class	No. of patients (%)		P-value ^a
		<i>PIK3CA</i> wild-type	<i>PIK3CA</i> mutated	
Total	118 (100.0)	88 (72.5)	30 (27.5)	
Age at diagnosis (years)				0.873
≤50	36 (30.5) ^f	26 (72.2) ^g	10 (27.8)	
>50	82 (69.5)	62 (75.6)	20 (24.4)	
Tumor histology				0.137
Ductal	102 (86.4)	73 (71.6)	29 (28.4)	
Lobular	15 (12.7)	14 (93.3)	1 (6.7)	
Others	1 (0.8)	1 (100.0)	0 (0.0)	
Estrogen receptor (ER) α status ^b				0.910
Positive	94 (81.7)	71 (75.5)	23 (24.5)	
Negative	21 (19.3)	15 (71.4)	6 (28.6)	
Progesterone receptor (PR) status ^b				0.603
Positive	74 (64.3)	57 (77.0)	17 (23.0)	
Negative	41 (35.7)	29 (70.7)	12 (29.3)	
HER2 status ^b				1.000
Positive ^c	12 (10.4)	9 (75.0)	3 (25.0)	
Negative	103 (89.6)	77 (74.8)	26 (25.2)	
Hormone receptor (HR) status ^{b,d}				0.796
Positive	95 (82.3)	72 (75.8)	23 (24.2)	
Negative	20 (27.7)	14 (70.0)	6 (30.0)	
Combined HER and HR status ^b				0.575
HER2 ⁺ /HR ⁺	8 (7.0)	7 (87.5)	1 (12.5)	
HER2 ⁺ /HR ⁻	4 (3.5)	2 (50.0)	2 (50.0)	
HER2 ⁻ /HR ⁺	87 (7.6)	65 (74.7)	22 (25.3)	
HER2 ⁻ /HR ⁻	16 (13.9)	12 (75.0)	4 (25.0)	
SBR grade ^e				0.050
I	14 (11.9)	8 (57.1)	6 (42.9)	
II	56 (47.5)	39 (69.6)	17 (30.4)	
III	48 (40.7)	41 (85.4)	7 (14.6)	

^a χ^2 or Fisher's exact test. ^bInformation available for 115 patients. ^cHER2 (3+) by immunohistochemistry or FISH-positive; ^dHR⁺, ER⁺ and/or PR⁺; HR⁻, ER⁻ and PR⁻. ^eScarff-Bloom-Richardson classification. ^fRefers to the total population. ^gRefers to the population of each category.

factors in the development of resistance to these drugs (14-16). Moreover, lapatinib and trastuzumab resistance can occur in HER2-amplified breast cancers bearing a *PIK3CA* mutation (5,14,15). HER2 overexpression in breast cancers is present in 15-25% of tumors (17,18). Approximately 75% of the breast cancers express estrogen receptors and/or progesterone receptors and a relationship between anti-estrogen resistance and activation of the PI3K pathway has recently been found (11). These new findings imply that the PI3K pathway may be an important target for novel targeted therapies.

New anti-PI3K and anti-mTOR drugs are currently under development (19,20) for breast cancer treatment. Activation of the PI3K/AKT pathway and overexpression of PI3K may play a major role in the use of new therapeutic schemes, and identi-

fication of *PIK3CA* mutations could be a major biomarker for predicting the response to these new therapies.

In light of these issues, there is a huge interest in developing rapid, reliable and sensitive methods that can be used for clinical routine detection of *PIK3CA* mutations in breast tumors. In the present study, we used a polymerase chain reaction (PCR)-high resolution melting assay (HRM) and a PCR-amplification refractory mutation system (ARMS) to analyze alcohol-formalin-acetic acid (AFA)-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. PCR-HRM is a cost-effective post-PCR method that enables the identification of alterations in single nucleotides, i.e., mutations through the analysis of thermal denaturation of double-stranded DNA. PCR-ARMS is a powerful mutation-specific real-time

Table II. Relationship between *PIK3CA* mutation status analyzed using PCR-ARMS and the main standard clinicopathological and biological characteristics of the breast cancer cases.

	Total/class	No. of patients (%)		P-value ^a
		<i>PIK3CA</i> wild-type	<i>PIK3CA</i> mutated	
Total	149 (100.0)	122 (81.9)	27 (18.1)	
Age at diagnosis (years)				
≤50	48 (30.5) ^f	36 (72.2) ^g	12 (27.8)	0.202
>50	101 (69.5)	86 (75.6)	15 (24.4)	
Tumor histology				
Ductal	127 (85.2)	102 (71.6)	25 (28.4)	0.521
Lobular	19 (12.8)	17 (93.3)	2 (6.7)	
Others	3 (2.0)	2 (66.7)	1 (33.3)	
Estrogen receptor (ER) α status ^b				
Positive	113 (81.7)	93 (75.5)	20 (24.5)	0.981
Negative	30 (19.3)	24 (71.4)	6 (28.6)	
Progesterone receptor (PR) status ^b				
Positive	88 (64.3)	71 (77.0)	17 (23.0)	0.823
Negative	55 (35.7)	46 (70.7)	9 (29.3)	
HER2 status ^b				
Positive ^c	19 (10.4)	16 (75.0)	3 (25.0)	1.000
Negative	124 (89.6)	101 (74.8)	23 (25.2)	
Hormone receptor (HR) status ^{b,d}				
Positive	115 (82.3)	95 (75.8)	20 (24.2)	0.823
Negative	28 (27.7)	22 (70.0)	6 (30.0)	
Combined HER and HR status ^b				
HER2 ⁺ /HR ⁺	13 (7.0)	12 (87.5)	1 (12.5)	0.593
HER2 ⁻ /HR ⁺	102 (7.6)	83 (74.7)	19 (25.3)	
HER2 ⁺ /HR ⁻	6 (3.5)	4 (50.0)	2 (50.0)	
HER2 ⁻ /HR ⁻	22 (13.9)	18 (75.0)	4 (25.0)	
SBR grade ^e				
I	14 (11.9)	7 (57.1)	7 (42.9)	0.004
II	67 (47.5)	55 (69.6)	12 (30.4)	
III	64 (40.7)	56 (85.4)	8 (14.6)	

^aχ² or Fisher's test. ^bInformation available for 143 patients. ^cHER2 (3+) by immunohistochemistry or FISH-positive; ^dHR⁺, ER⁺ and/or PR⁺; HR⁻, ER⁻ and PR⁻. ^eScarff-Bloom-Richardson classification. ^fRefers to the total population. ^gRefers to the population of each category.

PCR-based technique combining ARMS and a bi-functional fluorescent probe/primer molecule (Scorpion).

The present study evaluated the relationship between *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations and conventional clinicopathological criteria and compared the sensitivity of the two techniques by examining the correlation of the results achieved using both methods. The final goal was to validate a double technique approach, ensuring a cost-effective, rapid process yielding a high quality level of analysis, according to the recommendations of the French National Cancer Institute (INCa) for clinical routine analysis of mutations in tumors in a treatment-choosing process. In such a context, PCR-HRM could be proposed to determine the *PIK3CA* mutational status yielding binary results (mutated or wild-type) and PCR-ARMS-Scorpion to accurately identify the four main hotspot mutations of *PIK3CA*.

Patients and methods

Population. One hundred and forty-nine invasive breast carcinoma tumor specimens, from patients diagnosed between 2008 and 2009, were retrospectively included in this study. All specimens were collected as AFA-fixed paraffin-embedded tissues from our institutional Biobank. The tumor characteristics of this population were consistent with literature data regarding mean age at diagnosis, histological type (ductal and lobular), Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade as well as hormone receptor and HER2 status (Tables I and II). According to the Biobank procedure of our institute, all women involved in this study were informed that their tumor samples might be used for research purposes and had the opportunity to decline. No opposition was expressed.

DNA extraction. For each tumor specimen, hematoxylin and eosin slide analysis was conducted by a pathologist to ensure a minimum of 20% tumor tissue content as recommended in previous studies (21). Selected areas were macrodissected and 5 10- μ m serial sections were cut from each paraffin block and collected in RNAase DNAase-free vials (SafeSeal Microcentrifuge Tubes, Sorenson Biosciences, Salt Lake City, UT, USA). Paraffin was removed by extraction with toluene (VWR BDH Prolabo, Fontenay Sous Bois, France) and centrifuged. DNA isolation was performed using the QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) protocol. The pellet was washed with ethanol, centrifuged and resuspended with 180 μ l of tissue lysis buffer (ATL buffer; Qiagen) and 20 μ l of proteinase K (Qiagen). The sample was then gently mixed, incubated at 56°C for 1 h and at 90°C for 1 h under agitation. DNA was extracted with MinElute Columns (Qiagen) as recommended by the manufacturer. The nucleic acids were eluted in a volume of 100 μ l. Final concentration of eluates, ranging from 33.6 to 729.0 ng/ml, were suitable for PCR-HRM and PCR-ARMS analyses (Table III). DNA extracts from cell lines bearing E542K (Cal51), E545K (MCF7), H1047R (HCT116) and H1047R (SUM159PT) PI3-kinase mutations were used as positive controls. DNA extracted from the MDA231 cell line was used as a wild-type negative control. DNA quality was controlled using agarose gel electrophoresis with *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) as the control housekeeping gene. Only DNA with no degradation was used. DNA concentrations were determined using a Bio-photometer (Eppendorf, Hamburg, Germany).

PCR-HRM. HRM analysis was performed using the LightCycler 480[®] Real-Time PCR system (Roche Diagnostics, Meylan, France) and the LightCycler 480 HRM Master kit (Roche Diagnostics) in 384-well plates (Roche Diagnostics). Twenty micrograms of DNA was amplified in a final volume of 20 μ l. All data and melting curves were analyzed using LightCycler SW v. 1.5.0.39 software (Roche Diagnostics). One mix was prepared for each exon. For each sample, 10 μ l of Master Mix (Roche Diagnostics), 2.8 μ l of MgCl₂ 25 mM, PCR-quality grade water and 1 μ l of the primers (forward and reverse) were added. Eighteen microliters of mix was added to each well, and 2 μ l of the sample was used for the analysis. One set of primers were used for each of the *PIK3CA* exons 9 and 20. All primers were designed as previously described (22).

PCR-HRM was divided into different phases: a phase of pre-incubation (10 min at 95°C) was followed by 45 cycles of classic PCR (10 sec at 95°C, a temperature decrease from 60 to 54°C by 0.5°C/cycle in 15 sec and, finally, 10 sec at 72°C). The PCR phase was followed by the high resolution melting phase which consisted of 1 min at 95°C, 1 min at 40°C and a temperature increase by 0.2°C/sec from 65 to 95°C. A cooling phase of 1 min at 40°C was finally performed.

PCR-ARMS. ARMS analysis was performed using the LightCycler 480 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics) in 384-well plates. Eighty micrograms of DNA was amplified in a final volume of 20 μ l. Data and fluorescence curves were analyzed using LightCycler SW v. 1.5.0.39 software. All primers were designed as previously described (23). One mix was made for each tested mutation and all samples

were proceeded as simplex. For each sample, 0.06 μ l of Hot Diamond Taq polymerase (Eurogentec, Angers, France) was added together with 2 μ l of reaction buffer 10X (Eurogentec), 3.2 μ l of MgCl₂ 25 mM (Eurogentec), 0.4 μ l of dNTP 10 mM (Eurogentec), PCR-quality water, 0.8 μ l of ARMS primers 6.25 μ M (Eurogentec) and 0.8 μ l of Scorpion primers 6.25 μ M (ATD Bio, Southampton, UK). Eighteen microliters of mix was added to each well, and 2 μ l of the sample was used for the analysis. The mix for exon 9 mutations contained ARMS control primers for exon 15, specific ARMS primers, respectively, of E542K and E545K mutations and exon 9 and 15 specific Scorpion primers. The mix for exon 20 mutations contained ARMS control primers for exon 15, specific ARMS primers, respectively, of H1047R and H1047L mutations and exon 20 and 15 specific Scorpion primers.

Sensitivity. The sensitivity of PCR-HRM and PCR-ARMS was evaluated by mixing mutated and wild-type DNA from the cell lines at 50, 25, 10, 5, 2, 1 and 0.5% ratios.

Statistical analysis. The significance of the concordance of mutation detection using the two methods was assessed using κ statistics. $\kappa > 0.8$ was considered as indicative of significance to conclude that both methods provide similar results. The χ^2 test was also used to compare mutation frequencies with those obtained from the literature. χ^2 and Fisher's exact tests were used to test for differences between classes of patients and tumors based on clinical, pathological and biological characteristics. Limit of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Mutation analysis using PCR-HRM. One hundred and eighteen specimens were analyzed using PCR-HRM (Table I). *PIK3CA* mutations (exons 9 and 20) were detected in 30 (27.5%) of the specimens. No correlation was found regarding patient age (≤ 50 or > 50 years), ductal or luminal type, estrogen and progesterone status (alone or combined as hormonal receptor status), HER2 status, and for the four subtypes identified as HER2⁺/HR⁺, HER2⁺/HR, HER2⁻/HR⁺ and HER2⁻/HR (triple negative).

PIK3CA mutations were found to be correlated with SBR grade ($P = 0.050$) with a lower mutation rate noted in the highest grades. Regarding the frequency of exon 9 and 20 mutations, a low rate of exon 9 mutations was observed in SBR grade III tumors ($P = 0.025$) while no difference was observed for the exon 20 mutation rate. Exon 9 mutations were found to be more frequent in SBR grade I tumors while exon 20 mutations were predominantly observed in SBR grade II and III tumors.

Mutation analysis using PCR-ARMS. One hundred and forty-nine specimens were analyzed using PCR-ARMS (Table II). *PIK3CA* mutations (exons 9 and 20) were detected in 27 (18.1%) specimens. No difference was found regarding patient age (≤ 50 or > 50 years), ductal or luminal type, estrogen and progesterone status (alone or combined as hormonal receptor status), HER2 status, and for the four subtypes (HER2⁺/HR⁺, HER2⁺/HR, HER2⁻/HR⁺ and HER2⁻/HR, i.e., triple negative). As with PCR-HRM, *PIK3CA* mutations were found to be related with SBR grade ($P = 0.004$) with a lower mutation rate

Table III. Contingency table of the 102 samples analyzed by combined PCR-HRM and PCR-ARMS assays.

Sample no.	Sample DNA concentration (ng/ μ l)	PCR-HRM		PCR-ARMS	
		Test result	Mutation result	Test result	Mutation result
1	33.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
2	61.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
3	95.9	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
4	64.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
5	105.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
6	164.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
7	71.1	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G→A
8	69.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
9	95.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
10	39.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
11	68.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
12	60.7	Mutation detected	Exon 9	Mutation not detected	N/A
13	62.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
14	108.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
15	162.7	Mutation detected	Exon 9	Mutation not detected	N/A
16	319.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
17	221.4	Mutation detected	Exon 20	Mutation not detected	N/A
18	109.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
19	146.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
20	201.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
21	199.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
22	224.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
23	35.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
24	201.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
25	175.8	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.31401→T
26	104.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
27	211.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
28	662.0	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1633G→A
29	457.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
30	223.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
31	199.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
32	68.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
33	122.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
34	232.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
35	252.4	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.31401→T
36	155.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
37	75.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
38	486.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
39	164.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
40	204.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
41	124.4	Mutation detected	Exon 9	Mutation not detected	N/A
42	291.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
43	206.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
44	67.6	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1633G→A
45	96.4	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
46	26.9	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.31401→T
47	99.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
48	41.4	Mutation detected	Exon 9	Mutation not detected	N/A
49	127.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
50	184.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
51	86.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
52	499.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A

Table III. Continued.

Sample no.	Sample DNA concentration (ng/ μ l)	PCR-HRM		PCR-ARMS	
		Test result	Mutation result	Test result	Mutation result
53	188.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
54	140.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
55	357.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
56	252.5	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
57	211.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
58	213.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
59	230.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
60	227.3	Mutation detected	Exon 9	Mutation not detected	N/A
61	729.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
62	144.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
63	202.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
64	45.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
65	154.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
66	301.8	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.31401→T
67	178.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
68	151.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
69	543.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
70	70.3	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G→A
71	179.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
72	202.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
73	244.9	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1633G→A
74	130.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
75	256.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
76	90.2	Mutation not detected	N/A	Mutation detected	c.1624G→A
77	302.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
78	138.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
79	117.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
80	130.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
81	120.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
82	149.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
83	221.2	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
84	107.8	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G→A
85	166.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
86	277.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
87	111.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
88	81.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
89	170.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
90	252.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
91	127.9	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
92	102.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
93	111.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
94	306.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
95	96.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
96	88.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
97	122.6	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A→G
98	222.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
99	194.4	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G→A
100	44.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
101	185.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation not detected	c.3140A→G
102	127.3	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G→A

Discordant results are highlighted in bold. N/A, not applicable.

Table IV. Frequencies of mutations detected with combined PCR-ARMS and PCR-HRM assays.

Nucleotide change	Protein change	No. of samples	Relative (%)	Total (%)
PCR-ARMS				
Exon 9				
c.1624G→A	E542K	6	26.1	5.9
c.1633G→A	E545K	3	13.0	2.9
Exon 20				
c.3140A→G	H1047R	10	43.5	9.8
c.31401→T	H1047L	4	17.4	3.9
Total		23	100.0	22.5
PCR-HRM				
Exon 9	Not available	13	46.4	12.8
Exon 20	Not available	15	53.6	14.7
Total		28	100.0	27.5

Table V. Summary of the results achieved with combined PCR-HRM and PCR-ARMS assays.

	PCR-HRM		Total
	Mutated	Wild-type	
PCR-ARMS			
Mutated	22	1	23
Wild-type	6	73	79
Total	28	74	102

in the highest grades. Regarding the frequency of exon 9 and 20 mutations, a lower rate of exon 9 and exon 20 mutations was observed in SBR grade III tumors ($P=0.009$). Again, exon 9 mutations were found to be predominant in SBR grade I tumors (5/7) while exon 20 mutations were predominantly observed in SBR grade II and III tumors (13/20).

Comparative analysis of PCR-HRM and PCR-ARMS. One hundred and two breast tumor samples (Table III) were analyzed using both PCR-HRM and PCR-ARMS. *PIK3CA* mutations were detected (Table IV) in 28 tumors (27.5%) when PCR-HRM was used and 23 (22.5%) when PCR-ARMS was used.

Among the 28 mutated tumors (Table IV), PCR-HRM results showed that 13 (46.4%) carried a mutation on exons 9 and 15 (53.6%) on exon 20.

Among the 23 samples in which a mutation was detected using PCR-ARMS assay (Table IV), 9 (39.1%) carried a mutation in exon 9, identified as c.1624G→A in 6 cases (26.1%) and as c.1633G→A in the 3 others (13.0%). Among the remaining 14 (60.9%) specimens identified as mutated in exon 20, 10 (43.5%) carried the c.3140A→G and 4 (17.4%) the c.3140A→T mutation. No sample was found with mutations in both exons 9 and 20 with any of the assays.

Table VI. Limits of sensitivity of PCR-HRM and PCR-ARMS assays.

Nucleotide change	Protein change	Sensitivity (%)	DNA quantity (ng)
PCR-HRM			
Exon 9	Not available	5	1.0
Exon 20	Not available	10	2.0
PCR-ARMS			
Exon 9			
c.1624G→A	E542K	0.5	0.8
c.1633G→A	E545K	0.5	0.8
Exon 20			
c.3140A→G	H1047R	0.5	0.8
c.31401→T	H1047L	0.5	0.8

Sensitivity. The analytical sensitivity of each assay was evaluated from dilution of DNA extracted from *PIK3CA*-mutated cell lines into DNA from *PIK3CA* wild-type cell lines (MDA 231) from 0.5 to 50%. PCR-HRM was able to discriminate a dilution corresponding to 5% of exon 9 mutated DNA and 10% of exon 20 mutated DNA (Fig. 1, Table VI). PCR-ARMS was able to discriminate a DNA dilution corresponding to 0.5% of c.1624G→A, 0.5% of c.1633G→A, 0.5% of c.3140A→G and 0.5% of c.3140A→T mutated DNA (Fig. 2, Table VI).

Results obtained using PCR-ARMS and PCR-HRM (Table V), were found to be statistically comparable ($\kappa=0.845$, $P<0.001$). Contingency table is shown in Table III.

No statistical difference in the frequencies of *PIK3CA* mutations was found between results achieved with any of the two assays and data from Sanger database.

Discussion

Recent studies have shown that *PIK3CA* mutations play a major role in resistance to trastuzumab or lapatinib (5) or to hormonal therapy (11,13) of breast carcinomas and could represent a potent response predictive marker for PI3-kinase- and mTOR-targeted therapies (24) and be used as a treatment-choosing parameter. *PIK3CA* mutations are mostly located within exons 9 and 20 and four hotspots (c.1624G→A, c.1633G→A, c.3140A→G and c.3140A→T) represent more than 90% of all mutations. Although the prognostic value of *PIK3CA* mutations in breast cancer remains controversial, in a recent evaluation of 2587 breast cancers cases from 12 independent studies, Dumont *et al* (24) reported a more favorable clinical outcome in patients with *PIK3CA* mutated tumors and that improved prognosis may pertain only to patients with a mutation in the kinase domain of p110 α and to post-menopausal women with estrogen-positive cancers.

The relative prognostic value of exon 9 vs. 20 mutations also remains controversial. Barbareschi *et al* (25), found that exon 9 mutations have a negative prognostic value while exon 20 mutations were associated with favorable outcome while Lai *et al* (26) reported exon 20 mutations as associated with poor prognosis. Furthermore, Lerma *et al* (27)

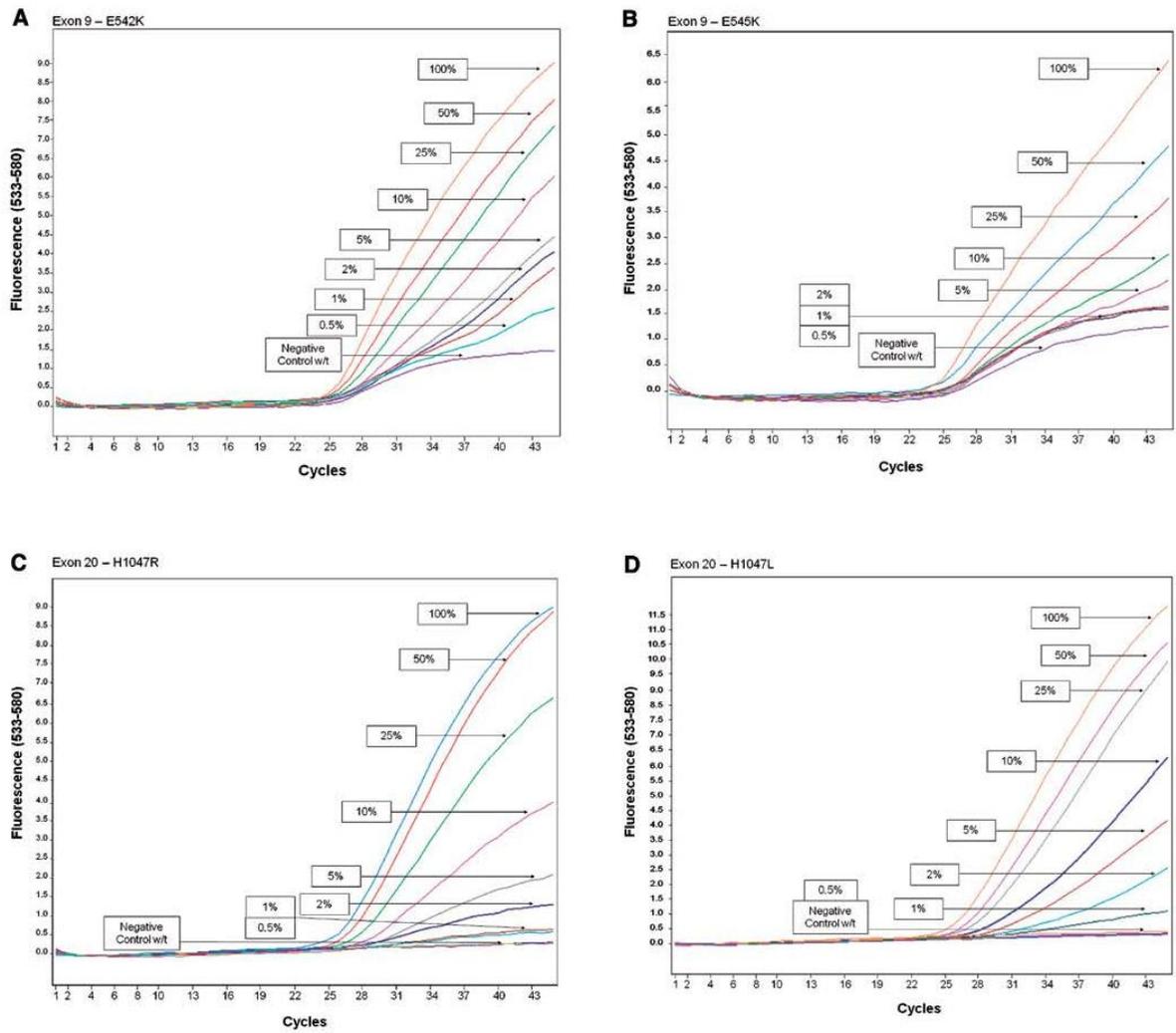


Figure 1. Sensitivity results for (A) E542K, (B) E545K, (C) H1047R and (D) H1047L mutations using PCR-A-RMS.

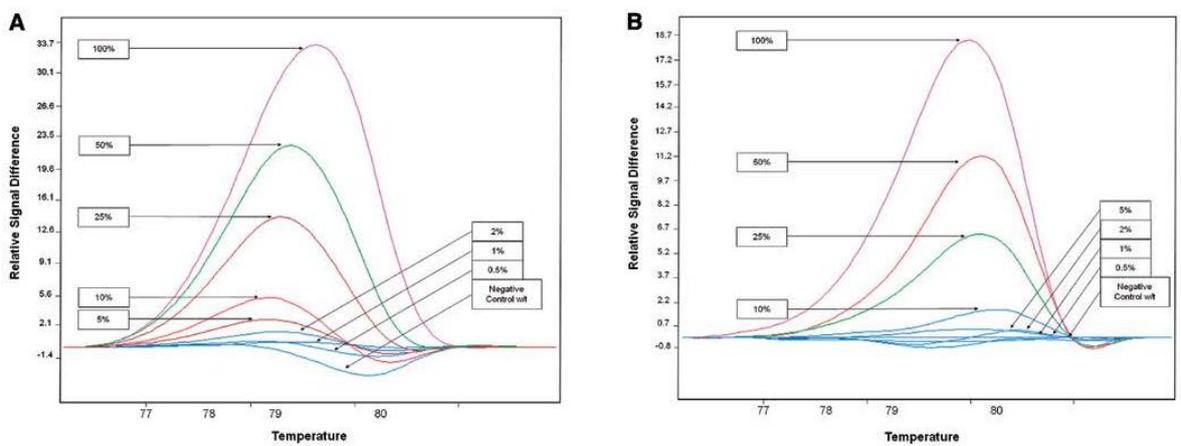


Figure 2. Sensitivity results for (A) exon 9 and (B) exon 20 mutations using PCR-HRM.

reported a decrease in survival in *PIK3CA* exon 20-mutated and HER2-positive patients. This study was retrospective and was based on a small number of cases (only 6 patients in the exon 20-mutated *PIK3CA* and HER2-positive group) and was never confirmed prospectively. Finally, in a larger series of patients, Cizkova *et al* (28) did not find any difference between exon 9- and exon 20-mutated tumors regarding metastasis-free survival. Using immunohistochemistry, Aleskandarany *et al* (29) reported that *PIK3CA* protein expression in invasive breast cancer was associated with poor prognosis.

The frequencies of *PIK3CA* mutations reported here, with PCR-HRM and PCR-ARMS, respectively, are fully consistent with COSMIC database values and previously published results reporting 18-40% of *PIK3CA* mutations in breast tumors (7,26,30-33).

In the present series, with a relatively limited number of cases, no significant correlation was observed between *PIK3CA* mutations and several clinical and histopathological criteria. Concerning the age at diagnosis, a higher *PIK3CA* mutation rate was noted in older patients (34) that was not observed in other series (25,26,28). The same is true for the histological type of breast cancer, when comparing ductal and lobular types. Some studies reported *PIK3CA* mutations to be more frequently observed in ductal than in lobular carcinomas (25,28,34) while others did not (35).

Although it has been reported that *PIK3CA* mutations are related to hormone receptor and HER2 status (28,34), this issue still remains controversial since no correlation between *PIK3CA* mutations and hormonal status has been observed (25,36,37) similarly to the results of the present study, or limited to estrogen receptor status, but not to progesterone receptor status (35). Similar findings have been found concerning the correlation between *PIK3CA* mutations and HER2 status (28,34) but again are controversial in other series (25,35) or observed when HER2 is determined using immunohistochemistry but not FISH (37). A higher frequency of *PIK3CA* mutation has also been noted in low SBR grade tumors similarly to the observation in the present series and consistently with other studies (28,34) but contrary with others (35).

All these discrepancies among the different studies could probably be explained by the relatively limited number of cases that were analyzed and the different techniques that were used for *PIK3CA* mutation analysis with different sensitivity limits. This also probably explains why a large range of mutation rates were reported. This point clearly justifies that consideration should be given to the validation and especially the endpoints and sensitivity limits of the assays that are routinely used.

Combining PCR-HRM and PCR-ARMS assays, several discrepancies were observed between the two techniques in 6 (5.9%) samples. All were identified as *PIK3CA* wild-type using PCR-ARMS and mutated using PCR-HRM; 5 samples with mutations on exon 9 and 1 sample with mutation on exon 20. Because our PCR-ARMS assay was designed to specifically, but only, identify the four main *PIK3CA* mutations (c.1624G>A, c.1633G>A, c.3140A>G and c.3140A>T), it is obvious that the 6 discordant cases should bear other mutations on exon 9 or 20, that were only detected using PCR-HRM which is an exon-specific method, able to detect all the somatic mutations on the entire exon 9 and 20. Exon 9 and 20 mutations, not located in the four main hotspots, were reported to

represent approximately 10% of all exon 9 and 20 mutations in breast cancers (28). Our data were consistent with these values. In the present series, this rate of *PIK3CA* mutations, differing from the four main mutations identified by PCR-ARMS was found to be consistent with data recently reported in breast cancer (28).

Direct Sanger sequencing of these samples could confirm the hypothesis that they may carry another mutation but the lack of sensitivity of Sanger sequencing (approximately 20% mutant DNA) could be not discriminatory between a false-positive with HRM or a false-negative with sequencing (38).

The PCR-HRM and PCR-ARMS assays used here are highly sensitive, able to detect as low as 5% of mutated DNA for exon 9 (2.0 ng) and 10% for exon 20 (4.0 ng) and 0.5% (0.8 ng) of mutated DNA. The PCR-ARMS assay is more sensitive than pyrosequencing-based assay as previously described (38) and which was able to detect 5% of mutated DNA and even higher than another PCR-ARMS assay as previously reported (5 ng) (23). This high sensitivity could be explained by the high specificity of the primers used for this technique.

High sensitivity assays are required for routine analysis of mutations in clinical specimens. Recent results (39) achieved in colon cancer using *KRAS* mutation analysis, reported that sequencing was not sensitive enough to provide clinically relevant results yielding too many false-negative results. The authors recommended the use of more sensitive techniques with a detection limit approximating 1-2% to overcome this problem.

In conclusion, the present study highlighted the potential of PCR-HRM- and PCR-ARMS-based assays for the evaluation of the *PIK3CA* mutation status in breast cancers. No correlation was observed with patient age at diagnosis, histological type, hormone receptor and HER2 status. *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations were found to be related to Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade with a lower rate of mutations and a higher frequency of exon 9 mutations in SBRI and exon 20 mutations in SBRII/III tumors. No difference was observed in the frequency of the two different mutations screened for each exon in any subcategory. Thus, we propose to use a combination of both assays, with a screening of full exon 9 and 20 using PCR-HRM and further identification of the four main mutations using PCR-ARMS. Following analysis of our data, using such a procedure would have led to only one false-negative result (<1%) which is quite satisfactory. Combining these two assays should represent a cost-effective rapid procedure that provides highly reliable results that are fully consistent with the attempts of practitioners in view of personalizing therapy for invasive breast cancers.

Acknowledgements

The authors are grateful to the French 'Ligue contre le Cancer, Comités Lorrains' for supporting this study.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90, 2011.
2. Engelman JA, Luo J and Cantley LC: The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7: 606-619, 2006.

3. Tokunaga E, Oki E, Egashira A, *et al.*: Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 8: 27-36, 2008.
4. McAuliffe PF, Meric-Bernstam F, Mills GB and Gonzalez-Angulo AM: Deciphering the role of PI3K/Akt/mTOR pathway in breast cancer biology and pathogenesis. *Clin Breast Cancer* 10: S59-S65, 2010.
5. Wang L, Zhang Q, Zhang J, *et al.*: PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC Cancer* 11: 248, 2011.
6. Jiang BH and Liu LZ: PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 102: 19-65, 2009.
7. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, *et al.*: The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 3: 772-775, 2004.
8. Karakas B, Bachman KE and Park BH: Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer* 94: 455-459, 2006.
9. Dunlap J, Le C, Shukla A, *et al.*: Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 120: 409-418, 2009.
10. Orlando L, Schiavone P, Fedele P, *et al.*: Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer Treat Rev* 36: S67-S71, 2010.
11. Miller TW, Balko JM and Arteaga CL: Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol* 29: 4452-4461, 2011.
12. Abramson V and Arteaga CL: New strategies in HER2-overexpressing breast cancer: many combinations of targeted drugs available. *Clin Cancer Res* 17: 952-958, 2011.
13. Ma CX, Crowder RJ and Ellis MJ: Importance of PI3-kinase pathway in response/resistance to aromatase inhibitors. *Steroids* 76: 750-752, 2011.
14. Razis E, Bobos M, Kotoula V, *et al.*: Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast* 128: 447-456, 2011.
15. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, *et al.*: Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol* 29: 166-173, 2011.
16. Esteve FJ, Guo H, Zhang S, *et al.*: PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol* 177: 1647-1656, 2010.
17. Baselga J: Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 21: vii36-40, 2011.
18. Garrett JT and Arteaga CL: Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol Ther* 11: 793-800, 2011.
19. Tanaka H, Yoshida M, Tanimura H, *et al.*: The selective class I PI3K inhibitor CH5132799 targets human cancers harboring oncogenic PIK3CA mutations. *Clin Cancer Res* 17: 3272-3281, 2011.
20. Dan S, Okamura M, Mukai Y, *et al.*: ZSTK474, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, induces G1 arrest of the cell cycle in vivo. *Eur J Cancer* 48: 936-943, 2012.
21. Bibeau F, Frugier H, Denouel A, Sabourin JC and Boissiere-Michot F: Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The pathologist's point of view. *Bull Cancer* 96: S15-S22, 2009 (In French).
22. Vorkas PA, Poumpouridou N, Agelaki S, Kroupis C, Georgoulas V and Lianidou ES: PIK3CA hotspot mutation scanning by a novel and highly sensitive high-resolution small amplicon melting analysis method. *J Mol Diagn* 12: 697-704, 2010.
23. Board RE, Thelwell NJ, Ravetto PF, *et al.*: Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA. *Clin Chem* 54: 757-760, 2008.
24. Dumont AG, Dumont SN and Trent JC: The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. *Chin J Cancer* 31: 327-334, 2012.
25. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, *et al.*: Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 13: 6064-6069, 2007.
26. Lai YL, Mau BL, Cheng WH, Chen HM, Chiu HH and Tzen CY: PIK3CA exon 20 mutation is independently associated with a poor prognosis in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol* 15: 1064-1069, 2008.
27. Lerma E, Catusas L, Gallardo A, *et al.*: Exon 20 PIK3CA mutations decrease survival in aggressive (HER-2 positive) breast carcinomas. *Virchows Arch* 453: 133-139, 2008.
28. Cizkova M, Susini A, Vacher S, *et al.*: PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res* 14: R28, 2012.
29. Aleskandarany MA, Rakha EA, Ahmed MA, *et al.*: PIK3CA expression in invasive breast cancer: a biomarker of poor prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 122: 45-53, 2009.
30. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, *et al.*: Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 64: 7678-7681, 2004.
31. Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, *et al.*: Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* 11: 2875-2878, 2005.
32. Miron A, Varadi M, Carrasco D, *et al.*: PIK3CA mutations in situ and invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 70: 5674-5678, 2010.
33. Wu G, Xing M, Mambo E, *et al.*: Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 7: R609-R616, 2005.
34. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, *et al.*: PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 15: 5049-5059, 2009.
35. Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Monden M and Noguchi S: Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. *Clin Cancer Res* 13: 408-414, 2007.
36. Ellis MJ, Lin L, Crowder R, *et al.*: Phosphatidylinositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 119: 379-390, 2010.
37. Perez-Tenorio G, Alkhorri L, Olsson B, *et al.*: PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* 13: 3577-3584, 2007.
38. Baker CL, Vaughn CP and Samowitz WS: A PIK3CA pyrosequencing-based assay that excludes pseudogene interference. *J Mol Diagn* 14: 56-60, 2012.
39. Tougeron D, Lecomte T, Pages JC, *et al.*: Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 30: 3520, 2012.

II.2. Signification clinique, diagnostique et intérêt théranostique des mutations du gène *PIK3CA* dans le cancer du sein

Suite à l'étude du statut mutationnel du gène *PIK3CA* par 2 techniques de PCR et à la détermination des corrélations clinico-biologiques, nous avons réalisé un travail de synthèse visant à faire le point sur l'ensemble des connaissances actuelles concernant les mutations du gène *PIK3CA*. Cette synthèse comprenait aussi bien les aspects biologiques de ces mutations que leur signification clinique ou encore leur intérêt théranostique dans le traitement des cancers du sein. Un article de revue publié en 2013 dans le Bulletin du Cancer (Harlé A., Lion M., Lozano N., Merlin JL. Signification clinique, diagnostique et intérêt théranostique des mutations du gène *PIK3CA* dans le cancer du sein. Bull Cancer. 2013 Oct;100(10):947-54) dresse un état des lieux des connaissances et des recherches actuelles concernant les mutations du gène *PIK3CA*.

Résumé

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme avec plus de 53 000 nouveaux cas par an en France. La voie PI3K/AKT est l'une des voies majeures intervenant dans l'oncogenèse mammaire. Le premier effecteur de cette voie, directement en aval des récepteurs HER, est la PI3Kinase. Certaines mutations du gène *PIK3CA*, codant la partie catalytique de cette enzyme, jouent un rôle important, notamment dans la résistance aux thérapies ciblées utilisées durant ces dix dernières années. En effet, la présence d'altérations, l'emballement de la voie PI3K/AKT, ou encore la présence de mutations sur le gène *PIK3CA* expliqueraient certaines résistances aux thérapies ciblées. Les mutations *PIK3CA* semblent également présenter un intérêt dans la prédiction de la réponse aux thérapies ciblées. Enfin, un certain nombre de molécules en développement, ciblant spécifiquement PI3K ou d'autres effecteurs de la voie PI3K/AKT sont destinées à être administrées uniquement aux patientes dont la tumeur présente une anomalie du gène *PIK3CA*, ce qui rend leur détection particulièrement importante en génétique tumorale. Cet article a pour but d'effectuer un point sur l'aspect biologique, la signification clinique, diagnostique et l'intérêt théranostique des mutations du gène *PIK3CA* dans le cancer du sein.

Signification clinique, diagnostique et intérêt théranostique des mutations du gène *PIK3CA* dans le cancer du sein

Clinical, diagnostic significance and theranostic interest of PIK3CA gene mutations in breast cancer

Alexandre Harlé^{1,2,3}, Maëva Lion^{1,2,3}, Nicolas Lozano¹, Jean-Louis Merlin^{1,2,3}

¹ Institut de cancérologie de Lorraine, service de biopathologie, 6, avenue de Bourgogne, CS30519, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy, France

² CNRS, UMR 7039 CRAN, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France

³ Université de Lorraine, 54000 Nancy, France

<a.harle@nancy.unicancer.fr>

Article reçu le 26 mars 2013,

accepté le 06 août 2013

Tirés à part : A. Harlé

Pour citer cet article : Harlé A, Lion M, Lozano N, Merlin JL. Signification clinique, diagnostique et intérêt théranostique des mutations du gène *PIK3CA* dans le cancer du sein. *Bull Cancer* 2013 ; 100 : 947-54.

doi : 10.1684/bdc.2013.1827.

Résumé. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme avec plus de 53 000 nouveaux cas par an en France. La voie PI3K/AKT est l'une des voies majeures intervenant dans l'oncogenèse mammaire. Le premier effecteur de cette voie, directement en aval des récepteurs *Human Epidermal growth factor Receptor* (HER), est l'enzyme *phosphatidyl-inositol-3-kinase* (PI3K). Certaines mutations du gène codant la partie catalytique de cette enzyme, le gène *PIK3CA*, jouent un rôle important, notamment dans la résistance aux thérapies ciblées utilisées durant ces dix dernières années. En effet, la présence d'altération ou l'emballlement de la voie PI3K/AKT, ou encore la présence de mutation sur le gène *PIK3CA* expliqueraient certaines résistances aux thérapies ciblées. Les mutations *PIK3CA* semblent également présenter un intérêt dans la prédiction de la réponse aux thérapies ciblées. Enfin, un certain nombre de molécules en développement, ciblant spécifiquement PI3K ou un autre effecteur de la voie PI3K/AKT sont destinées à être administrées uniquement aux patientes dont la tumeur présente une anomalie du gène *PIK3CA*, ce qui rend leur détection particulièrement importante en génétique tumorale. Cet article a pour but d'effectuer un point sur l'aspect biologique, la signification clinique, diagnostique et l'intérêt théranostique des mutations du gène *PIK3CA* dans le cancer du sein. ▲

Abstract. Breast cancer is the most common cancer among women with more than 53,000 new cases every year in France. The PI3K/AKT pathway is one of the major pathways involved in mammary tumorigenesis. The first effector of this pathway downstream Human Epidermal growth factor Receptor (HER receptors) is the enzyme phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K). Some mutations in the gene encoding for the catalytic subunit of this enzyme, the *PIK3CA* gene, plays an important role, especially in the resistance to targeted therapies used clinically during the last decade. Indeed, the presence of alterations, an overexpression of the PI3K/AKT pathway, or the presence of *PIK3CA* mutation could explain some resistance to targeted therapies. *PIK3CA* mutations also appear to have a significant interest in the prediction of response to targeted therapies. Finally, many drugs in development, specifically targeting PI3K or other effectors of the PI3K/AKT pathway are intended to be administered only to patients with tumor bearing a mutation of *PIK3CA*, which makes the somatic mutations detection more and more important. The aim of this article is to consider biological aspects, clinical significance, diagnostic and theranostic interest of *PIK3CA* mutations in breast cancer. ▲

Mots clés : cancer du sein, PIK3CA, PI3Kinase, diagnostic moléculaire, théranostique

Key words : breast cancer, PIK3CA, PI3Kinase, molecular diagnostics, theranostics

Introduction

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme avec plus de 53 000 nouveaux cas par an en France. Il est responsable de plus de 11 500 décès par an [1]. On estime qu'environ 25 % des femmes atteintes de cancer du sein auront une évolution métastatique de leur maladie.

Le cancer apparaît de plus en plus comme une maladie de la signalisation cellulaire [2] et cette signalisation s'exerce en grande partie en faisant intervenir en amont la famille des récepteur *Human Epidermal growth factor Receptor* (HER). La dimérisation de ces récepteurs va provoquer leur activation. Cette dimérisation s'effectue soit entre récepteurs d'un groupe identique pour former un homodimère, soit entre récepteurs d'un groupe différent pour former un hétérodimère. Une fois le récepteur activé, une cascade de signalisation se propage en aval du récepteur. L'activation est définitive et seule l'internalisation puis le recyclage ou la dégradation par voie lysosomale mettront fin à cette activation. Différentes voies de signalisation sont impliquées en aval des HER, en particulier la voie de PI3K (PI3K) et la voie des MAP kinases (MAPK).

La voie PI3K/AKT est l'une des voies majeures intervenant dans l'oncogenèse mammaire [3-7]. Le premier effecteur de cette voie est l'enzyme *Phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3K). La dernière décennie a vu apparaître de nouvelles thérapies anticancéreuses ciblant spécifiquement HER2 [8]. À l'instar de l'hormonothérapie, historiquement première thérapie ciblée utilisée dans le cancer du sein [9], les médicaments ciblant HER2 ont apporté un réel bénéfice dans le traitement des patientes [8, 10, 11]. Le récepteur HER2 est surexprimé dans environ 15 à 20 % des cancers du sein [12]. L'étude de ces récepteurs et des voies de signalisation en aval de ces récepteurs a permis le développement de médicaments ciblant spécifiquement ces récepteurs. Ces médicaments sont des anticorps monoclonaux, comme le trastuzumab [8] et le pertuzumab [10] ou des inhibiteurs de tyrosine kinase comme le lapatinib [11, 13]. Plus récemment, des structures plus complexes associant un anticorps monoclonal anti-HER2 et une molécule cytotoxique comme le T-DM1 (trastuzumab-emtansine) [14] ont été proposées. Enfin, les médicaments inhibiteurs de mTOR font également partie des stratégies thérapeutiques disponibles [15]. Le développement de ces thérapies dites ciblées, associée à une chimiothérapie conventionnelle ou à une hormonothérapie a permis d'augmenter significativement la survie globale des patientes atteintes de cancers du sein [8, 10, 11, 14, 15]. Bien que ciblant de manière spécifique les récepteurs HER2 ou des effecteurs des voies de signalisation en aval de ces récepteurs, des résistances aux traitements surviennent [16].

De nombreux articles décrivent le rôle majeur de PI3K dans le développement de résistances aux thérapies ciblées préexistantes. Par ailleurs, il a été rapporté que les dysfonctionnements de cette protéine, liés à des anomalies géniques pourraient constituer des biomarqueurs prédictifs de la réponse ou de la résistance aux thérapies ciblées anti-HER2 et anti-mTOR [5, 17-20].

Structure et fonction oncogène du gène *PIK3CA*, place dans les voies de signalisation cellulaire

La reconnaissance d'une phosphotyrosine d'un récepteur activé par une protéine adaptative, va mettre en œuvre la voie PI3K. Cette voie comporte des activations séquentielles de kinases, aboutissant à des effets multiples sur la transcription des gènes impliqués dans la survie, la différenciation ou la prolifération cellulaire [21, 22]. Cette voie de signalisation fait intervenir PI3K dont le rôle est de phosphoryler le *phosphatidylinositol-2-phosphate* (PIP2) en *phosphatidylinositol-3-phosphate* (PIP3). Cette phosphorylation activatrice est finement régulée par la phosphatase PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) dont le rôle est de déphosphoryler PIP3 en PIP2 (figure 1A). En cas de suractivation de PI3K et/ou de la perte d'expression de PTEN, la cellule entre alors dans un cycle anormal aboutissant à une augmentation de la prolifération et de la croissance.

PI3K est un hétérodimère composé de deux sous-unités : une sous-unité régulatrice (p85, PIK3R1) dotée d'un domaine SH2 permettant la reconnaissance des phosphotyrosines des récepteurs à tyrosine kinase et une sous-unité catalytique (p110 α , PIK3CA) à activité lipide kinase. Des mutations du gène *PIK3R1* ont été rapportées notamment dans les mélanomes métastatiques [23] ou dans les cancers de l'endomètre [24] mais à ce jour, aucune relation n'a été décrite liant le statut mutationnel du gène *PIK3R1* à la réponse aux thérapies ciblées.

La sous-unité catalytique de PI3K est codée par le gène *PIK3CA* [21]. Ce gène de 34 kb est situé sur le chromosome 3q26.3 et est constitué de 20 exons codant 1068 acides aminés et donnant une protéine de 124 kDa (figure 1B). En particulier, la région codant pour le domaine hélicoïdal de p110 α se situe sur l'exon 9 et le domaine kinase sur l'exon 20.

Cette voie est interconnectée à la voie des MAPK via la protéine RAS, par conséquent, PI3K peut être activée par RAS, ce qui en thérapeutique joue un rôle particulièrement important – on peut imaginer par exemple une suractivation de la voie PI3K chez les patients dont les tumeurs portent des mutations activatrices du gène *KRAS*.

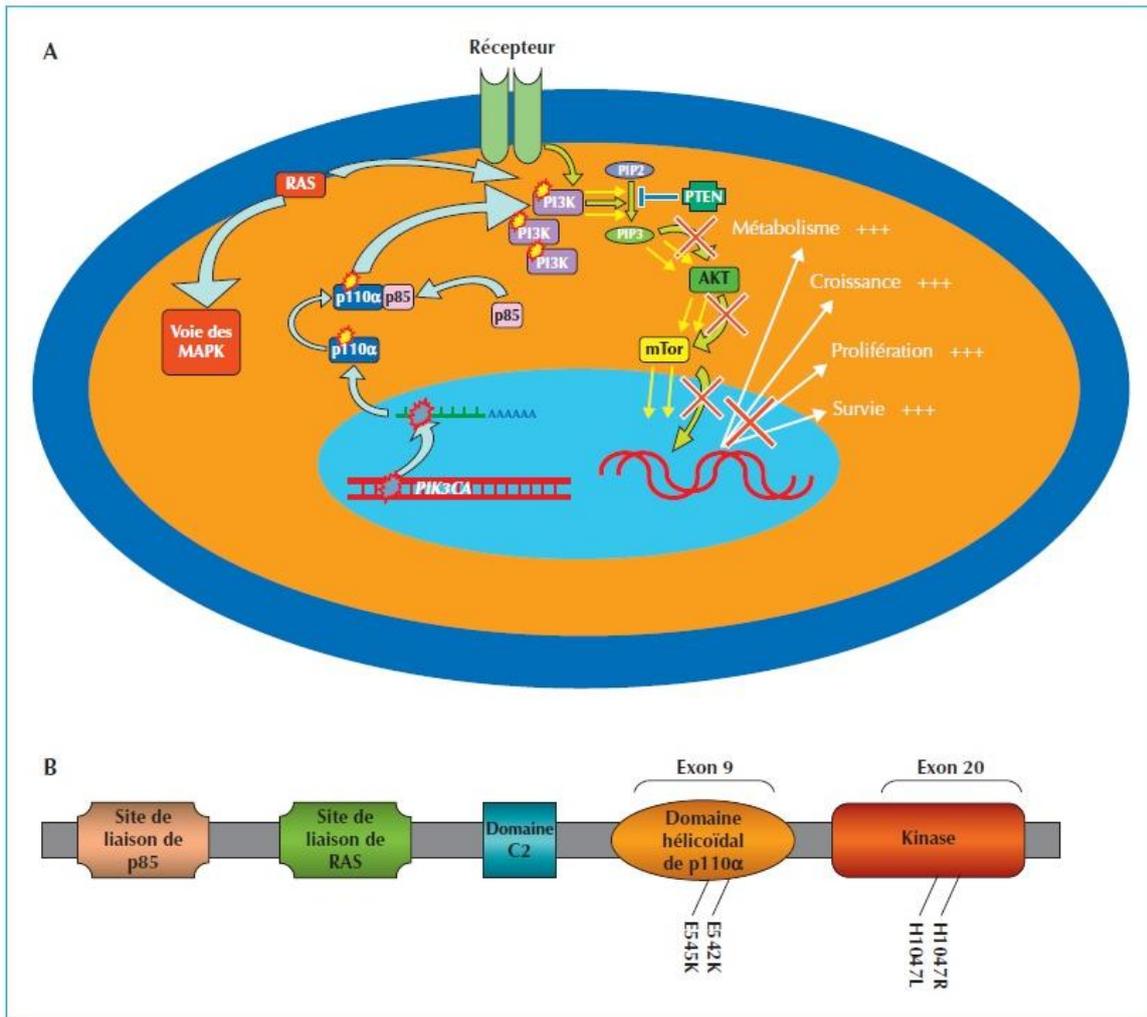


Figure 1. A) Place de PI3K dans la voie de signalisation PI3K/AKT : Une mutation activatrice du gène *PIK3CA* (anomalie représentée par le symbole en étoile rouge et jaune) a pour conséquence une suractivation de PI3K. La régulation naturelle effectuée par PTEN devient alors insuffisante, ce qui provoque un emballement de la voie de signalisation avec des rétrocontrôles insuffisants aussi bien au niveau d'AKT que de mTOR. Ces dérégulations se traduisent par une augmentation du métabolisme, de la croissance, de la prolifération et de la survie cellulaire. La voie PI3K est interconnectée à la voie des MAPK par la protéine RAS. **B)** Structure du gène *PIK3CA*. Le domaine hélicoïdal de p110α est codé au niveau de l'exon 9 du gène et le domaine kinase au niveau de l'exon 20. Les mutations hotspots les plus fréquemment rencontrées sont E542K et E545K pour l'exon 9 et H1047R et H1047L pour l'exon 20.

PI3K peut également être activée par des récepteurs couplés à des protéines G comme ceux de la famille de la rhodopsine, de la famille des récepteurs de la sécrétine, du glutamate ou encore la famille des récepteurs *Frizzled* [25].

Il existe quatre formes de PI3K dits de Classe I : PIK3CA, PIK3CB, PIK3CC et PIK3CD. Chaque forme possède une spécificité tissulaire et fonctionnelle précise. La sous-unité catalytique de chacune de ces formes se nomme respectivement p110α, p110β, p110γ et p110δ [21].

Il existe de nombreuses altérations mutationnelles et non mutationnelles responsables de l'activation de la voie PI3K/AKT. PIK3CA est une oncoprotéine majeure. Elle joue un rôle important dans la diffusion des métastases [26]. Sa mutation est rencontrée dans 25 à 30 % des cancers du sein [6, 27] et dans 8 à 15 % des cancers colorectaux. En particulier, quatre mutations activatrices, dites « hotspots », sont fréquemment rencontrées (figure 2) au niveau de trois acides aminés : E542K (l'acide glutamique en 542 est remplacé par la lysine), E545K (l'acide glutamique en 545 est remplacé

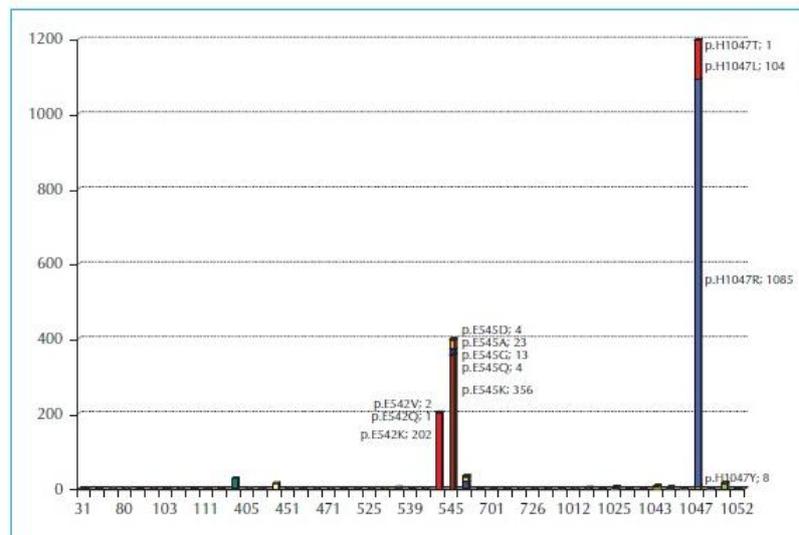


Figure 2. Répartition des différentes mutations de PIK3CA dans les cancers du sein (SANGER COSMIC). La fréquence de chaque type de mutation est représentée par une barre de l'histogramme. Les mutations les plus fréquemment décrites sont sur l'exon 9 (E542K, E545K) et sur l'exon 20 (H1047 R et H1047L).

par la lysine) et H1047L (l'histidine en 1047 est remplacée par la leucine) et H1047R (l'histidine en 1047 est remplacée par l'arginine).

Mutations du gène *PIK3CA* et cancers : type de prévalence

La dérégulation de la voie PI3K/AKT est un événement fréquent dans plusieurs types de cancers [3]. Cette dérégulation peut être due à une inactivation de la phosphatase PTEN liée à la perte de son expression ou à la présence de mutations activatrices de la sous-unité catalytique p110 α de PI3K [27].

Les mutations du gène *PIK3CA* augmentent l'activité kinase de PI3K contribuant ainsi au processus de tumorigénération. Dans 90 % des cas, les mutations du gène *PIK3CA* sont localisées sur l'exon 9 (E542K, E545K) codant la région hélicoïdale de la sous-unité catalytique ou sur l'exon 20 (H1047R et H1047L) codant le domaine kinase de la sous-unité catalytique (*figures 1B et 2*).

Méthodes de détection des mutations du gène *PIK3CA*

De nombreuses techniques de biologie moléculaire permettent aujourd'hui d'étudier les mutations du gène *PIK3CA* sur les exons 9 et 20.

Tout d'abord, des approches classiques par séquençage direct sont envisageables. Pour pallier le manque de sensibilité du séquençage direct selon San-

ger, de l'ordre de 20 % [28], des techniques de pyroséquençage sont également disponibles [29]. Les approches par PCR en temps réel apparaissent cependant plus simples à mettre en œuvre et moins onéreuses dans le cadre d'examens de routine. Nous pouvons citer par exemple les méthodes de PCR HRM qui consistent à étudier le profil des courbes de fusion de fragments d'ADN tumoraux amplifiés [30]. Les profils obtenus à partir d'extrait d'ADN tumoral sont ensuite comparés à de l'ADN témoin muté et non muté (*figure 3*). Nous avons récemment rapporté que cette approche permettait la détection d'ADN tumoral avec une sensibilité de 5 % pour les mutations de l'exon 9 et 10 % pour les mutations de l'exon 20 [31]. Un autre exemple d'approche par PCR en temps réel est la PCR ARMS Scorpions (*Allele restrictive mutation system*) ou PCR restrictive d'allèle [32]. Cette technique permet grâce à un mode de fonctionnement original d'obtenir une sensibilité de détection élevée, de l'ordre de 1 % [32]. Comme son nom l'indique, cette technique est spécifique d'une mutation. Ainsi, en utilisant des amorces spécifiques des quatre principales mutations du gène *PIK3CA* (E542K, E545K, H1047L et H1047R), il est alors possible de détecter environ 95 % des mutations rencontrées dans le cancer du sein.

Plus récemment, des techniques utilisant l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) ont été utilisées pour la détection des mutations du gène *PIK3CA* [33] et des techniques d'immunohistochimie permettent d'évaluer l'expression des sous-unités p85 α et p110 γ [34].

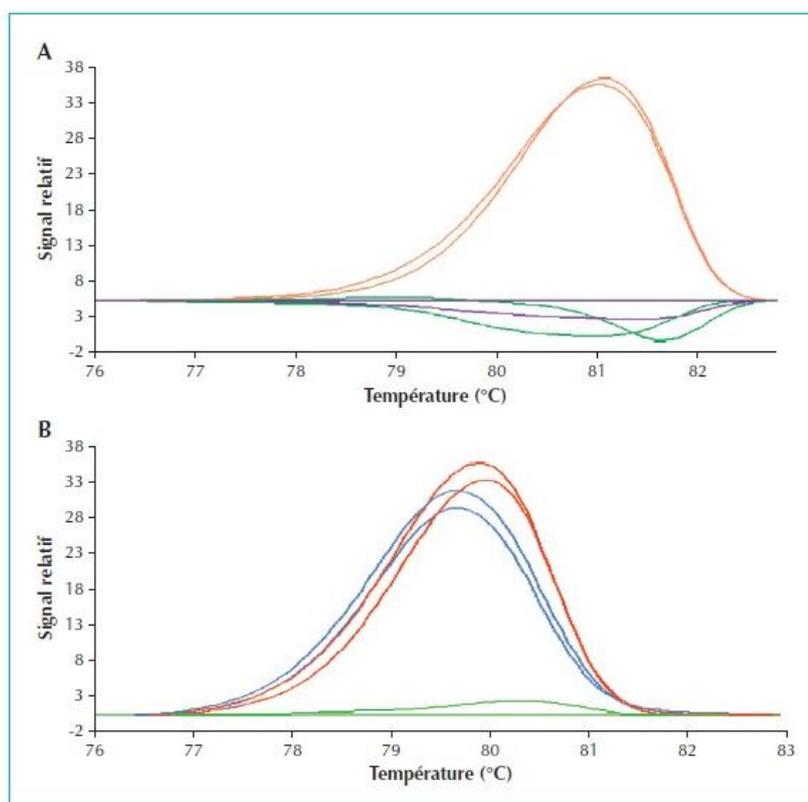


Figure 3. Profils HRM d'un échantillon ne portant pas de mutation de *PIK3CA* (A) et d'un échantillon portant une mutation de *PIK3CA* (B). La courbe en rouge est celle du témoin muté. La courbe verte (4.A) est celle d'un échantillon ne portant pas de mutation de *PIK3CA*. La courbe bleue (4.B) est celle d'un échantillon portant une mutation de *PIK3CA*. Les courbes horizontales sont celles des témoins négatifs d'amplification permettant d'assurer l'absence de contamination dans le milieu réactionnel.

Intérêt clinique, valeur pronostique et valeur prédictive des mutations du gène *PIK3CA* dans les cancers du sein

Les tumeurs du sein présentent une grande hétérogénéité moléculaire et cellulaire. Ainsi, il est possible de distinguer plusieurs grandes classes de cancers du sein, de l'expression de récepteurs hormonaux et des récepteurs HER2 [35]. La classification de Sorlié [36] permet, en fonction des statuts des récepteurs HER2, des récepteurs hormonaux et de l'index Ki67, de classer les cancers du sein en *basal-like*, *HER2+*, *normal breast-like* ou *luminal* de sous-type A, B ou C. Enfin, le grade SBR permet de classer les tumeurs du sein en différentes catégories histopronostiques. Nous avons précisé récemment que la présence d'une mutation du gène *PIK3CA*, aussi bien sur l'exon 9 que sur l'exon 20, était en relation avec le grade SBR [31]. Ainsi, les tumeurs de mauvais pronostic (grade SBR III) présentent

plus souvent des mutations du gène *PIK3CA* que les tumeurs de grade SBR I ou II, de meilleur pronostic. (tableau 1). À ce jour, seules quelques études établissent ce lien entre classification SBR et présence de mutation du gène *PIK3CA* [31, 33]. Aucune étude prospective n'a été publiée et aucun lien direct n'a été établi. Malgré de nombreuses études publiées, aucune ne permet pas d'établir un lien entre la classification moléculaire tumorale et la présence de mutation *PIK3CA* [37-39]. Plus récemment, une étude a mis en évidence un lien entre classification moléculaire des cancers du sein et la survie [40]. D'autres études récentes ont mis en évidence un lien entre la présence de mutation du gène *PIK3CA* et la réponse à certaines molécules de thérapies ciblées. C'est le cas notamment dans les traitements par trastuzumab, anti-œstrogènes et lapatinib [17, 20, 38, 41-43]. Une relation entre présence de mutation du gène *PIK3CA* et/ou l'activation de la voie PI3K/AKT associée constitue un facteur de résistance aux traitements ciblant mTOR [44-47]. Ainsi, il apparaît que la présence de mutations *PIK3CA* pourrait

être un marqueur prédictif de résistance aux thérapeutiques ciblées actuellement utilisées dans le traitement du cancer du sein. L'impact d'autres mutations du gène *PIK3CA* plus rarement rapportées dans la base COSMIC, notamment sur les exons 1, 4 et 7 reste à étudier. Dans cette perspective, le séquençage de nouvelle génération prend ainsi tout son intérêt et devrait permettre d'identifier un grand nombre d'anomalies.

À ce jour, plus d'une trentaine d'études cliniques sont en cours pour déterminer si les molécules ciblant directement PI3K ont un intérêt dans le traitement des tumeurs solides. Plus particulièrement des molécules ciblant les effecteurs de la voie PI3K/AKT sont également en cours d'essai clinique. Ainsi, on trouve des inhibiteurs sélectifs de PI3K, des inhibiteurs mixtes PI3K/mTOR, mais également des inhibiteurs d'AKT, de HSP 90, de MEK,

Tableau 1. Analyse du statut mutationnel *PIK3CA* dans les cancers du sein par technique PCR-ARMS. Relation avec le grade SBR.

	Total	Grade SBR ^b			p ^a
		I	II	III	
Total (%)	149 (100)	14 (11,9)	67 (47,5)	64 (40,7)	
<i>PIK3CA</i> non muté	122 (81,9)	7 (57,1)	55 (69,6)	56 (85,4)	0,004
<i>PIK3CA</i> muté	27 (18,1)	7 (42,9)	12 (30,4)	8 (14,6)	

^aKhi² ou test de Fisher.

^bClassification de Scarff-Bloom-Richardson.

Tableau 2. Molécules visant la voie PI3K/AKT en essai thérapeutique dans le cancer du sein, et faisant intervenir directement ou indirectement le statut mutationnel du gène *PIK3CA* (d'après www.clinicaltrials.gov, consulté le 18 mars 2013).

Nom de code	Famille	Essai clinique	Phase	Étude du statut <i>PIK3CA</i>
BYL719	Inhibiteur de PI3K	NCT01219699	Phase I/II	Inclusion uniquement si présence d'une mutation
BKM120	Inhibiteur de PI3K	NCT01589861	Phase I/II	L'étude du gène <i>PIK3CA</i> est effectuée après l'inclusion pour déterminer l'impact de la présence de mutation sur la réponse au traitement
		NCT01437566	Phase I	En association au fluvestrant. L'étude du gène <i>PIK3CA</i> est effectuée après inclusion pour déterminer l'impact de la présence de mutation sur la réponse au traitement
GDC-0941	Inhibiteur de PI3K	NCT01437566	Phase II	En association au fluvestrant. L'étude du gène <i>PIK3CA</i> est effectuée après inclusion pour déterminer l'impact de la présence de mutation sur la réponse au traitement
GDC-0980	Inhibiteur mixte PI3K/mTOR			
BEZ235	Inhibiteur mixte PI3K/mTOR	NCT01513356	Phase 0	En association au BKM120. L'étude du gène de <i>PIK3CA</i> est effectuée après inclusion pour déterminer l'impact de la présence de mutation sur la réponse au traitement
AZD5363	Inhibiteur d'AKT	NCT01226316	Phase I	Inclusion uniquement si présence d'une mutation
		NCT01625286	Phase I	Test de tolérance en association au paclitaxel. L'étude du gène <i>PIK3CA</i> est effectuée après l'inclusion pour déterminer l'impact de la présence de mutation sur la réponse au traitement
MK-2206	Inhibiteur d'AKT	NCT01277757	Phase II	Inclusion uniquement si présence d'une mutation du gène <i>PIK3CA</i> ou une perte de l'expression de PTEN
		NCT01776008	Phase II	En association à l'anastrozole ou à l'acétate de goserelin chez les patients présentant une mutation du gène <i>PIK3CA</i>
PD0332991	Inhibiteur de <i>Cycline D Kinase 4/6</i>	NCT01723774	Phase II	L'étude du gène <i>PIK3CA</i> est effectuée après l'inclusion pour déterminer l'impact de la présence de mutation sur la réponse au traitement

de la protéine kinase C (PKC) ou de *Cyclin Dependent Kinase 4/6* (CDK 4/6). Pour tous ces essais cliniques, le statut de *PIK3CA* est étudié ou constitue un critère d'inclusion ou d'exclusion (tableau 2). Plus récemment, il a été démontré que les molécules ciblant spécifiquement PI3K, donc directement en aval du récepteur HER, ont une activité clinique significativement plus élevée chez les patientes dont les tumeurs présentent une mutation activatrice du gène *PIK3CA*, aussi bien sur l'exon 9 que sur l'exon 20 [48].

Conclusion

Le statut mutationnel du gène *PIK3CA* pourrait devenir assez rapidement un biomarqueur intéressant dans les cancers du sein. Ce biomarqueur semble avoir un intérêt dans la prédiction de réponse aux thérapies ciblées actuellement disponibles comme les anti-HER2 ou les anti-mTOR, mais également sur la réponse aux futures thérapies ciblées (anti-PI3K, anti-AKT...). L'étude systématique du génotype tumoral *PIK3CA* pourrait à court ou moyen terme venir compléter les marqueurs moléculaires utilisés en routine diagnostique dans les cancers du sein, comme les récepteurs hormonaux ou le statut HER2. ▼

Liens d'intérêt : les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Références

- INCa. La situation du cancer en France en 2011. In: *Observation des cancers*. Paris, France: INCa, 2011 (p. 40-41).
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
- Tokunaga E, Oki E, Egashira A, et al. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8: 27-36.
- Dunlap J, Le C, Shukla A. Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 120: 409-18.
- Aleskandarany MA, Rakha EA, Ahmed MA, et al. *PIK3CA* expression in invasive breast cancer: a biomarker of poor prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 122: 45-53.
- Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the *PIK3CA* oncogene in human cancers. *Br J Cancer* 2006; 94: 455-9.
- Perez-Tenorio G, Alkhorji L, Olsson B, et al. *PIK3CA* mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3577-84.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-92.
- Cavalli F, Alberto P, Jungi F, Brunner K, Martz G. Hormono-chemotherapy versus hormonotherapy followed by chemotherapy in the treatment of disseminated breast cancer. *Eur J Cancer* 1980; (Suppl 1): 125-9.
- Baselga J, Cortes J, Kim SB, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 109-19.
- Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 2733-43.
- Baselga J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 2010; 21: vii36-40.
- Di Leo A, Gomez HL, Aziz Z, et al. Phase III, double-blind, randomized study comparing lapatinib plus paclitaxel with placebo plus paclitaxel as first-line treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5544-52.
- Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 367: 1783-91.
- Baselga J, Campone M, Piccart M, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 520-9.
- Wong AL, Lee SC. Mechanisms of resistance to trastuzumab and novel therapeutic strategies in HER2-positive breast cancer. *Int J Breast Cancer* 2012; 2012: 9.
- Razis E, Bobos M, Kotoula V, et al. Evaluation of the association of *PIK3CA* mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast* 2011; 128: 447-56.
- Dumont AG, Dumont SN, Trent JC. The favorable impact of *PIK3CA* mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. *Chin J Cancer* 2012; 31: 327-34.
- Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 38: 17-23.
- Esteva FJ, Guo H, Zhang S, et al. PTEN, *PIK3CA*, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol* 2010; 177: 1647-56.
- Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 2009; 102: 19-65.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 606-19.
- Shull AY, Latham-Schwark A, Ramasamy P, et al. Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One* 2012; 7: 17.
- Cheung LW, Hennessy BT, Li J, et al. High frequency of *PIK3R1* and *PIK3R2* mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov* 2011; 1: 170-85.
- Robert J. *Signalisation cellulaire et cancer*. Paris, France: Springer-Verlag, 2010.
- Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 2005; 94: 29-86.
- Miron A, Varadi M, Carrasco D, et al. *PIK3CA* mutations in in situ and invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 2010; 70: 5674-8.
- Moskalev EA, Stohr R, Rieker R, et al. Increased detection rates of EGFR and KRAS mutations in NSCLC specimens with low tumour cell content by 454 deep sequencing. *Virchows Arch* 2013; 462: 409-19.
- Baker CL, Vaughn CP, Samowitz WS. A *PIK3CA* pyrosequencing-based assay that excludes pseudogene interference. *J Mol Diagn* 2012; 14: 56-60.
- Vorkas PA, Poupouridou N, Agelaki S, Kroupis C, Georgoulas V, Lianidou ES. *PIK3CA* hotspot mutation scanning by a novel and highly sensitive high-resolution small amplicon melting analysis method. *J Mol Diagn* 2010; 12: 697-704.
- Harle A, Lion M, Lozano N, et al. Analysis of *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: Correlation with clinicopathological criteria. *Oncol Rep* 2013; 29: 1043-52.
- Board RE, Thelwell NJ, Ravetto PF, et al. Multiplexed assays for detection of mutations in *PIK3CA*. *Clin Chem* 2008; 54: 757-60.
- Spoerke JM, O'Brien C, Huw L, et al. Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 6771-83.
- Trigka EA, Levidou G, Saetta AA, et al. A detailed immunohistochemical analysis of the PI3K/AKT/mTOR pathway in lung cancer: Correlation with *PIK3CA*, AKT1, K-RAS or PTEN mutational status and clinicopathological features. *Oncol* 2013; 30: 623-36.

35. Guiu S, Michiels S, Andre F, et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol* 2012; 23: 2997-3006.
36. Sorlie T. Molecular classification of breast tumors: toward improved diagnostics and treatments. *Methods Mol Biol* 2007; 360: 91-114.
37. Lerma E, Catusus L, Gallardo A, et al. Exon 20 PIK3CA mutations decreases survival in aggressive (HER-2 positive) breast carcinomas. *Virchows Arch* 2008; 453: 133-9.
38. Cizkova M, Susini A, Vacher S, et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res* 2012; 14: R28.
39. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 411: 355-65.
40. Haque R, Ahmed SA, Inzhakova G, et al. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21: 1848-55.
41. Bouchalova K, Cizkova M, Cwiertka K, Trojanec R, Friedecky D, Hajdich M. Lapatinib in breast cancer - the predictive significance of HER1 (EGFR), HER2, PTEN and PIK3CA genes and lapatinib plasma level assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2010; 154: 281-8.
42. Ellis MJ, Lin L, Crowder R, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119: 379-90.
43. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-Kinase and Antiestrogen Resistance in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2011; 2011: 17.
44. Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Cassingena A, et al. Therapeutic implications of resistance to molecular therapies in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2010; 36: S1-5.
45. Loi S, Michiels S, Baselga J, et al. PIK3CA genotype and a PIK3CA mutation-related gene signature and response to everolimus and letrozole in estrogen receptor positive breast cancer. *PLoS One* 2011; 8: 2.
46. Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H, et al. PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 1777-89.
47. Weigelt B, Warne PH, Downward J. PIK3CA mutation, but not PTEN loss of function, determines the sensitivity of breast cancer cells to mTOR inhibitory drugs. *Oncogene* 2011; 30: 3222-33.
48. Wallin JJ, Edgar KA, Guan J, et al. GDC-0980 is a novel class I PI3K/mTOR kinase inhibitor with robust activity in cancer models driven by the PI3K pathway. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 2426-36.

Chapitre III

**Exploration de la fonctionnalité des voies de signalisation
PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase par
immunoanalyse multiplexe (Bioplex Protein Array)**

III. Exploration de la fonctionnalité des voies de signalisation

PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPK par immunoanalyse multiplexe (Bioplex Protein Array)

Les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase sont kinases dépendantes. Leur activation se fait via une cascade de phosphorylation entraînant le passage des kinases sous forme active permettant ainsi la transduction du signal en aval. Une augmentation de la phosphorylation de certains des effecteurs qui les constituent a précédemment été retrouvée dans les cancers du sein, ce qui pourrait en faire des cibles potentielles pour de nouvelles thérapeutiques (66).

Il est donc intéressant d'étudier le niveau d'expression des phosphoprotéines, de déterminer leur signification clinique mais aussi leur impact sur la réponse aux traitements.

Le premier article de ce chapitre intitulé " Expression and activation of P38MAPKinase in invasive ductal breast cancers: correlations with expression of the estrogen receptor, HER2 and downstream signaling phosphorylated proteins" est une étude rétrospective du niveau d'expression des phosphoprotéines des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase réalisée sur des échantillons congelés de tumeurs canalaire invasives.

La deuxième partie de ce chapitre décrit l'analyse du niveau d'expression des phosphoprotéines des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase afin d'identifier des biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement par trastuzumab associé à l'évérolimus. Il s'agit d'une étude biologique intégrée dans une étude clinique de phase II, nationale, multicentrique, randomisée en double aveugle, comparant le trastuzumab en monothérapie au trastuzumab associé à l'évérolimus, délivrés en pré-opératoire chez des patientes présentant un cancer du sein non métastatique surexprimant HER2 et accessible d'emblée à une chirurgie. Cette étude, intitulée "RADHER" a été conduite sous la promotion du Groupe Essai Précoce d'Unicancer. La partie biologique a fait l'objet d'un financement dans le cadre d'un PHRC. Les résultats de cette étude ont été présentés

sous forme de communications en congrès et feront prochainement l'objet d'une publication.

Pour finir, la troisième partie de ce travail qui correspond à l'article intitulé " Trastuzumab as pre-operative monotherapy does not inhibit HER2 downstream signaling in HER2+ breast cancer" compare l'impact du trastuzumab sur le niveau d'expression des phosphoprotéines *in vitro* sur des cellules d'adénocarcinomes mammaires humains et en situation clinique chez les patientes de l'étude RADHER traitées par trastuzumab seul. Cet article a été accepté en Octobre 2015 pour publication dans *Oncology Letters*.

III.1. Expression et activation de la P38MAPKinase dans les tumeurs mammaires canalaire invasives: corrélation entre le statut des récepteurs hormonaux, le statut HER2 et les phosphoprotéines des voies de signalisation en aval.

La P38MAPKinase est impliquée dans la tumorigenèse mammaire mais le rôle exact qu'elle joue reste encore controversé. Une augmentation de son expression a été retrouvée dans les cancers mammaires (117) et serait liée au pouvoir invasif des tumeurs et responsable de la résistance à certains traitements tels qu'à l'hormonothérapie ou encore au trastuzumab (119, 184). L'étude et la compréhension du fonctionnement de cette MAPKinase pourraient conduire au développement de nouvelles thérapeutiques telles que les inhibiteurs de P38 et permettraient de contourner certaines résistances.

Il en est de même pour AKT qui joue un rôle central au niveau des voies de signalisation et dont la forme phosphorylée a déjà été retrouvée surexprimée dans divers cancers dont les cancers mammaires (64-66).

Il semble donc à ce titre intéressant d'étudier le niveau d'expression des différentes phosphoprotéines qui constituent les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase telles que P38MAPK, p-P38MAPK, p-AKT, p-GSK3 β , p-S6kinase, p-MEK1 et p-ERK1/2 et d'étudier les corrélations pouvant exister entre le niveau d'expression de ces phosphoprotéines et le statut hormonal et HER2.

L'étude du niveau d'expression des phosphoprotéines a été réalisée par la technique BPA sur des échantillons de tumeurs mammaires canalaire invasives congelées provenant de la tumorotheque de l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il s'agissait de tumeurs de patientes diagnostiquées et traitées en 2006.

Introduction

Les phosphoprotéines MAPKinases ont une implication majeure dans l'oncogénèse mammaire et ont été largement étudiées comme cibles potentielles de nouvelles thérapeutiques. Cette étude consiste en l'analyse du niveau d'expression de la P38MAPKinase, de sa forme phosphorylée (p-P38MAPK) ainsi que des autres phosphoprotéines constituant les voies PI3K et MAPKinases, dans des échantillons de carcinomes mammaires invasifs et en la détermination de corrélations entre le statut des récepteurs aux œstrogènes, le statut HER2+ et le niveau d'expression de ces phosphoprotéines.

Matériels et Méthodes

Les niveaux d'expression de P38MAPK, p-P38MAPK ainsi que de p-AKT, p-GSK3 β , p-S6Kinase, p-MEK1 et p-ERK1/2 ont été quantitativement déterminés en utilisant la technique BPA sur 45 échantillons de carcinomes canauxaires invasifs congelés.

Résultats

Vingt et un échantillons étaient RE+, 15 HER2+ et 10 triple-négatifs. P38MAPK a été retrouvée exprimée dans tous les échantillons de tumeurs, et était significativement surexprimée ($P=0.002$) dans les tumeurs RE+. L'expression de P38MAPK était moins forte dans les tumeurs triple-négatives que dans les autres types de tumeurs. L'expression médiane de p-P38MAPK était également supérieure dans les tumeurs RE+ et à l'inverse inférieure dans les tumeurs triple négatives. Le statut HER2 n'a quant à lui aucun effet sur le niveau d'expression de P38MAPK et de sa forme phosphorylée. Aucune variation du taux de phosphorylation de P38MAPKinase en relation avec les statuts RE, HER2 et triple négatif n'a été observée.

Un niveau d'expression supérieur de p-AKT ($P=0.0048$) a quant à lui été observé dans les tumeurs HER2+. En revanche, aucune différence statistiquement significative n'a été observée concernant le niveau d'expression de p-MEK1, p-GSK3 β et p-S6K dans les différents sous-types.

Conclusion

La détermination du niveau d'expression de multiples phosphoprotéines peut être utilisée pour la personnalisation des thérapeutiques. Dans les tumeurs canalaire mammaires invasives, la surexpression de P38MAPK pourrait être utilisée comme un biomarqueur pour l'évaluation des inhibiteurs de P38.

Expression and activation of P38 MAP kinase in invasive ductal breast cancers: Correlation with expression of the estrogen receptor, HER2 and downstream signaling phosphorylated proteins

JEAN-LOUIS MERLIN^{1,2,3}, ALEXANDRE HARLÉ^{1,2,3}, MAËVA LION^{1,2,3},
CAROLE RAMACCI¹ and AGNÈS LEROUX^{1,3}

¹Department of Biopathology, Institut de Cancérologie de Lorraine, 54519 Vandoeuvre les Nancy;

²Université de Lorraine, Faculty of Pharmacy, 54001 Nancy;

³CNRS UMR 7039 CRAN, 54506 Vandoeuvre les Nancy, France

Received May 29, 2013; Accepted June 28, 2013

DOI: 10.3892/or.2013.2645

Abstract. MAP kinase signaling proteins have major implications in the molecular oncogenesis of breast cancers and have been extensively investigated as putative targets for therapy. This study reports the investigation of the expression of P38 MAPK and its phosphorylated form (p-P38 MAPK) in clinical specimens of invasive breast carcinomas and their correlation with estrogen receptor (ER) and HER2 expression, as well as MAPK and PI3 kinase-AKT pathway signaling phosphorylated proteins. Expression levels of P38 MAPK and p-P38 MAPK as well as p-AKT, p-GSK3 β , p-S6 kinase, p-MEK1 and p-ERK1/2 were quantitatively assessed using multiplex bead immunoassay in frozen specimens from 45 invasive ductal breast cancers. Twenty-nine specimens were ER⁺, 15 were HER2⁺ and 10 were triple-negative breast cancers (TNBCs). P38 MAPK was found to be expressed in all tumor specimens and was significantly ($P=0.002$) overexpressed in ER⁺ tumors. P38 MAPK expression was lower in TNBCs than in all of the other tumors. The median expression of p-P38 MAPK was also higher in ER⁺ tumors while lower in the TNBCs. HER2 status had no effect on P38 MAPK and p-P38 MAPK expression. No variation in the phosphorylation rate of P38 MAPK was observed in relation with ER, HER2 or TNBC status. Significantly higher ($P=0.0048$) expression of p-AKT was observed in HER2⁺ tumors. No significant difference in p-MEK1, p-GSK3 β and p-S6K expression was found in any other comparisons based on ER and HER2 expression

subtypes. Investigation of the expression of multiple phosphorylated signaling proteins can be used for personalized targeted therapy. In invasive breast cancer, the overexpression of P38 MAPK may serve as a biomarker for the evaluation of P38 MAPK inhibitors.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women with more than one million new cases. Breast cancer is one of the leading causes of cancer-related mortality in women (1). Apart from surgery, adjuvant radiation therapy and chemotherapy, treatment of breast cancer is based on the identification of molecular targets, mainly estrogen receptor (ER) expression, HER2 overexpression and amplification. In ER-expressing tumors, endocrine therapy consisting of mainly tamoxifen and anti-aromatase drugs is prescribed. In human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive (HER2⁺) tumors, anti-HER2-targeted therapies such as the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab and the tyrosine kinase inhibitor lapatinib have been proposed. Moreover, in HER2⁺ tumors also expressing ER, the combination of both endocrine and anti-HER2 therapies have been proven to improve the outcome of patients through the blockade of signaling crosstalk leading to resistance to ER-targeted therapy. In triple-negative breast cancers (TNBCs) i.e. ER⁻, PR⁻ and HER2⁻ tumors, no targeted therapy has been proven effective to date, and the molecular characteristics of TNBCs have been extensively studied in order to identify putative molecular targets for drug development. Since several different growth factor pathways can stimulate breast cell growth, targeting a unique pathway may have limited effect on the inhibition of breast cancer proliferation, and the inhibition of signal transduction at a deeper point in the cascade has been envisaged.

In this context, mammalian target of rapamycin (mTOR) has been identified as the point of convergence of many mitogenic signals, which has led to the recent registration of the mTOR inhibitor everolimus in association with anti-

Correspondence to: Professor Jean-Louis Merlin, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 Avenue de Bourgogne, CS30519, 54519 Vandoeuvre les Nancy, France
E-mail: jl.merlin@nancy.unicancer.fr

Key words: breast cancer, signaling, MAPK, estrogen receptor, HER2

aromatase therapy for ER⁺ breast cancers (2). Another point of convergence of intracellular downstream growth factor receptor signaling is the P38 mitogen-activated protein kinase family (P38 MAPK). P38 MAPK is a member of the MAPK family which includes the extracellular signal-regulated kinase (ERK), the c-Jun N-terminal kinase (JNK), and P38 MAPK (3). P38 MAPK is comprised of four isoforms (α , β , γ and δ) that can be activated by various growth factors, inflammatory cytokines, and chemical or physical stress. The α isoform is the most abundant and is subject to a larger inter-individual variability than the other three isoforms (12). P38 MAPK plays a complex role in the regulation of cell growth, differentiation, apoptosis, and responses to inflammation or stress (4,5). P38 MAPK activity was found to be upregulated in breast, head and neck carcinomas, lymphomas, gliomas and squamous cell carcinomas (6).

In breast cancer, a high level of expression of P38 MAPK has been found to correlate with poor prognosis and to be involved in invasiveness and metastasis in relation with the urokinase plasminogen activator system (7). Activation of P38 MAPK has been observed in Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade 2 or 3 ductal tumors (8). Expression of phosphorylated-P38 MAPK (p-P38MAPK) has been reported in ~20% of primary breast carcinomas (9). P38 MAPK overexpression has been correlated with HER2 amplification and tamoxifen resistance (10) and has been proposed as a potential prognostic marker in breast cancer (11). Specifically, phosphorylation of P38 MAPK was found to be a negative prognostic indicator in HER2-negative, lymph node-positive breast cancers (9).

The role of P38 MAPK in the regulation of breast cancer cell proliferation remains to be elucidated and has been suggested to have dual activities that include regulation of survival and proliferation depending on the expression of mutant TP53 (12) as observed in most ER⁺ breast tumors therefore justifying the development of P38 MAPK inhibitors for the treatment of TP53-mutated, ER⁺ breast cancers or TNBCs. Furthermore, the activation of P38 MAPK has recently been reported to regulate signaling by EGFR/c-Src crosstalk in breast cancer (13).

In addition, P38 MAPK has been recently reported to play a role in the resistance of ER⁺ breast tumors to endocrine therapy (14). Although the cellular mechanisms underlying the development of tamoxifen resistance in breast cancer cells are not totally understood, recent research has found that alteration of the signaling pathways (15-17) can decrease the cell sensitivity to tamoxifen. More precisely, the development of crosstalk between ER and growth factor-mediated activation of the MAPK cascade, through the activation of HER2 has been reported to increase both genomic and non-genomic ER actions in breast cancer leading to tamoxifen resistance. This justifies the combination of endocrine therapy together with aromatase inhibitors and anti-HER2 therapies with trastuzumab-based or lapatinib-based therapies for breast cancer (18). Recent studies have noted a positive correlation between activated P38 MAPK levels and tamoxifen resistance (19). P38 MAPK has been reported to potentiate ER agonist activity through increased phosphorylation of ER and enhanced ER signaling through coactivator regulation (20). P38 MAPK has been shown to play a role in breast cancer progression and inva-

sion (21) in association with other signaling proteins such as integrins and urokinase plasminogen activator (22) as well as H-RAS (23).

P38 MAPK isoform γ has been recently shown to be selectively activated by exposure to tamoxifen, consequently recruiting nonclassical ER signaling and increased estrogen cell sensitivity (24). Therefore, increased P38 MAPK activation could define a more malignant, resistant and metastatic breast cancer phenotype and justify the evaluation of P38 MAPK inhibitors in the treatment of invasive and tamoxifen-resistant breast carcinomas (14). A number of P38 MAPK inhibitors are currently being investigated in clinical trials (25).

In the present study, we investigated the expression of P38 MAPK and p-P38 MAPK in clinical specimens of invasive breast carcinomas. We first investigated the correlation of their expression with ER and HER2 expression, and subsequently evaluated the correlation with expression levels of MAPK and PI3K signaling phosphorylated proteins such as p-AKT, p-GSK3 β , p-S6 kinase, p-MEK1 and p-ERK1/2 quantitatively determined using multiplex bead immunoassay as previously described and validated in breast cancer (26).

Materials and methods

Patients and tumor characteristics. Frozen tumor samples of breast cancer from 45 patients with infiltrative ductal carcinoma were obtained from the tumor bank of our Institute (agreement with French National Cancer Institute and Ministry of Health). All patients were informed of the tumor banking procedure and no opposition was expressed. The median age at diagnosis was 56.3 years (range, 28-91).

Breast cancer tissues macroscopically selected by the pathologists were obtained immediately after surgery and were shock frozen in liquid nitrogen then cryopreserved at -80°C. The mean tumor (SD) specimen weight was 15.2 (4.2) mg. None of the patients received any preoperative adjuvant endocrine therapy or chemotherapy. Thirty-four tumors were SBR grade 3 (Scarff-Bloom-Richardson) and 11 tumors were grade 2.

Immunohistochemistry (BenchMark Ventana) was used to detect estrogen and progesterone receptor expression and HER-2 overexpression as part of the routine clinical diagnostics using polyclonal antibody A485 (Dako, Trappes, France) immunostaining of HER2 and monoclonal antibodies 6F11 and Pgr312 (both from Novocastra, Leica Microsystemes, Nanterre, France) for determination of estrogen and progesterone expression, respectively.

Protein extraction. The tumor specimens were first disrupted using steel bead TissueLyser (Qiagen, Courtaboeuf, France) for 15 min, and then exposed to the lysis solution (Cell Lysis kit, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) containing PMSF anti-protease for 10 sec. After centrifugation (4,500 x g for 20 min at 4°C), the protein-containing supernatants were collected and stored frozen at -80°C until analysis. Before being analyzed, the protein concentration was determined in each extract using 690 nm colorimetric DC protein assay kit (Bio-Rad) based on Lowry technique and adjusted to 250 μ g/ml.

Multiplex bead immunoassay. The expression of the signaling phosphoproteins was analyzed using multiplex bead immunoassay as described and validated previously (26). Briefly, protein extracts were transferred into 96-well dishes and diluted with 25 μ l buffered solution. Fluorescence capturing beads coupled to antibodies directed against P38 MAPK, p-P38 MAPK, p-AKT, p-GSK3 β , p-P70S6K, p-MEK1, p-ERK1/2 phosphoproteins were mixed. The beads were added into each well and incubated overnight at 37°C. Biotinylated antibodies and then streptavidin-phycoerythrin solution were then added. The positive control consisting of standard protein extract from cell lines was added to each series. The multi-well plates were then analyzed according to the manufacturer's instructions (Bio-Plex; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Frozen protein extracts from an EGFR-overexpressing human breast cancer cell line exposed to EGF were used as positive controls as reported previously (26). The results were recorded as mean fluorescence intensities expressed as arbitrary units and considered as significant when exceeding a signal/noise ratio of 3.

Statistics. All analyses were performed as triplicate and are presented as mean fluorescence intensities (SD). All statistical analyses were performed using the Wilcoxon test using R software (v.2.15.1.; the R Foundation for Statistical Computing) and the level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Immunohistochemistry. The breast cancer tumor characteristics are summarized in Table I. The ER status as determined by immunohistochemistry was positive in 29 patients (64%) and negative in 16 patients (36%). Progesterone receptor (PR) status was positive in 18 patients (40%) and negative in 27 patients (60%). Fifteen tumors (33%) were HER2⁺ and 30 tumors (67%) were HER2⁻. Ten (22%) tumors were triple-negative breast cancers (TNBCs), i.e. ER, PR and HER2⁻.

P38 MAPK and phosphorylated-P38 MAPK expression. P38 MAPK and p-P38 MAPK were found to be expressed in nearly all tumor specimens (44/45, 98%) and were significantly ($P = 0.0016$) overexpressed in ER⁺ tumors (Fig. 1A). The median expression of p-P38 MAPK was also higher in ER⁺ when compared with that in ER⁻ tumors. HER2 status had no influence on P38 MAPK and p-P38 MAPK expression (Fig. 1B). P38 MAPK expression was lower in TNBCs (Fig. 1C) when compared with the expression level in all other tumor types as was p-P38MAPK expression but without reaching statistical significance. No significant variation in the phosphorylation rate of P38 MAPK, as calculated from the phosphorylated/unphosphorylated P38 MAPK expression ratios, was observed in association with ER, HER2 and TNBC status, or SBR grade.

Phosphorylated-AKT and phosphorylated-ERK1/2 expression. Significant expression of p-AKT and p-ERK1/2 was detected in 33/45 (73%) and 17/45 (38%) of the tumor extracts, respectively. p-AKT expression was found to be significantly higher ($P = 0.0048$) in HER2⁺ tumors (Fig. 2) than in HER2⁻ tumors. No other significant difference was observed regarding either ER and TNBC status or SBR grade. No difference in

Table I. Patient demographics and tumor characteristics.

Characteristics	Patients, n (%)
No. of patients	45 (100.0)
Age (years)	
≤ 50	13 (28.9)
51-69	24 (53.3)
≥ 70	8 (17.8)
Tumor size (mm)	
T1 (10-20)	16 (35.6)
T2 (21-50)	26 (57.8)
T3 (>51)	3 (6.7)
SBR grade	
SBR 2	11 (24.4)
SBR 3	34 (75.6)
Hormone receptor status	
ER ⁺	29 (64.4)
ER ⁻	16 (35.6)
PR ⁺	18 (40.0)
PR ⁻	27 (60.0)
HER2 status	
Positive	15 (33.3)
Negative	30 (66.7)
Triple-negative	10 (22.2)

ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; SBR, Scarff-Bloom-Richardson; HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

p-ERK1/2 expression was observed regarding ER, HER2 and TNBC status. Expression of p-ERK1/2 was found to be significantly higher ($P = 0.0235$) in SBR grade 3 than in SBR grade 2 tumors (Fig. 3).

Expression of other phosphorylated-signaling proteins MEK1, GSK3 β , S6K. Significant expression of p-MEK1, p-GSK3 β and p-S6K was detected in 39/45 (87%), 31/45 (69%) and 37/45 (82%) of the protein extracts, respectively. No significant difference in p-MEK1, p-GSK3 β and p-S6K expression was evidenced regarding either ER and TNBC status or SBR grade (data not shown). No significant correlation was found between the expression levels of any of the phosphorylated proteins.

Discussion

In breast cancer, P38 MAPK expression has previously been correlated with invasiveness and poor prognosis (8-11).

In the present study, we compared the expression of P38 MAPK and p-P38 MAPK in clinical specimens of invasive breast carcinomas in association with ER, HER2 and SBR grade and aimed to ascertain a correlation between P38 MAPK expression or activation of MEK/ERK and the AKT/mTOR signaling pathways.

In our series, expression of P38 MAPK and p-P38 MAPK was observed in nearly all tumor specimens. This was consis-

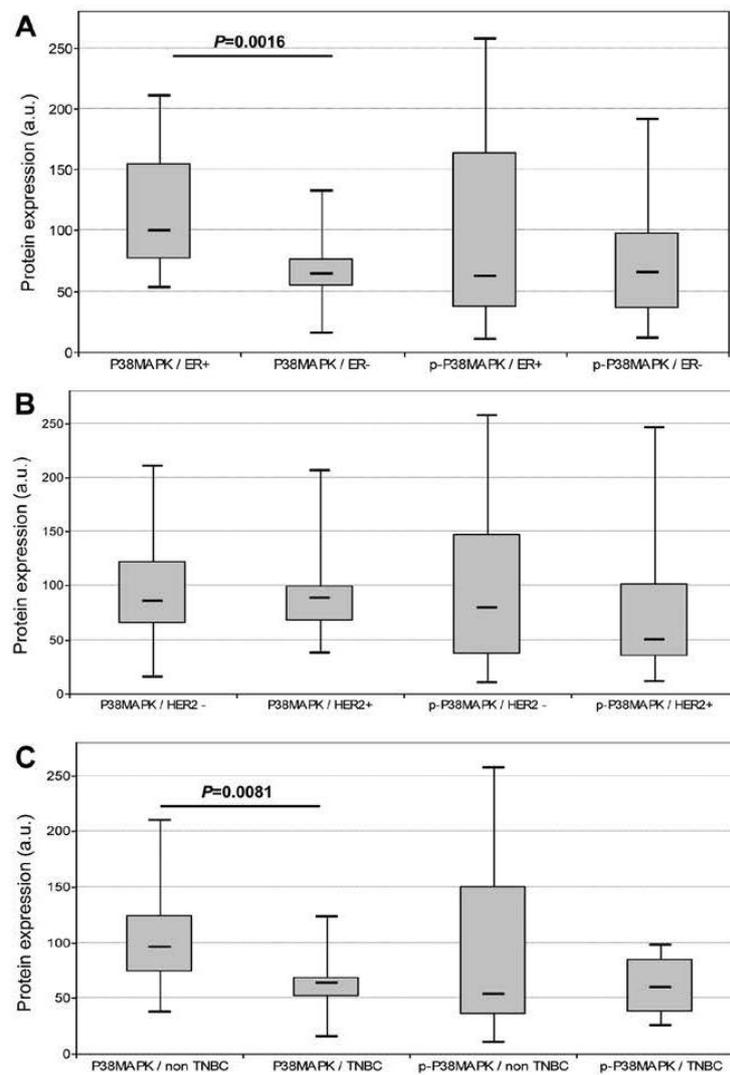


Figure 1. Expression of P38 MAPK and its phosphorylated form (p-P38 MAPK) in clinical specimens of invasive breast cancers. The results are presented as box-and-whisker plots, illustrating the median (central bar), 1st and 3rd quartiles (bottom and top of the grey box), minimum and maximum values (lower and upper bars). Expression in (A) estrogen-positive (ER⁺) and ER-negative (ER⁻) tumors; (B) HER2-positive (HER2⁺) and HER2-negative (HER2⁻) tumors; (C) triple-negative breast cancer (TNBC) and non-TNBC.

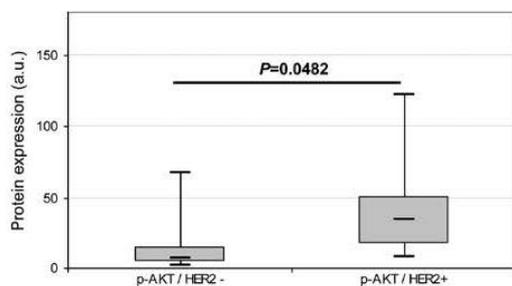


Figure 2. Expression of phosphorylated-AKT (p-AKT) in HER2-positive (HER2⁺) and HER2-negative (HER2⁻) tumors. The results are presented as box-and-whisker plots, illustrating the median (central bar), 1st and 3rd quartiles (bottom and top of the grey box), minimum and maximum values (lower and upper bars).

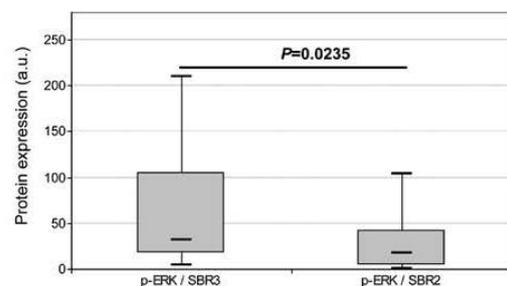


Figure 3. Expression of phosphorylated-ERK1/2 (p-ERK) in SBR grade 2 (SBR2) and grade 3 (SBR3) tumors. The results are presented as box-and-whisker plots, illustrating the median (central bar), 1st and 3rd quartiles (bottom and top of the grey box), minimum and maximum values (lower and upper bars).

tent with previously published data (11) reporting P38 MAPK and p-P38 MAPK expression in 100 and 89% of specimens, respectively, using western blot analysis, and 70% when IHC was used.

We report here that P38 MAPK was expressed at a higher level in ER⁺ when compared with ER⁻ tumors without post-transductional activation since no variation in the phosphorylation rate of P38 MAPK was evidenced. This is consistent with previously published data (10,27) revealing the great interest in P38 MAPK in ER⁺ tumors. P38 MAPK has been reported to be activated by anti-estrogens apart from ER their main target, resulting in a switch in ER signaling from its classical pathway, involving the estrogen response element (ERE) DNA domain, to the AP1-dependent non-classical pathways; therefore, activation of P38 MAPK can ultimately decrease the cellular response to endocrine therapy. Based on this concept, P38 MAPK has been proposed as a biomarker for resistance to endocrine therapy, and quantitative assessment of P38 MAPK expression and the detection of its activation in breast tumors may represent a new approach to predict the resistance of breast cancer to endocrine therapy. Furthermore, inhibition of P38 MAPK in ER⁻ tumors could restore ER expression and therefore reestablish the sensitivity to endocrine therapy (28).

Moreover, evaluation of the molecular pathway may even be proposed for specimens obtained at recurrence since the molecular pathways driving tumor growth could be altered along with tumor progression (10).

An incomplete understanding of the complex mechanisms exists concerning the relationship between MAPK activation and expression of hormone receptors and HER2 in breast carcinoma *in vitro*. In effusion specimens, p38 activation was reported to be inversely associated with the intensity of HER2 membrane expression (11).

In this context, although we did not observe any inverse relationship between HER2 and p-P38 MAPK expression, our results revealed that expression of P38 MAPK was significantly lower in TNBCs than in the other tumor subtypes. This may be reconsidered if a more specific approach of selective inhibition of P38 MAPK isoforms can be envisaged, as recent preclinical studies have demonstrated the important role played by the P38 MAPK γ isoform in TNBCs in relation with its marked induction of cell cycle arrest in the G(2)/M phase (29) and its effect on the cellular sensitivity to topoisomerase II inhibitors (30). Stimulation of topo II α gene expression by P38 MAPK γ may contribute to increased topo II α levels and enhanced antitumor activity of topo II inhibitors (24), therefore opening the field for the investigation of selective inhibitors of the P38 MAPK γ isoform in combination with chemotherapy.

p-ERK was detected in 73% of the tumor specimens, consistent with data reporting significant p-ERK expression in 69 to 96% of breast tumors (11,31,32). A low expression rate (35%) was only reported in one cohort (33). In our study, the expression of p-ERK was higher in high grade tumors (SBR3) consistent with data linking the activation of ERK with breast cancer cell proliferation (33).

p-AKT was detected in 38% of the tumor specimens and at a higher level in HER2⁺ tumors, consistent with data previously published using IHC which reported p-AKT cytoplasmic and nuclear expression rates of 36 and 29%, respectively, in

invasive ductal breast tumors and higher activation of AKT in HER2⁺ tumors (34). In this study (34), a correlation was observed between nuclear p-AKT and nuclear ER and PR expression while no difference was observed for cytoplasmic p-AKT expression and cytoplasmic ER and PR expression. This is consistent with our data showing an absence of a correlation between either ER or PR and p-AKT expression since when using total protein extract analysis no difference can be determined between cytoplasmic and nuclear compartments.

As a whole, we did not find any correlation between p-AKT, p-ERK expression and P38MAPK or p-P38MAPK expression either in the total population of this study or in ER, HER2 or TNBC subgroups. Similar findings have been reported and no significant correlations were evidenced between ER and levels of p-P38MAPK, p-AKT, or p-ERK (10,11). Only several correlations have been reported between p-P38 MAPK and p-AKT and between p-P38 MAPK and p-ERK in a global population of tumor specimens from untreated patients analyzed using IHC (10). Similar to other research (11), we did not find any relationship between HER2 and p-ERK.

Collectively, our data indicate that the regulation of P38 MAPK was not directly linked to any of the investigated signaling pathways and could be considered as an independent biomarker in breast cancer. This also confirms the complexity of breast cancer oncogenesis, involving the recruitment of multiple signaling pathways.

In conclusion, P38 MAPK expression and activation are frequently observed in breast carcinoma and appear to be positively associated with the expression of the ER. Our results confirm the capability of breast cancer cells to activate P38 MAPK-mediated stress mechanisms and that P38 MAPK may represent a biological target for ER⁺ breast cancer. The frequent concomitant activation of P38 MAPK, ERK and AKT indicates that breast tumor growth involves the activation of multiple signaling pathways, probably explaining the multiple mechanisms by which tumor cells develop resistance. Control of tumor growth should therefore entail the inhibition of all signaling pathways by combining multiple targeted therapies either in concomitant or in sequential use.

Acknowledgements

The present study was supported by the French 'Ligue contre le Cancer, Comité Inter-régional Grand Est' and Alexis Vautrin private research funds.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90, 2011.
2. Baselga J, Campone M, Piccart M, *et al*: Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 366: 520-529, 2012.
3. Maemura M, Iino Y, Koibuchi Y, Yokoe T and Morishita Y: Mitogen-activated protein kinase cascade in breast cancer. *Oncology* 57 (Suppl 2): 37-44, 1999.
4. Ono K and Han J: The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12: 1-13, 2000.
5. Frigo DE, Basu A, Nierth-Simpson EN, *et al*: p38 mitogen-activated protein kinase stimulates estrogen-mediated transcription and proliferation through the phosphorylation and potentiation of the p160 coactivator glucocorticoid receptor-interacting protein 1. *Mol Endocrinol* 20: 971-983, 2006.

6. Wagner EF and Nebreda A: Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9: 537-549, 2009.
7. Tang L and Han X: The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomed Pharmacother* 67: 179-182, 2013.
8. Salh B, Marotta A, Wagey R, Sayed M and Pelech S: Dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream effectors in human breast cancer. *Int J Cancer* 98: 148-154, 2002.
9. Esteve FJ, Sahin AA, Smith TL, *et al.*: Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma. *Cancer* 100: 499-506, 2004.
10. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, *et al.*: Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol* 23: 2469-2476, 2005.
11. Davidson B, Konstantinovskiy S, Kleinberg L, *et al.*: The mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma. *Gynecol Oncol* 102: 453-461, 2006.
12. Chen L, Mayer JA, Krisko TI, *et al.*: Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. *Cancer Res* 69: 8853-8861, 2009.
13. Mueller KL, Powell K, Madden JM, Eblen ST and Boerner JL: EGFR tyrosine 845 phosphorylation-dependent proliferation and transformation of breast cancer cells require activation of p38 MAPK. *Transl Oncol* 5: 327-334, 2012.
14. Antoon JW, Bratton MR, Guillot LM, *et al.*: Pharmacology and anti-tumor activity of RWJ67657, a novel inhibitor of p38 mitogen activated protein kinase. *Am J Cancer Res* 2: 446-458, 2012.
15. Ghayad SE, Vendrell JA, Ben Larbi S, Dumontet C, Bieche I and Cohen PA: Endocrine resistance associated with activated ErbB system in breast cancer cells is reversed by inhibiting MAPK or PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Cancer* 126: 545-562, 2010.
16. Normanno N, Di Maio M, De Maio E, *et al.*: Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12: 721-747, 2005.
17. Musgrove EA and Sutherland RL: Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 631-643, 2009.
18. Cortés J, Saura C, Bellet M, *et al.*: HER2 and hormone receptor-positive breast cancer - blocking the right target. *Nat Rev Clin Oncol* 8: 307-311, 2011.
19. Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, *et al.*: Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res* 68: 826-833, 2008.
20. Lee H and Bai W: Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol* 22: 5835-5845, 2002.
21. Reddy KB, Nabha SM and Atanaskova N: Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 22: 395-403, 2003.
22. Chen J, Baskerville C, Han Q, Pan ZK and Huang S: $\alpha(v)$ integrin, p38 mitogen-activated protein kinase, and urokinase plasminogen activator are functionally linked in invasive breast cancer cells. *J Biol Chem* 276: 47901-47905, 2001.
23. Kim MS, Lee EJ, Kim HR and Moon A: p38 kinase is a key signaling molecule for H-Ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells. *Cancer Res* 63: 5454-5461, 2003.
24. Qi X, Zhi H, Lepp A, *et al.*: p38 γ mitogen-activated protein kinase (MAPK) confers breast cancer hormone sensitivity by switching estrogen receptor (ER) signaling from classical to nonclassical pathway via stimulating ER phosphorylation and c-Jun transcription. *J Biol Chem* 287: 14681-14691, 2012.
25. Banerjee A, Koziol-White C and Panettieri R Jr: p38 MAPK inhibitors, IKK2 inhibitors, and TNF α inhibitors in COPD. *Curr Opin Pharmacol* 12: 287-292, 2012.
26. Chergui F, Chrétien AS, Bouali S, *et al.*: Validation of a phospho-protein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. *Clin Chem* 55: 1327-1336, 2009.
27. Svensson S, Jirstrom K, Rydén L, *et al.*: ERK phosphorylation is linked to VEGFR2 expression and Ets-2 phosphorylation in breast cancer and is associated with tamoxifen treatment resistance and small tumours with good prognosis. *Oncogene* 24: 4370-4379, 2005.
28. Bhatt S, Xiao Z, Meng Z and Katzenellenbogen BS: Phosphorylation by p38 mitogen-activated protein kinase promotes estrogen receptor α turnover and functional activity via the SCF(Skp2) proteasomal complex. *Mol Cell Biol* 32: 1928-1943, 2012.
29. Meng F, Zhang H, Liu G, *et al.*: p38 γ mitogen-activated protein kinase contributes to oncogenic properties maintenance and resistance to poly (ADP-ribose)-polymerase-1 inhibition in breast cancer. *Neoplasia* 13: 472-482, 2011.
30. Qi X, Hou S, Lepp A, *et al.*: Phosphorylation and stabilization of topoisomerase II α protein by p38 γ mitogen-activated protein kinase sensitize breast cancer cells to its poison. *J Biol Chem* 286: 35883-35890, 2011.
31. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, *et al.*: Expression and prognostic relevance of activated extracellular-regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer. *Br J Cancer* 92: 2206-2215, 2005.
32. Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, Skoog L and Lehtiö J: Vascular endothelial growth factor receptor 2 and downstream p38 mitogen-activated protein kinase are possible candidate markers of intrinsic resistance to adjuvant endocrine treatment in steroid receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 125: 457-465, 2011.
33. Hermanto U, Zong CS and Wang LH: Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase selectively inhibits cell proliferation in human breast cancer cells displaying enhanced insulin-like growth factor I-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *Cell Growth Differ* 11: 655-664, 2000.
34. Park SS and Kim SW: Activated Akt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: Correlation with HER2 overexpression. *Oncol Rep* 18: 139-143, 2007.

III.2. Détermination de marqueurs prédictifs de réponse à l'association trastuzumab-évérolimus, en situation pré-opératoire dans les cancers du sein localisés surexprimant HER2 : Essai RADHER.

Bien que l'efficacité du trastuzumab ne soit plus à démontrer, on constate dans certaines situations l'apparition de résistances. Les mécanismes à l'origine de cette résistance sont multiples, complexes et partiellement élucidés.

Une hyperactivation de la voie PI3K/AKT/mTOR due à des mutations activatrices de la PI3Kinase ou à la perte d'expression de PTEN en aval des récepteurs HER2 est fréquemment observée dans les cancers mammaires et est, entre autres, à l'origine de la résistance au trastuzumab.

On peut alors émettre l'hypothèse qu'un double blocage à la fois au niveau du récepteur HER2 et en aval de la voie de signalisation au niveau de mTOR permettrait de contourner cette résistance et améliorerait le taux de réponse.

L'association de l'évérolimus au trastuzumab suscite donc un grand intérêt et est largement étudiée pour essayer de pallier la résistance au trastuzumab.

Les données des études précliniques et des études de phase I/II en situation métastatique montrent que l'évérolimus est actif sur les cellules résistantes au trastuzumab et suggèrent que l'association évérolimus - trastuzumab pourrait augmenter l'efficacité du traitement et restaurer la sensibilité au trastuzumab (185-187). Un essai de phase II évaluant l'association de l'évérolimus au trastuzumab et au paclitaxel chez des patientes présentant un cancer du sein avancé HER2+, en progression et précédemment traitées par du trastuzumab associé à un taxane, a lui aussi mis en évidence l'intérêt potentiel de cette association avec un bénéfice clinique dans 36,4% des cas, une PFS de 5.5 mois et une survie globale de 18.1 mois (188).

L'étude de phase III qui en découle, Etude BOLERO I, n'a quant à elle pas montré de différence statistiquement significative de PFS entre le bras contrôle associant le trastuzumab au paclitaxel et le bras associant l'évérolimus au paclitaxel et au trastuzumab, mais a tout de même mis en évidence un allongement de la PFS de 7.2 mois avec l'addition de l'évérolimus dans le sous-groupe RH/HER2+ (189).

Enfin l'étude BOLERO 3, étude de phase III, randomisée, en double aveugle, qui compare l'association évérolimus/trastuzumab/vinorelbine versus trastuzumab/vinorelbine/placebo chez des patientes avec un cancer du sein HER2+ avancé, pré-traitées par trastuzumab et un taxane, a elle mis en évidence un faible allongement de la PFS dans le bras évérolimus (7mois *versus* 5.8 mois dans le bras contrôle) mais en revanche des toxicités beaucoup plus importantes (151).

Comprendre les mécanismes à l'origine de la résistance au trastuzumab et contourner cette résistance reste donc un enjeu majeur de la recherche en oncologie.

Nous avons, pour notre part, étudié l'intérêt de combiner l'évérolimus au trastuzumab, en situation pré-opératoire chez des patientes présentant un cancer du sein précoce, HER2+, non précédemment traitées et déterminé l'impact de cette association sur la fonctionnalité des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase situées en aval, afin de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la réponse thérapeutique et identifier de potentiels biomarqueurs de réponse au traitement.

Introduction

Le trastuzumab a considérablement amélioré la survie des patientes présentant un cancer du sein HE2+ que ce soit en situation adjuvante ou en métastatique, avec cependant un bénéfice plus prononcé en association avec une chimiothérapie (131, 190, 191).

Cependant 10% des patientes opérables, traitées par du trastuzumab combiné à une chimiothérapie adjuvante développe une résistance dans les 4 ans et la quasi-totalité des femmes présentant une maladie métastatique finissent par progresser sous trastuzumab (190).

De précédentes études ont mis en évidence l'intérêt d'utiliser le trastuzumab en situation pré-opératoire aussi bien en monothérapie qu'en association avec des agents cytotoxiques (192-195). L'étude RADHER est une étude clinique de phase II, prospective, randomisée, multicentrique, nationale, en double aveugle comparant le trastuzumab en monothérapie au trastuzumab associé à l'évérolimus en situation pré-opératoire chez des patientes présentant un cancer du sein non métastatique surexprimant HER2 et accessible d'emblée à une chirurgie. Une partie biologique est intégrée dans cette étude clinique. Cette partie biologique consiste en l'exploration de la fonctionnalité des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase afin d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse aux traitements. C'est cette partie qui sera notamment développée dans cette thèse.

Objectifs

L'objectif principal de l'étude était d'évaluer l'efficacité du traitement associant le trastuzumab à l'évérolimus en situation pré-opératoire chez des patientes présentant un cancer du sein non métastatique surexprimant HER2 et accessible d'emblée à une chirurgie. Le second objectif était quant à lui de déterminer des corrélations clinico-biologiques et d'identifier des biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement par trastuzumab associé à l'évérolimus. Pour cela nous avons étudié le niveau d'expression des phosphoprotéines des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase afin de mieux comprendre la signification clinique et l'intérêt théranostique de ces phosphoprotéines.

Patients et Méthodes

- Design de l'étude

Les patientes ont été randomisées de Juillet 2008 à Avril 2012 dans 2 bras de traitements, le premier bras recevant un traitement par trastuzumab seul à la dose de charge de 4mg/kg/semaine, puis à la dose d'entretien de 2mg/kg/semaine et le deuxième bras recevant le trastuzumab associé à l'évérolimus à la dose de 10 mg par jour. Dans chaque bras les patientes ont reçu le traitement pendant une période de 6 semaines en pré-opératoire. 82 inclusions ont été faites dont 41 dans chaque bras. Seules 80 d'entre elles étaient éligibles. L'âge médian à l'inclusion était de 52.7 ans.

- Patientes

Pour être éligible, les patientes devaient avoir 18 ans ou plus et présenter une tumeur mammaire primaire invasive histologiquement prouvée, non précédemment traitée, non métastatique (confirmation par scintigraphie osseuse, radiographie du thorax et échographie du foie avant l'initiation du traitement) et pouvant bénéficier d'un traitement chirurgical conservateur (T0 (>15mm USG) -T3)). Les tumeurs devaient présenter une surexpression de HER2 avec un score 3+ en immunohistochimie ou 2+ confirmé en FISH, qu'elles soient uni ou multifocales, et quel que soit le statut hormonal. Le *Performance Status* devait être de 0 ou 1, les fonctions hématologique, rénale, hépatique, cardiaque et pulmonaire devaient être normales. Les patientes présentant un cancer du sein inflammatoire, une pathologie cardiaque ou toutes autres pathologies graves n'étaient pas éligibles. Toutes les patientes ont donné leur consentement par écrit avant leur inclusion dans l'étude. La réponse clinique a été déterminée selon les critères RECIST (réponse clinique partielle et réponse clinique complète: répondeurs et patients stables ou en progression: non répondeurs) et la réponse pathologique évaluée par la classification de Sataloff (Ta et Tb: répondeurs et Tc et Td: non répondeurs).

- Sélection des tumeurs et extraction des protéines

- Sélection des tumeurs

Des biopsies ont été réalisées avant l'initiation du traitement, au cycle 4 de traitement (biopsie optionnelle) et pendant la chirurgie. Les biopsies ont été prélevées à l'aiguille, congelées immédiatement dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C. Les échantillons pesaient entre 15 et 20 mg. A partir de ces prélèvements, une coupe au cryostat a été réalisée puis analysée après coloration à l'Hematoxylin Eosine Safran. Avant d'être soumise à une extraction protéique totale, chaque biopsie a été validée par un médecin anatomopathologiste. Un minimum de 50% de matériel tumoral était nécessaire pour permettre la détermination du niveau d'expression des phosphoprotéines par la technique Bioplex Protein Array® (BPA) (Bioplex ; Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

- Extraction protéique

Les échantillons de tumeurs ont d'abord été broyés pendant 15 minutes avec des billes en acier (Qiagen, Courtaboeuf, France), puis ont ensuite été exposés pendant 10 secondes à une solution de lyse (Cell Lysis Kit, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) contenant une anti-protéase, le phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF). Le mélange a ensuite été centrifugé à 4500 tours pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines a été recueilli et congelé à -80°C jusqu'à l'analyse. Avant d'être analysé par la technique BPA, la concentration en protéine de chaque extrait a été déterminée en utilisant un kit de dosage colorimétrique (kit BIORAD, DC Protein Assay Reagents Package), basé sur la technique de Lowry, et ajusté à 250 µg/ml (196).

- La technique Bioplex[®] Protein Array (BPA)

Les niveaux d'expression des phosphoprotéines p-AKT, p-GSK3 β , p-S6 kinase, p-MEK1, p-ERK1/2, p-P90RSK, p-IGF1R ainsi que p-P38MAPK ont été déterminés par la technique BPA. La technique BPA permet la détection et la quantification de multiples analytes (protéines, peptides ou acides nucléiques) dans un volume d'échantillon unique et à partir d'une petite quantité de tissu.

Il s'agit d'une technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sur microbilles en suspension, identifiées par un code couleur spécifique avec une détection fluorimétrique. L'analyse est réalisée en microplaques de 96 puits. Elle détermine de façon semi-quantitative précise et simultanée le niveau d'expression de multiples phosphoprotéines intervenant dans les voies de signalisation.

Cette technique se divise en plusieurs étapes. Au départ, les microbilles de polystyrène en suspension portent l'anticorps primaire spécifique du biomarqueur. Lorsque l'on ajoute les échantillons, il y a fixation des biomarqueurs sur les anticorps primaires. Les anticorps secondaires biotinylés se fixent alors aux anticorps primaires. On ajoute ensuite dans chaque puits de la streptavidine phycoérythrine (PE) qui se fixe à la biotine et qui permet l'émission de fluorescence. Un échantillon du mélange réactionnel final est aspiré par le détecteur. La détection de la fluorescence se fait à l'aide d'un système optique comprenant deux lasers (un vert et un rouge). Le premier laser (rouge) identifie le biomarqueur présent sur la bille via le code couleur de la bille correspondante, le second laser (vert) détermine quant à lui la concentration en biomarqueur (**Figure 17**). Le système de détection effectue un minimum de 150 mesures par analyte à raison de 100 mesures par minute.

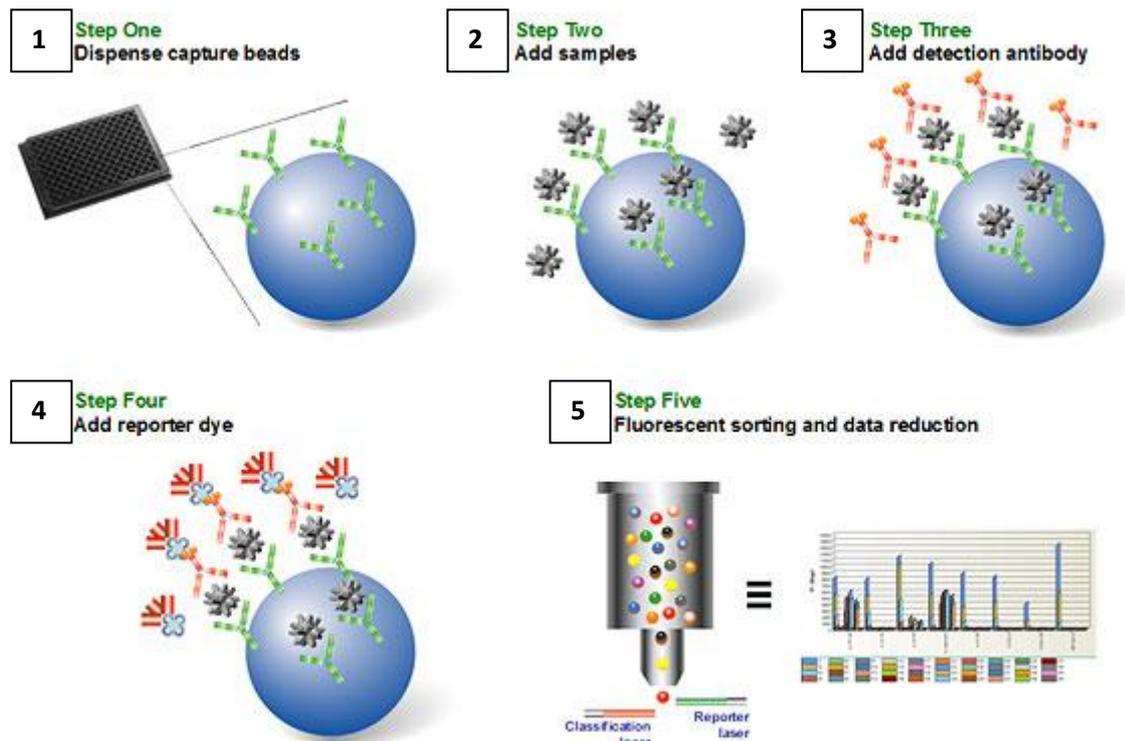


Figure 17: Les différentes étapes de l'analyse par la technique Bioplex Protein Array. D'après le site internet Bio-Rad.

Le schéma représente les différentes étapes de l'analyse par la technique BPA. L'étape 1 correspond au dépôt de la solution contenant les billes couplées aux anticorps spécifiques des phosphoprotéines dans les puits, l'étape 2 à la fixation des biomarqueurs sur les anticorps primaires, l'étape 3 à la fixation de l'anticorps biotinylé sur l'anticorps primaire, l'étape 4 à la fixation de la streptavidine marquée à la phycoérythrine (PE) sur l'anticorps secondaire biotinylé et enfin l'étape 5 correspond au passage du mélange au travers des 2 lasers et donc à l'identification et la quantification des phosphoprotéines du mélange.

Une fois extraites, les protéines sont ensuite transférées dans une plaque 96 puits et diluées dans 25 μ l de solution tampon. Nous avons utilisé des billes portant des anticorps dirigés contre les protéines P38MAPKinase, phospho-P38MAPKinase (p-P38MAPKinase), phospho-AKT (p-AKT), phospho-GSK3 (p-GSK3), phospho-P70S6K (p-P70S6K), phospho-MEK1 (p-MEK1), phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), phospho-P90RSK (p-P90RSK), et phospho-IGF-1R (p-IGF-1R). Les billes ont ensuite été ajoutées dans chaque puits et incubées toute la nuit à 37°C. Un contrôle positif constitué de protéines extraites de lignées cellulaires de cancer du sein MCF7 exposées à l'EGF, est ensuite ajouté dans chaque série. On procède ensuite à l'analyse par la technique BPA (111, 196).

Analyse statistique des résultats

Les analyses ont été réalisées en triplicate. Nous avons ensuite calculé la moyenne des valeurs des intensités de fluorescence. La valeur était considérée comme significative lorsque le ratio signal/bruit était supérieur à 3. Lorsque les variables avaient une distribution normale, nous avons utilisé pour l'analyse statistique un test de Student. Pour les autres, l'analyse statistique a été effectuée en utilisant le test de Wilcoxon à l'aide du logiciel R. le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

Résultats

Concernant la partie clinique, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les 2 bras, concernant les taux de réponse clinique complète et de réponse pathologique complète.

Le niveau d'expression des phosphoprotéines a été analysé sur 35 biopsies initiales et 19 biopsies prélevées au moment de la chirurgie dans le bras trastuzumab, et sur 37 biopsies initiales et 18 biopsies prélevées au moment de la chirurgie dans le bras associant le trastuzumab à l'évérolimus.

Aucune différence statistiquement significative du niveau d'expression des phosphoprotéines p-AKT ($p=0.129$), p-GSK3b ($p=0.219$), p-P70S6K ($p=0.718$), pP90RSK ($p=0.691$) et p-IGF1R ($p=0.655$) n'a été observée dans les 2 bras de traitement. En revanche, une variation du profil d'expression de p-MEK1 ($p=0.007$), p-ERK1/2 ($p=0.006$) et p-P38MAPK ($p=0.012$) a été observée.

Dans le bras traité par trastuzumab seul, aucune variation statistiquement significative du niveau d'expression des phosphoprotéines n'a été mise en évidence avant et après traitement.

Une augmentation statistiquement significative du niveau d'expression de p-MEK1 ($p=0.012$), p-ERK1/2 ($p=0.003$) et p-P38MAPK ($p < 0.001$) a, quant à elle, été mise en évidence dans le bras de traitement associant l'évérolimus au trastuzumab (**Figure 18**).

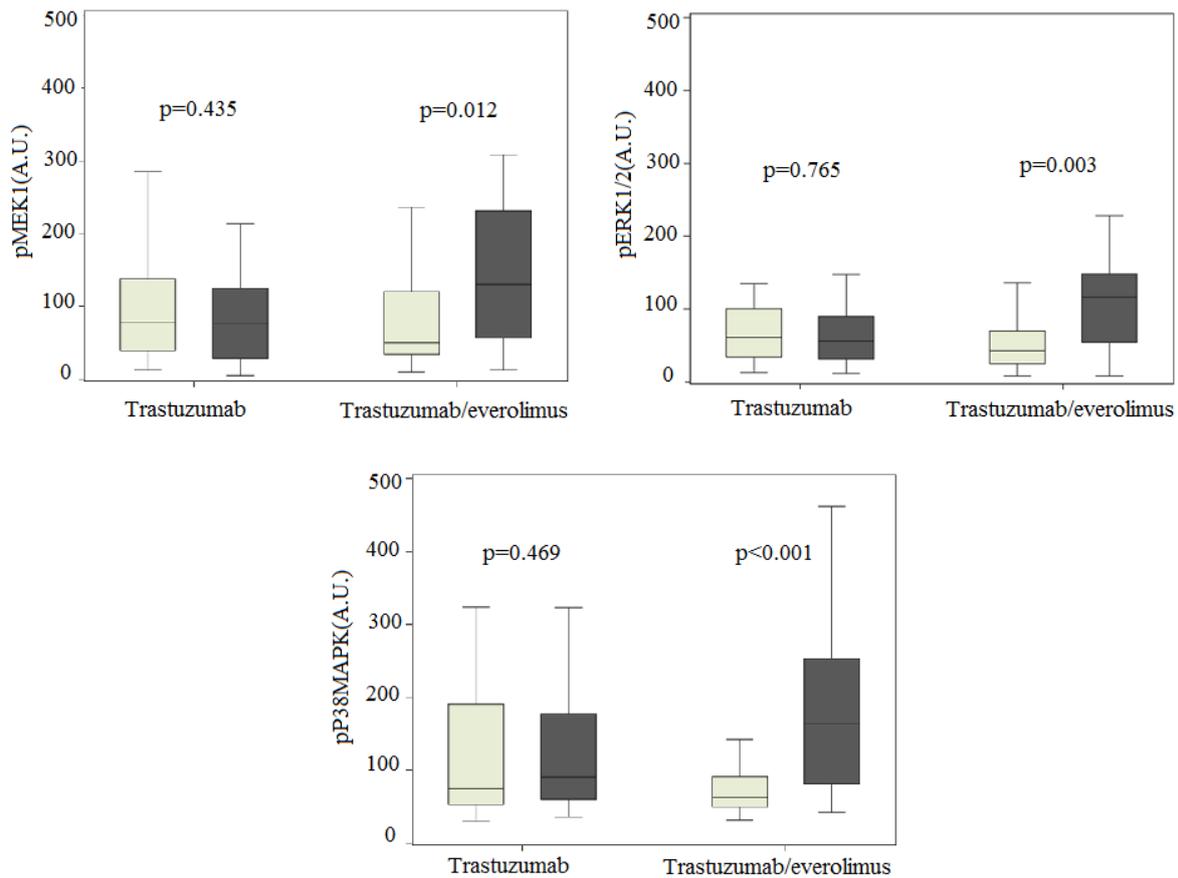


Figure 18: Niveaux d'expression des phosphoprotéines p-MEK1, p-ERK1/2, p-P38MAPK avant et après traitement.

Représentation sous forme de box-plots du niveau d'expression des phosphoprotéines p-MEK1, p-ERK1/2, p-P38MAPK dans les biopsies initiales et dans les biopsies réalisées au moment de la chirurgie avant et après traitement par trastuzumab et trastuzumab/évérolimus. En gris: Le niveau d'expression dans les biopsies initiales: N=35 dans le bras trastuzumab seul, N=37 dans le bras trastuzumab-évérolimus. En noir: Le niveau d'expression dans les biopsies réalisées au moment de la chirurgie :N=19 dans le bras trastuzumab seul, N=18 dans le bras trastuzumab-évérolimus.

Discussion

L'hyperactivation de la voie PI3K/AKT/mTOR est une des causes de la résistance au trastuzumab. Le ciblage de la voie à différents endroits pourrait être une solution pour contourner cette résistance. Dans cette étude, nous avons étudié l'impact clinique et biologique de l'association de l'évérolimus au trastuzumab. Nous avons déterminé le niveau d'expression des phosphoprotéines dans le but d'identifier de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement par trastuzumab associé à l'évérolimus chez des femmes présentant un cancer du sein précoce HER2+, et opérable.

Après traitement par trastuzumab seul, aucune variation du niveau d'expression des phosphoprotéines des voies PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase n'a été mise en évidence contrairement à ce qui était attendu.

Cette absence de régulation en aval des voies de signalisation peut éventuellement s'expliquer par la mise en jeu d'un mécanisme d'action immunologique prédominant de type ADCC par le trastuzumab et non pas par la mise en jeu du mécanisme d'action anti-HER2 (197-199). Le trastuzumab présente de multiples mécanismes d'action qui ne sont pas encore totalement élucidés et dont la mise en jeu dépendrait des conditions cellulaires mais également des conditions cliniques.

La mise en jeu d'un mécanisme d'action à prédominance immunologique en situation pré-opératoire et en monothérapie, a précédemment été mise en évidence dans d'autres études (192). Ceci pourrait expliquer nos résultats, cependant cette hypothèse reste à confirmer par des tests complémentaires. L'étude FinHER, essai clinique de phase III, a précédemment démontré la valeur prédictive du nombre d'infiltrats lymphocytaires présents au sein de la tumeur pour la réponse au traitement par trastuzumab, et souligne le bénéfice à ajouter le trastuzumab à une chimiothérapie conventionnelle pour les tumeurs HER2+ chez des patientes avec une tumeur à un stade précoce. Dans ces conditions, la présence d'infiltrats lymphocytaires tumoraux pourrait servir de biomarqueur de réponse au trastuzumab (200, 201).

Il a de plus été démontré que la réponse au trastuzumab était meilleure chez des patientes avec une bonne infiltration lymphocytaire et des cellules NK (192, 202, 203). En effet, dans l'étude GeparQUATTRO, une corrélation a été retrouvée entre l'augmentation des infiltrats lymphocytaires et l'augmentation de la réponse pathologique complète chez des femmes présentant un cancer HER2+ nouvellement diagnostiqué, à un stade précoce, et ayant reçu le trastuzumab en néoadjuvant associé à une chimiothérapie conventionnelle (204). Ces résultats confirment ceux de l'étude FinHER.

Le trastuzumab agirait donc différemment en fonction du schéma d'administration et de la présence ou non de médicaments coadministrés.

La biologie de la tumeur n'est donc pas le seul paramètre à considérer pour prédire la réponse au traitement par trastuzumab (205).

Dans le bras de traitement associant l'évérolimus au trastuzumab, on constate une activation de la voie des MAPKinases par l'augmentation du niveau d'expression des phosphoprotéines p-MEK, p-ERK et P38MAPKinase. En revanche, aucun impact sur le niveau d'expression des phosphoprotéines de la voie PI3K/AKT/mTOR n'a été observé. Des mécanismes additionnels au niveau des voies de signalisation pourraient expliquer ces constatations. En effet, les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases présentent de multiples points de convergence, cross talk et boucle de rétrocontrôle ce qui leur permet de se réguler mutuellement. Ces mécanismes pourraient être à l'origine de l'échappement aux traitements (37).

Il a précédemment été démontré que la voie PI3K ne régulait pas seulement AKT et mTOR mais modulait également l'activation d'autres voies de signalisation incluant la voie des MAPKinases (37). Les 2 voies sont liées par un rétrocontrôle négatif incluant S6K, IRS1, PI3K et RAS, et convergent également au niveau de mTORC1 (**Figure 19**). Carracedo et son équipe ont été les premiers à démontrer que les inhibiteurs de mTORC1 activaient la voie des MAPKinases in vitro et in vivo par inhibition du rétrocontrôle négatif S6K, IRS1, PI3K et RAS (39, 40, 206).

Le cross-talk entre ces 2 voies de signalisation a été démontré avec l'étude des inhibiteurs de PI3K dont l'utilisation a mis en évidence un impact sur ERK (39, 40). Les études sur les inhibiteurs de mTOR ont également montré que l'utilisation de l'évérolimus conduisait à l'activation de ERK avec une augmentation du niveau d'expression de p-ERK par suppression du rétrocontrôle négatif (39, 40, 207, 208). Il serait donc potentiellement intéressant d'associer les inhibiteurs de mTOR à d'autres inhibiteurs de kinase pour un blocage complet des voies de signalisation (37, 39, 40).

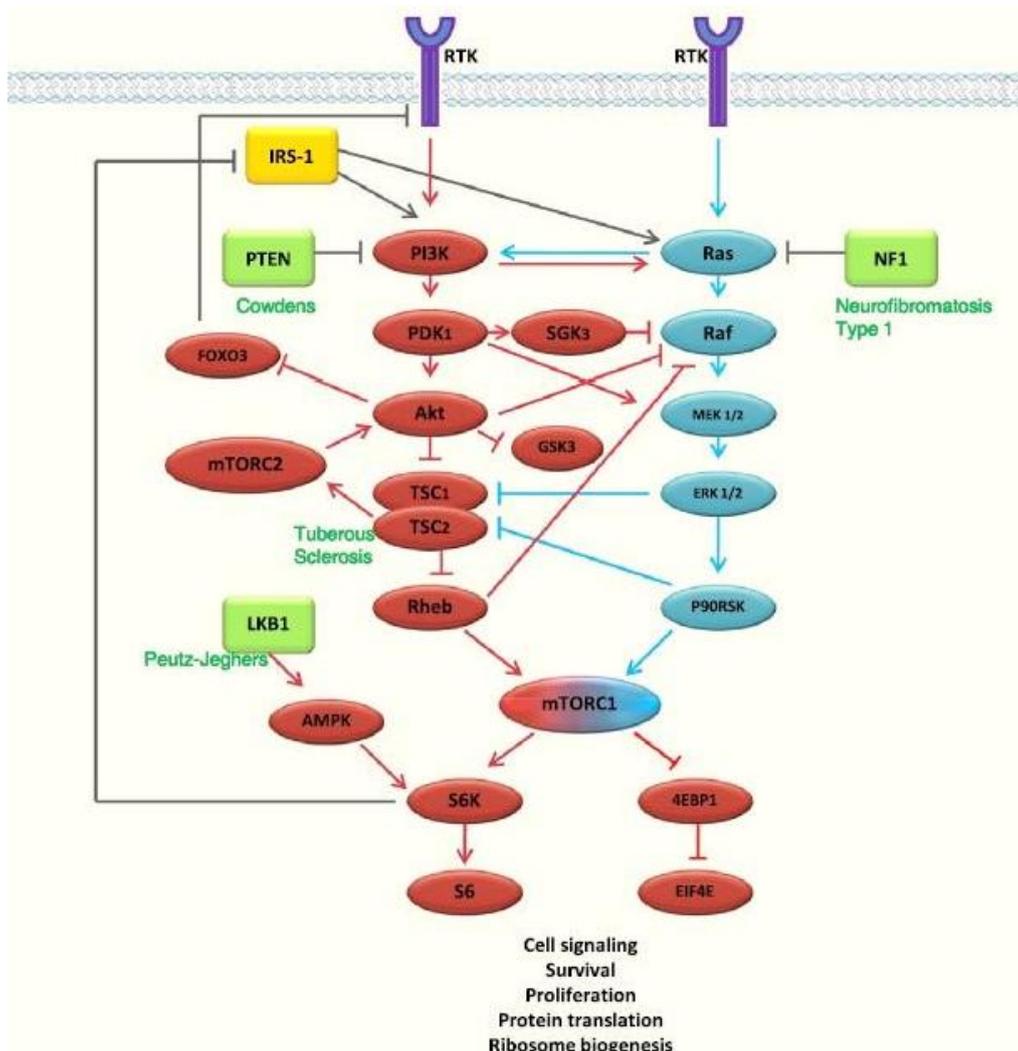


Figure 19: Boucle de rétrocontrôle négatif incluant S6K, IRS1, PI3K et RAS

Les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases présentent de multiples points de convergence et ont la capacité de se réguler mutuellement. Il existe un rétrocontrôle négatif faisant intervenir S6K, IRS1, PI3K et RAS qui permet la régulation de la voie RAS/RAF/MAPKinases via la voie PI3K/AKT/mTOR. D'après Saini KS. *et al.* (37).

Ce phénomène de suppression du rétrocontrôle négatif par les inhibiteurs de mTOR entraîne l'activation de la voie des MAPKinases et explique l'augmentation du niveau d'expression des phosphoprotéines constatée dans le bras de traitement associant l'évérolimus au trastuzumab. Ceci explique également l'efficacité limitée des inhibiteurs de mTOR en monothérapie (208).

Ces mécanismes confirment que l'utilisation d'inhibiteur spécifique en monothérapie peut entraîner un effet rebond, causant l'activation d'autres voies et donc diminuer l'effet anti-tumoral.

Afin de limiter cet effet, de nombreuses études testant des combinaisons de molécules telles que des associations d'inhibiteurs de mTOR avec des anti-MEK, des anti-ERK, ou encore des anti-IGF1 sont actuellement en cours. L'utilisation de combinaison d'inhibiteurs multikinases, appelés « dirty drugs », agissant à différents niveaux des voies de signalisation est une des pistes privilégiées pour améliorer l'efficacité des traitements et contourner les résistances. Par ailleurs, certaines études ont, quant à elles, démontré des différences du niveau d'expression de p-ERK en fonction de la dose et du schéma d'administration d'évérolimus. Une administration hebdomadaire entrainerait une plus grande activation de la voie des MAPKinases comparée à une dose plus faible et journalière. Ceci confirme que la biologie de la tumeur n'est pas le seul aspect à prendre en considération dans le choix thérapeutique (39).

Conclusion

Les résultats de notre étude démontrent l'intérêt d'explorer la fonctionnalité des voies de signalisation pour comprendre l'impact des traitements sur la signalisation et les mécanismes de résistance mis en œuvre. Certaines phosphoprotéines pourraient être utilisées comme biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements.

Les associations d'inhibiteurs de kinase semblent être une piste intéressante pour contourner les mécanismes de résistance et optimiser l'efficacité thérapeutique. Cependant, de nombreux mécanismes régissant la mise en œuvre de ces voies restent encore à élucider. Une meilleure compréhension de ces mécanismes nous permettrait d'optimiser les protocoles thérapeutiques et d'associer les molécules de façon la plus efficace possible.

III.3. Le trastuzumab en monothérapie et en préopératoire n'inhibe pas la signalisation en aval des récepteurs HER2 dans les cancers du sein HER2+.

Bien que le trastuzumab soit utilisé depuis plus d'une dizaine d'années, son mécanisme d'action reste partiellement inconnu. L'étude RADHER, précédemment développée, a mis en évidence un impact différent du trastuzumab sur les voies de signalisation selon qu'il est utilisé seul ou en association, et suggère la mise en œuvre d'un mécanisme d'action immunologique prédominant en monothérapie.

Le protocole d'administration, la dose et la présence ou non de médicaments co-administrés semblent avoir une influence sur le mécanisme d'action mis en jeu.

Plusieurs études ont également démontré que le comportement et le mécanisme d'action mis en jeu par le trastuzumab étaient complètement différents *in vitro* et *in vivo* (209, 210). C'est en ce sens que nous avons décidé de poursuivre nos investigations concernant l'impact du trastuzumab sur la signalisation cellulaire. Nous avons comparé l'impact du trastuzumab sur le niveau d'expression des phosphoprotéines des voies PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase *in vitro*, sur les lignées cellulaires SKBR-3 et MCF-7 en utilisant la technique BPA et nous avons ensuite comparé ces résultats aux données obtenues à partir des biopsies des patientes incluses dans l'étude RADHER et traitées dans le bras trastuzumab seul.

Cette comparaison avait pour but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'utilisation de cette thérapie ciblée afin d'optimiser son utilisation et son efficacité.

Introduction

HER2 (Récepteur du facteur de croissance Epidermique Humain 2) est surexprimé dans 15 à 20% des carcinomes mammaires. Cette surexpression était associée à un mauvais pronostic jusqu'au développement de la première thérapeutique anti-HER2, le trastuzumab, qui a considérablement amélioré le pronostic des cancers du sein HER2+. Cependant son mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé. De nombreuses études ont suggéré que le comportement et le mécanisme d'action du trastuzumab étaient considérablement différents *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons étudié la capacité du trastuzumab à inhiber la phosphorylation des protéines clefs des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase *in vitro*, dans des lignées cellulaires de cancers mammaires ainsi que dans des biopsies prélevées chez des patientes traitées par trastuzumab en situation pré-opératoire et en monothérapie dans le cadre de l'essai clinique RADHER.

Matériels et Méthodes

Des lignées cellulaires HER2 positive SKBR-3 et HER2 négative MCF-7 ont été exposées au trastuzumab pendant 72 heures. Quarante et une patientes ont reçu le trastuzumab seul pendant 6 semaines en situation pré-opératoire. Les biopsies ont été prélevées avant tout traitement et au moment de la chirurgie. Dix-neuf paires de biopsies étaient éligibles pour l'extraction protéique et l'analyse comparative du niveau d'expression des phosphoprotéines avant et après traitement.

Le niveau d'expression des phosphoprotéines a été quantitativement déterminé par la technique Bioplex Protein Array®.

Résultats

Dans les lignées cellulaires SKBR3, nous avons observé une diminution statistiquement significative du niveau d'expression de p-AKT, p-P70S6K, p-ERK1/2 et p-MEK1 après exposition au trastuzumab.

En revanche, chez les patientes aucune variation statistiquement significative du niveau d'expression de ces phosphoprotéines n'a été observée après traitement.

Discussion et Conclusion

L'absence de régulation en aval des voies de signalisation PI3Kinase et MAPKinases chez les patientes traitées en pré-opératoire par du trastuzumab seul pourrait s'expliquer par la mise en œuvre d'un mécanisme d'action immunologique prédominant de type cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, comme cela a précédemment été démontré dans l'étude de Gennari *et al.* en 2004 (192). Cette étude confirme que le trastuzumab fait intervenir différents mécanismes d'action selon s'il est utilisé *in vitro* ou en clinique.

Original Article (Accepté par *Oncology Letters*, Octobre 2015)

**TRASTUZUMAB AS PRE-OPERATIVE MONOTHERAPY DOES NOT INHIBIT HER2
DOWNSTREAM SIGNALING IN HER2 POSITIVE BREAST CANCER**

Maëva Lion^{1,2,3}, Alexandre Harlé^{1,2,3}, Julia Salleron⁴, Carole Ramacci³, Mario Campone^{5,6},

Jean-Louis Merlin^{1,2,3}

1- Université de Lorraine, Nancy, France

2- CNRS UMR 7039 CRAN – Université de Lorraine, Vandœuvre les Nancy France

3- Institut de Cancérologie de Lorraine – Service de Biopathologie – Vandœuvre les Nancy France

4- Institut de Cancérologie de Lorraine – Cellule Biostatistique – Vandœuvre les Nancy France

5- *INSERM* U892, Nantes, France

6- Institut de Cancérologie de l'Ouest, Département d'Oncologie Médicale, Nantes St Herblain, France

Corresponding author:

Pr. Jean-Louis Merlin

6 Avenue de Bourgogne

CS 30519

54519 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex

France

Tel. +33 383 59 84 84

Fax. +33 383 59 85 69

Jl.merlin@nancy.unicancer.fr

Keywords: breast cancer - trastuzumab - phosphoproteins - signaling pathways

Running title: Lion *et al*: IMPACT OF TRASTUZUMAB ON HER2 DOWNSTREAM SIGNALING
PATHWAYS

Abstract

HER2 (Human Epidermal Growth Factor 2) is overexpressed in 15-20% of breast carcinomas. Overexpression of HER2 was previously associated with a poor prognosis until the development of the first anti-HER2 therapy, trastuzumab, which drastically improves the prognosis of HER2-overexpressing breast cancers. However, its mechanism of action remains not fully understood.

Several studies have proposed that the behavior and mechanism of action of trastuzumab might drastically differ *in vitro* and *in vivo*.

We have studied the ability of trastuzumab to inhibit the phosphorylation of key-proteins of PI3K/AKT/mTOR and RAS/RAF/MAPKinase signaling pathways *in vitro*, in breast cancer cell lines and in tumor biopsies taken from patient treated by trastuzumab pre-operative monotherapy as part of RADHER clinical trial.

HER2-positive SKBR3, and HER2 negative MCF-7, cell lines were exposed to trastuzumab for 72 hours.

Forty-one patients received trastuzumab alone for a 6 weeks preoperative treatment. Biopsies were collected at baseline and at surgery. Nineteen pairs, associating baseline and surgery tumor specimens were eligible for protein extraction and comparative phosphoprotein expression analysis before and after treatment.

Expression of phosphoproteins was quantitatively assessed using a multiplex immunoassay.

In cell lines SKBR3, we observed a statistically significant decrease of the expression level of p-AKT, p-P70S6K, p-ERK1/2 and p-MEK1 after exposure to trastuzumab.

In contrast, in patients, no statistically significant variations for levels expression of these phosphoproteins have been observed after treatment. The lack of down-regulation of PI3Kinase and MAPKinase pathways could probably be explained by the implementation of a

predominant immunological mechanism of action for trastuzumab, type of antibody-dependent cell-mediated toxicity (ADCC), which has previously been reported in pre-operatively setting as monotherapy.

The present study confirms that trastuzumab involves different modes of action when assayed *in vitro* and used clinically.

INTRODUCTION

Breast cancer treatment has evolved in the last 20 years thanks to the better understanding of molecular mechanisms and the identification of many genomic alterations involved in the carcinogenesis process. This knowledge also allowed the identification of new therapeutic targets and the development of numerous drugs specifically directed against these targets called targeted therapies. The HER2 (Human Epidermal Growth Factor 2) oncoprotein is one of the first therapeutic targets identified for breast carcinoma treatment. This protein is a class 1 transmembrane receptor with a tyrosine kinase activity and is involved in the oncogenic activation of many signaling pathways including MAP kinase and PI3 kinase pathways (1, 2). These pathways play a key-role in cellular homeostasis and regulate the mechanisms of growth, differentiation, cell proliferation and apoptosis. Both pathways are frequently dysregulated in breast cancers because of mutations, deletions or rearrangements on the signaling proteins encoding genes (3, 4).

MAP Kinase and PI3 Kinase pathways are kinase dependent. Activation of these kinases leads to their active phosphorylated forms (5). Upregulation of signaling pathways and then an increase of the phosphorylation of the proteins involved in these pathways has been showed in many cancers. This was particularly the case for p-AKT in lung cancer, myeloid leukemia, prostate and breast cancers (6-8). Consequently, protein phosphorylation may be an indicator of signaling activity in tumors and can be used to assess the activity of intracellular signaling pathways (9). Levels of phosphorylated forms of cells signaling proteins may be a prognostic biomarker and may predict the tumors sensitivity to treatment (10-12)

HER2 receptors are involved in tumor development and proliferation (13). Activating mutations on gene loci encoding the tyrosine kinase domain, or an overexpression of HER2

receptors can lead to up-regulation or dysregulation of downstream signaling pathways (13).

HER2 is overexpressed in 15 to 20% of breast carcinomas (1, 14).

Overexpression of HER2 was previously associated with a poor prognosis until the development of the first anti-HER2 therapy, trastuzumab, which drastically improves progression free and overall survivals of HER2-overexpressing breast cancers (15).

Trastuzumab is an IgG1-type humanized recombinant monoclonal antibody (mAb) directed against the extracellular domain of HER2 tyrosine kinase receptor (16, 17). This mAb specifically binds the subdomain IV of HER2 extracellular domain; through this molecular mechanism, trastuzumab activity is awaited by blocking HER2 downstream cell signaling (17-19). Because of its IgG1 backbone, trastuzumab also acts through Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC). The interaction of the Fc domain with Fc gamma receptor of immune cells (natural killer cells, macrophages) leads to the activation of these cells and therefore the lysis of cancer cells (1, 2, 16, 20-24).

Several studies have proposed that the behavior and mechanism of action of trastuzumab might drastically differ *in vitro* and *in vivo* (19, 21) and that the relative involvement of signaling inhibition vs ADCC could be an important determinant of the activity of trastuzumab (25).

The aim of this study was to compare the ability of trastuzumab to inhibit the phosphorylation of key-proteins of PI3K/AKT/mTOR and RAS/RAF/MAPKinase signaling pathways *in vitro*, in breast cancer cell lines and in tumor biopsies taken from patient treated by trastuzumab pre-operative monotherapy as part of RADHER clinical trial.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

HER2-positive SKBR3 (ATCC[®] HTB-30[™]), and HER2 negative MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™]), cell lines were maintained in phenol red-free RPMI 1640 culture medium supplemented by 10% fetal calf serum (FCS) in 5% CO₂ atmosphere. Both cell lines were exposed to trastuzumab (5.10⁻⁶ mol/L) for 72 hours in FCS-free medium.

Patients

All patients (n=41) had early or locally advanced HER2 breast carcinomas and received trastuzumab as short-term preoperative monotherapy as part of RADHER-GEP04 clinical trial (EUdraCT N° 2007-004098-24). Trastuzumab was administered following a weekly schedule with a loading dose of 4mg/kg then 2mg/kg/week for 6 weeks. Surgery was performed after completion of the sixth cycle. All patients gave their written consent and study has been approved by the ethical committee of Nantes, France. All patients had baseline 18G-needle biopsies before the initiation of the treatment. A second biopsy was taken at surgery. Samples were snap-frozen to avoid phosphoproteins degradation. Before being submitted to total protein extraction, all biopsies were validated by a senior pathologist after Hematoxylin-Eosin frozen section examination to ensure minimal tumor cell content greater than 50%.

Nineteen pairs of biopsies (baseline/surgery) were eligible for protein extraction and comparative phosphoprotein expression analysis before and after treatment.

Phosphoprotein expression analysis using multiplex bead-immunoassay:

The expression levels of phosphorylated-AKT (p-AKT), p-P70S6 kinase, p-MEK1, and p-ERK1/2, were quantitatively assessed using multiplex bead immunoassay as previously described (26). Briefly, proteins were extracted from cell cultures and tumor specimens using cell lysis kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's recommendations. Cell pellets (1.10^6 cells), or tumor specimens (15-20 mg) were first disrupted for 15 min by use a steel-bead tissue lyser (Qiagen). Disrupted tissues were then exposed for 10 seconds to the lysis solution containing phenylmethylsulfonylfluoride antiprotease. Protein extracts were finally stored at -80°C until analyzed.

Proteins extracts were transferred into 96 well-plates and diluted with 25 μl buffered solution. Beads bearing antibodies directed against the phosphoproteins of interest (p-AKT, p-P70S6K, p-MEK1, p-ERK1/2) were then added to each well and incubated overnight at 37°C . Biotinylated antibodies and streptavidin-phycoerythrin solution were then added. Phosphoproteins expression was then assessed using BioPlex[®] (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in accordance with manufacturer's instructions. Frozen protein extracts from MCF-7 cell line exposed to EGF (Epidermal Growth Factor) were used as positive controls. The results were recorded as mean fluorescence intensities expressed as arbitrary units and considered as significant when exceeding a signal/noise ratio of 3. Results were normalized to the data measured in the positive controls.

Statistical analysis

Results were recorded as mean fluorescence intensity of triplicate experiments (cell lines) or duplicate measurements (patients) and expressed as arbitrary units. Parameters had been

rescaled by dividing by the mean of the parameter before exposure to trastuzumab. Hence, all parameters before exposure to trastuzumab had a mean equal to 1 and effect size was not affected by this transformation.

Comparisons of the parameters between the two times were made by a paired Student T test. Statistical analyses were performed using SAS software version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC27513 USA). Significant level was set at 0.05.

RESULTS

In MCF-7 cell lines, the mean for phosphoproteins expression level after exposure to trastuzumab (5.10^{-6} mol/l) was 0.95 (standard deviation=0.04), 0.96 (0.21), 0.96 (0.11), 0.85 (0.17) for p-AKT, p-ERK1/2, p-70S6K, p-MEK1 respectively. No statistically significant difference of the expression level of phosphoproteins before and after exposure to trastuzumab ($p=0.36$, $p=0.78$, $p=0.63$ and $p=0.30$) for p-AKT, p-ERK1/2, p-70S6K and p-MEK1 respectively) has been detected in MCF-7 cell lines (**Table I, Figure 1A**).

In SKBR-3 cell lines, the mean for phosphoproteins expression level after exposure to trastuzumab (5.10^{-6} mol/l) was 0.32 (standard deviation=0.07), 0.68 (0.09), 0.83 (0.00), 0.68 (0.07) for p-AKT, p-ERK1/2, p-70S6K, p-MEK1 respectively. A statistically significant decrease of the expression level of p-AKT ($p<0.01$), p-ERK 1/2 ($p=0.02$), p-70S6K ($p<0.01$) and p-MEK1 ($p=0.02$) was observed after exposure to trastuzumab in SKBR-3 cell lines (**Table I, Figure 1B**).

In patients, the means for phosphoproteins expression level in biopsies taken after treatment was 0.89 (standard deviation=1.77), 0.92 (0.15), 0.98(0.70), 1.00 (0.69) for p-AKT, p-P70S6K, p-MEK1 and p-ERK1/2 respectively. No statistically significant variation of signaling phosphoproteins p-AKT ($p=0.77$), p-P70S6K ($p=0.16$), p-MEK1 ($p=0.92$) and p-ERK1/2 ($p=0.99$) expression was observed after treatment (**Table II, Figure 2**).

DISCUSSION

Trastuzumab is undoubtedly a major advance in the breast cancer treatment either in metastatic or adjuvant settings, alone or in combination with chemotherapy. This mAb dramatically improved response rate, progression-free and overall survivals in metastatic disease (15). However its exact mode of action remains partly elucidated and several studies suggested that the inhibition of the oncogenic signaling should not be the main mode of action especially when trastuzumab is given alone in chemotherapy-naïve patients (27).

In this study, we analyzed the expression level of phosphoproteins from PI3K/AKT/mTOR and RAS/RAF/MAPKinase signaling pathways before and after exposure to trastuzumab.

We compared the impact of trastuzumab in cell lines and in tumor specimens taken from patients with HER2 overexpressing early breast cancer, receiving trastuzumab as preoperative monotherapy as part of RADHER clinical trial.

We showed here that trastuzumab has a different impact on the signaling pathways of MCF-7 cell lines and SKBR-3. After exposure to trastuzumab, we found a statistically significant decrease in the expression level of p-AKT, p-P70S6K, p-MEK1, p-ERK1 / 2 in cell lines SKBR-3 but not in MCF -7. This was predictable and can be explained by the fact that SKBR-3 cell lines overexpress HER-2 in contrast to the MCF-7 cell lines.

Surprisingly we did not observe any decrease of the expression level of phosphoproteins after treatment with trastuzumab as monotherapy in HER2 positive breast cancer patients which suggest that other mechanisms interfere.

Previous studies have demonstrated that trastuzumab has several modes of action, implying different mechanisms for antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. It has already been shown that modulation of signaling pathways was the main mechanism when cell lines were

treated with trastuzumab whereas ADCC was the leading mechanism in small animals treated with the same molecule (22, 27, 28). It was also shown that the mechanism of action involved was different depending on the neoadjuvant or adjuvant setting, on the dose and on the administration schedule, but also on the presence or absence of co-administered drugs (27, 29, 30). Gennari *et al.* showed in 2004 that trastuzumab had a preferential immunological mechanism of action type of ADCC when it used as monotherapy and in preoperative setting (27).

The tumor classification would therefore not be the only parameter to consider in predicting response to treatment (30).

In our study, trastuzumab has been used in preoperative setting as monotherapy, so the lack of down-regulation of PI3Kinase and MAPKinase pathways could probably be explained by the implementation of a predominant immunological mechanism of action for trastuzumab type of ADCC, which is consistent with previous studies (27). Further investigations are needed to bring out ADCC mechanisms.

Therefore it has been previously demonstrated that signaling pathways were interconnected with multiples point of convergence, cross talk and feedback loops and these pathways can activate or inhibit each other depending on the context and on cell conditions (31-35). A compensatory mechanism due to other signaling pathways could explain the absence of decrease of phosphoproteins expression levels.

However, it should be noted that our study is performed on a small population, which can lead to a bias in our results. These results should be confirmed in a larger and more representative effective.

Bio-Plex[®] phosphoprotein array does not provide subcellular localization data and does not take into account the heterogeneity of the tumor tissue (26). ***Tumor heterogeneity is a***

major source of variability in results. Tumors can be polyclonal and therefore not expressed homogeneously phosphoproteins. We cannot neither be sure that the samples we analyzed were fully representative of whole tumor because the stroma is present in various proportions in the tumor tissue, which may explain the difference with the cell lines that are not affected by the stroma or by tumor heterogeneity.

Results can also be influenced by various parameters including pre-analytical phase.

The pre-analytical steps for sampling may importantly influence the results particularly concerning phosphoproteins (36). Phosphoproteins are very sensitive to temperature and are rapidly degraded which may have an impact on results. Many variables can influence the quality of sampling particularly the intraoperative hypoxia and cold ischemic time. It has been previously shown on uterus surgical specimens that the time between exeresis and analysis has an impact on the level of expression of phosphoproteins (37).

The hot and cold ischemia time can influence the quality of samples and induced variation of expression levels of phosphoproteins, because phosphoproteins are very sensitive to phosphatase (37). It is difficult to prevent the dephosphorylation of the marker. Moreover, their degradation is preceded by an increase of their concentration in the sample. All these parameters are difficult to control. Rapid process is essential for any study using phosphoprotein to assess signaling activity. In our study this time has not been traced which could be a significant bias in our results. However, the procedure used in our study (exeresis and snap freezing) ensure few variations in phosphoproteins expression by limiting their degradation.

Therefore, the degradation can vary according to the tissue or tumor type and the phosphoprotein itself (36). Phosphoproteins levels can also be affected by others cellular stressors prior to tissue congelation (10).

CONCLUSION

Although trastuzumab is widely used for the treatment of HER2-overexpressing breast cancers, the *in vivo* mechanism of action is not yet fully understood. In our study, we showed that trastuzumab inhibit MAPKinase and PI3Kinase pathways on cell-line overexpressing HER2 but not on HER2 overexpressing tumors treated pre-operatively as monotherapy. According to our results, it seems that the inhibition of oncogenic signaling pathways could not be the main mode of action when trastuzumab is given alone in chemotherapy naïve patients. Alternative molecular mechanisms such as modulation of immune pathways should be considered.

Bibliography

1. Hudis CA: Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *The New England journal of medicine* 357: 39-51, 2007.
2. Baselga J: Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21 Suppl 7: vii36-40, 2010.
3. Engelman JA, Luo J and Cantley LC: The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews Genetics* 7: 606-619, 2006.
4. Harle A, Lion M, Lozano N, *et al*: Analysis of PIK3CA exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: correlation with clinicopathological criteria. *Oncology reports* 29: 1043-1052, 2013.
5. Mendoza MC, Er EE and Blenis J: The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences* 36: 320-328, 2011.
6. Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, *et al*: The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochimica et biophysica acta* 1823: 2168-2178, 2012.
7. Park SS and Kim SW: Activated Akt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with HER2 overexpression. *Oncology reports* 18: 139-143, 2007.
8. Lin HJ, Hsieh FC, Song H and Lin J: Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. *Br J Cancer* 93: 1372-1381, 2005.
9. Baker AF, Dragovich T, Ihle NT, Williams R, Fenoglio-Preiser C and Powis G: Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling. *Clin Cancer Res* 11: 4338-4340, 2005.
10. David K and Juhl H: Immunohistochemical Detection of Phosphoproteins and Cancer Pathways. In: *Handbook of Practical Immunohistochemistry*. Lin F and Prichard J (eds). Springer New York, pp85-90, 2015.
11. Mandell JW: Phosphorylation state-specific antibodies: applications in investigative and diagnostic pathology. *The American journal of pathology* 163: 1687-1698, 2003.
12. Mandell JW: Immunohistochemical assessment of protein phosphorylation state: the dream and the reality. *Histochemistry and cell biology* 130: 465-471, 2008.

13. Menard S, Pupa SM, Campiglio M and Tagliabue E: Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene* 22: 6570-6578, 2003.
14. Yersal O and Barutca S: Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World journal of clinical oncology* 5: 412-424, 2014.
15. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, *et al*: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* 344: 783-792, 2001.
16. Valabrega G, Montemurro F and Aglietta M: Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18: 977-984, 2007.
17. Gemmete JJ and Mukherji SK: Trastuzumab (herceptin). *AJNR American journal of neuroradiology* 32: 1373-1374, 2011.
18. Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S and Arteaga CL: Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 62: 4132-4141, 2002.
19. Mohsin SK, Weiss HL, Gutierrez MC, *et al*: Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol* 23: 2460-2468, 2005.
20. Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN and Esteva FJ: Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nature clinical practice Oncology* 3: 269-280, 2006.
21. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, *et al*: Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 94: 259-267, 2006.
22. Clynes RA, Towers TL, Presta LG and Ravetch JV: Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6: 443-446, 2000.
23. Spector NL and Blackwell KL: Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 27: 5838-5847, 2009.
24. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J and Baselga J: Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 61: 4744-4749, 2001.

25. Andre F, Dieci MV, Dubsy P, *et al*: Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 19: 28-33, 2013.
26. Chergui F, Chretien AS, Bouali S, *et al*: Validation of a phosphoprotein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. *Clinical chemistry* 55: 1327-1336, 2009.
27. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, *et al*: Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 10: 5650-5655, 2004.
28. Therasse P: Measuring the clinical response. What does it mean? *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 38: 1817-1823, 2002.
29. Petricevic B, Laengle J, Singer J, *et al*: Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *J Transl Med* 11: 307, 2013.
30. Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM, Menard S and Balsari A: Activity and resistance of trastuzumab according to different clinical settings. *Cancer treatment reviews* 38: 212-217, 2012.
31. Singh A, Nunes JJ and Ateeq B: Role and therapeutic potential of G-protein coupled receptors in breast cancer progression and metastases. *European journal of pharmacology* 2015.
32. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JH, Kallemeijn WW and Schutte M: Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Molecular cancer research : MCR* 5: 195-201, 2007.
33. Aksamitiene E, Kiyatkin A and Kholodenko BN: Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochemical Society transactions* 40: 139-146, 2012.
34. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, *et al*: Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer treatment reviews* 39: 935-946,
35. Carracedo A and Pandolfi PP: The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27: 5527-5541, 2008.

36. Pinhel IF, Macneill FA, Hills MJ, *et al*: Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 12: R76, 2010.
37. Siddiqui S and Rimm DL: Pre-analytic variables and phospho-specific antibodies: the Achilles heel of immunohistochemistry. *Breast cancer research : BCR* 12: 113, 2010.

MCF-7			
Concentration			
Trastuzumab ($\times 10^{-6}$ mol/l)	0	5	p-value
p-AKT	1.00 (0.06)	0.95 (0.04)	0.36
p-ERK1/2	1.00 (0.03)	0.96 (0.21)	0.78
p-P70S6K	1.00 (0.05)	0.96 (0.11)	0.63
p-MEK1	1.00 (0.13)	0.85 (0.17)	0.30

SKBR-3			
Concentration			
Trastuzumab ($\times 10^{-6}$ mol/l)	0	5	p-value
p-AKT	1.00 (0.04)	0.32 (0.07)	<0.01
p-ERK1/2	1.00 (0.13)	0.68 (0.09)	0.02
p-P70S6K	1.00 (0.01)	0.83 (0.00)	<0.01
p-MEK1	1.00 (0.12)	0.68 (0.07)	0.02

Results expressed as mean (standard deviation)

Table I: Expression level of phosphoprotein in HER2-positive SKBR3, and HER2-negative MCF-7, cell lines

	Before treatment	After treatment	p-value
p-AKT	1.00 (1.13)	0.89 (1.77)	0.77
p-P70S6K	1.00(0.24)	0.92 (0.15)	0.16
p-MEK1	1.00 (0.62)	0.98 (0.70)	0.92
p-ERK1/2	1.00 (0.83)	1.00 (0.69)	0.99

Results expressed as mean (standard deviation)

Table II: Expression level of phosphoproteins in patients before and after treatment with trastuzumab.

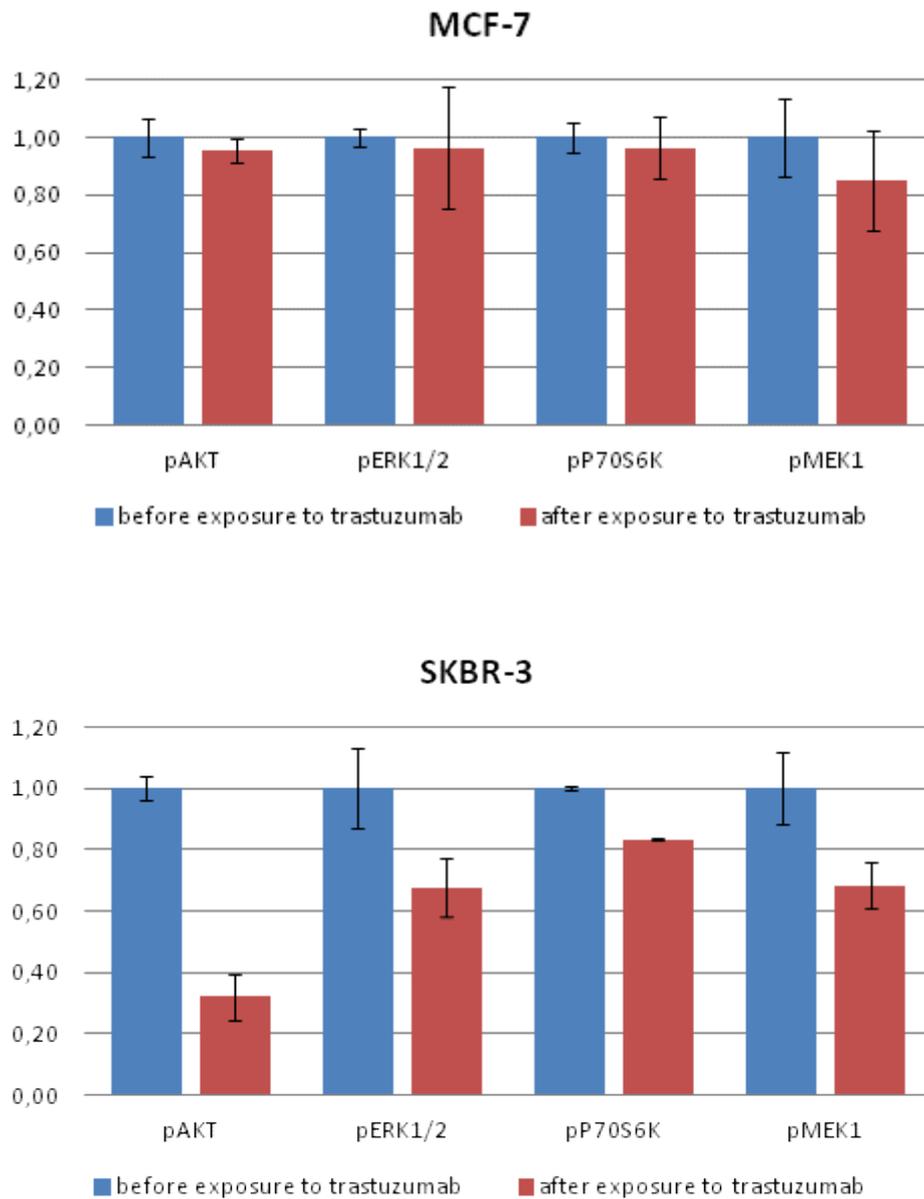


Figure 1: Histogram represents the mean with error bar corresponding to the standard deviation **A:** Expression level of phosphoprotein in HER2-negative MCF-7 cell lines before exposure to trastuzumab (in blue), and after exposure to trastuzumab (in red). **B:** Expression level of phosphoprotein in HER2-positive SKBR3 cell lines before exposure to trastuzumab (in blue), and after exposure to trastuzumab (in red).

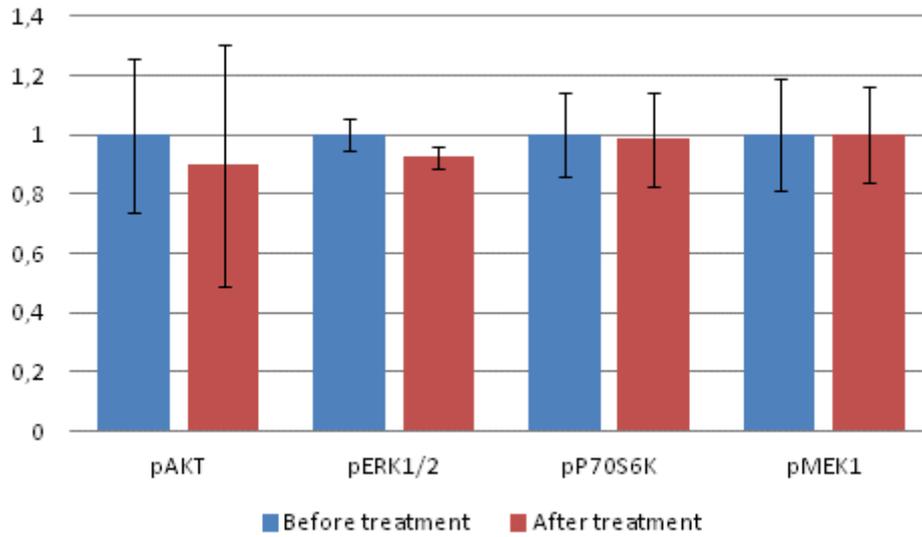


Figure 2: Expression level of phosphoprotein in the clinical specimens of invasive breast cancers before (in blue) and after treatment (in red) by Trastuzumab. Histogram represents the mean with error bar corresponding to the standard error of mean.

Chapitre IV
Discussion Générale

IV. Discussion Générale

Grâce aux progrès de la biologie moléculaire et au développement de techniques de détection innovantes, plusieurs biomarqueurs de réponse aux traitements ont été validés ces dernières années. C'est le cas de la surexpression de HER2 pour le traitement par trastuzumab, pertuzumab et trastuzumab-emtansine ou du statut hormonal pour le traitement par anti-œstrogènes ou inhibiteurs de l'aromatase dans les cancers du sein ou encore, entre autres, du statut mutationnel des gènes *NRAS* et *KRAS* pour la prescription du cetuximab et du panitumumab dans les cancers colorectaux métastatiques et des mutations *BRAF* V600 pour la prescription du vemurafénib pour le traitement du mélanome métastatique.

Malgré ces découvertes qui ont amélioré de façon significative la prise en charge des patients et l'efficacité des traitements, le nombre de biomarqueurs validés et utilisés en routine reste actuellement très insuffisant.

C'est le cas notamment des cancers du sein. Le cancer du sein étant de plus très hétérogène, il est nécessaire d'identifier de nouveaux biomarqueurs afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent le comportement des différents sous types de tumeurs et d'adapter les traitements en conséquence.

L'identification de nouveaux biomarqueurs tumoraux est un des principaux objectifs de la recherche translationnelle. Cette recherche assure le lien entre la recherche fondamentale et la recherche clinique et permet d'accélérer l'accessibilité des patients à des molécules et des technologies innovantes. Elle permet une application plus rapide des découvertes biologiques en clinique.

C'est dans ce sens que nous avons étudié tout au long de cette thèse plusieurs biomarqueurs tels que le statut mutationnel du gène *PIK3CA* ou encore le niveau d'expression des différentes phosphoprotéines des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase, ces biomarqueurs pouvant être potentiellement intéressants pour prédire la réponse aux thérapies ciblées.

Ce travail de thèse met en évidence la complexité de cette tâche et montre les nombreux paramètres à prendre en considération pour comprendre les mécanismes qui régissent la réponse aux traitements.

Concernant la première partie de ce travail, les techniques de détection utilisées étaient 2 techniques de PCR temps réel : la PCR-HRM qui est une PCR de fusion haute résolution et la PCR-ARMS qui est une PCR spécifique d'allèle. Ces 2 techniques présentent des sensibilités différentes, ce qui peut avoir un impact sur les résultats. La PCR-ARMS est plus sensible mais utilise des amorces spécifiques des 4 principales mutations du gène *PIK3CA*, ce qui permet de détecter uniquement les mutations E545K, E542K, H1047R et H1047L (211) alors que la PCR HRM n'est pas spécifique d'une mutation particulière et permet l'analyse des mutations d'un exon complet.

La sélectivité de la technique de PCR-ARMS pourrait donc être un inconvénient dans le cas où d'autres mutations que les 4 recherchées se révélaient être de mauvais pronostic ou discriminantes pour le choix d'un traitement de thérapie ciblée. D'après la base COSMIC, 10% des mutations du gène *PIK3CA* se situent en dehors des 4 hotspots précédemment décrits (6).

Par ailleurs, la détection de biomarqueurs, que ce soit par des techniques de PCR pour la détection des mutations du gène *PIK3CA* ou par la technique BPA pour l'exploration de la fonctionnalité des voies de signalisation, est conditionnée par la qualité des prélèvements. Quelles que soient les techniques utilisées et leurs sensibilités de détection, il est capital de contrôler toutes les étapes de la phase pré-analytique pour obtenir des résultats fiables, car la phase pré-analytique constitue la plus grande source de biais dans les résultats. L'accréditation obligatoire des laboratoires selon la norme ISO 15189 a permis de normaliser et d'homogénéiser les pratiques cependant certains paramètres restent encore difficiles à contrôler, surtout en ce qui concerne les analyses de biologie moléculaire.

Ainsi, lors du traitement pré-analytique des échantillons, la préservation du contenu moléculaire est fondamentale pour assurer la qualité des analyses. Cette qualité dépend à la fois du délai avant préservation de l'échantillon mais également du mode de préservation.

Le délai de fixation, le temps de fixation, le type de fixateur utilisé, la température de la paraffine pour les échantillons inclus en paraffine, le délais avant congélation pour les échantillons congelés, le temps d'ischémie chaude (temps entre le début de l'intervention chirurgicale et la ligature des derniers vaisseaux) et le temps d'ischémie froide (temps entre la ligature des derniers vaisseaux et l'arrivée de la pièce au laboratoire d'anatomopathologie) sont autant de paramètres pouvant influencer la qualité des analyses

de biologie moléculaire. Ils peuvent notamment être responsables d'une fragmentation des ADN et d'une dégradation des ARN messagers et des phosphoprotéines (212). Les ARN et les phosphoprotéines sont particulièrement sensibles et rapidement dégradés. Il est donc important de standardiser la phase pré-analytique pour la qualité des prélèvements. Il faut également s'assurer qu'il y ait assez de matériel tumoral au sein de l'échantillon pour pouvoir réaliser l'analyse.

Lors de la détection du statut mutationnel du gène *PIK3CA*, les problèmes d'ininterprétabilité de certains échantillons étaient probablement dus à la présence d'un ADN de mauvaise qualité, dégradé pendant la phase pré-analytique.

Concernant l'analyse par la technique BPA, la maîtrise du temps avant congélation est capitale si l'on veut détecter une expression des phosphoprotéines représentative de la tumeur car les phosphoprotéines sont rapidement dégradées à température ambiante. Elles sont de plus très sensibles aux phosphatases. Il est cependant difficile de prévenir la déphosphorylation de ces marqueurs car la dégradation est variable en fonction du type de tumeur, du tissu mais également d'une phosphoprotéine à l'autre (213, 214). Ce paramètre reste donc très difficile à maîtriser. L'expression des phosphoprotéines peut être influencée par de nombreux autres mécanismes cellulaires (215). Une dégradation des phosphoprotéines due au stress cellulaire au moment de la chirurgie a notamment été mise en évidence suite à la détection d'une augmentation de HSP70 (Heat Shock Protein 70) qui est un marqueur de réponse au stress cellulaire (215).

Au cours de notre analyse nous n'avons pas tracé les temps d'ischémie froide et chaude ce qui pourrait entraîner un biais dans nos résultats.

Par ailleurs, nous n'avons pas utilisé de témoin interne mais une moyenne des valeurs des échantillons pour déterminer une expression de base.

Il faut également noter que l'évaluation du pourcentage de cellules tumorales reste difficile et peu reproductible ce qui peut également biaiser les résultats. Cette technique a donc pour avantage de permettre l'analyse simultanée de plusieurs biomarqueurs mais les différentes étapes de la phase pré-analytique ne sont pas toutes maîtrisées dans cette étude.

De plus, l'analyse étant réalisée à partir d'un lysat tumoral, cela ne permet pas d'avoir d'information sur la localisation subcellulaire des biomarqueurs, ce qui représente une des limites de la technique.

Nous pourrions également envisager l'utilisation du fixateur RCL2[®] qui permet une meilleure conservation des protéines et assure une meilleure fiabilité des résultats (A. Harlé, résultats non publiés).

Malgré ces problèmes de traitements des échantillons lors de la phase pré-analytique, la quantification des phosphoprotéines est intéressante pour évaluer l'activation des voies de signalisation et pourrait permettre l'identification de potentiels biomarqueurs pronostiques ou prédictifs. Des études ont d'ailleurs montré qu'une augmentation de la phosphorylation de 4EBP1 associée à une augmentation de p-AKT était un marqueur de mauvais pronostic dans les cancers bronchiques (216). D'autres études ont mis en évidence que la présence de l'EGFR ou de HER2 à l'état phosphorylé était un marqueur prédictif de la réponse au traitement par trastuzumab et de la PFS chez les patientes présentant un cancer du sein métastatique (217). Pour finir, des études ont détecté une diminution du niveau d'expression des phosphoprotéines p-EGFR ET p-MAPK après traitement par erlotinib dans les cancers bronchiques. Le niveau d'expression des phosphoprotéines pourrait donc être un indicateur de l'efficacité des traitements (215, 218).

Cependant, à travers ce travail nous avons mis en évidence la difficulté de prédire l'impact réel des thérapies ciblées sur les voies de signalisation. Les voies de signalisation ne fonctionnent pas de façon linéaire mais sont interconnectées à de nombreux endroits. Elles ont ainsi la capacité de se réguler mutuellement grâce à des mécanismes compensatoires. Ainsi, la voie PI3K/AKT/mTOR ne régule pas uniquement la signalisation en aval mais module l'activation de nombreuses autres voies dont la voie RAS/RAF/MAPKinases. Ces 2 voies présentent de multiples points de convergence et sont notamment connectées au niveau de la protéine RAS. Le contexte cellulaire qui conditionne l'activation de RAS par PI3K ainsi que les conséquences biologiques de cette activation ne sont cependant pas encore totalement élucidés (206).

Il existe également une boucle de rétrocontrôle « *negative feedback loop* » impliquant S6K-IRS1-PI3K et RAS.

Cette boucle permet la régulation de la voie RAS/RAF/MAPK via la voie PI3K/AKT/mTOR et est inhibée par les inhibiteurs de mTOR comme vu précédemment dans l'étude RADHER. Ce mécanisme pourrait expliquer l'apparition de résistance au traitement (37, 219).

Un *cross-talk* entre AKT et RAF a par ailleurs été mis en évidence. AKT phosphoryle CRAF et BRAF et régule ainsi négativement la voie RAF/MEK/ERK (220, 221). AKT phosphoryle aussi et régule négativement ASK1 (apoptosis signal regulatory Kinase 1) entraînant l'inhibition de l'apoptose (222).

PI3K régule quant à elle également la voie de signalisation JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (223). De son côté, PTEN a la capacité d'inhiber RAS via la déphosphorylation de FAK (Focal Adhesion Kinase) et SHC entraînant ainsi la régulation négative en aval des MAPKinases (224).

Des études ont également mis en évidence que le complexe TSC était régulé par les MAPKinases à 2 niveaux. D'une part P90RSK phosphoryle et inhibe TSC2 entraînant l'activation de mTORC1 et d'autre part ERK peut phosphoryler directement TSC2 (225, 226) (**Figure 20**). Les quelques interactions que nous venons de citer sont loin de constituer une liste exhaustive des mécanismes qui lient les voies entre elles mais donnent cependant un aperçu de la complexité des mécanismes mis en jeu, qui conditionnent la réponse au traitement. Ces observations soulignent l'intérêt d'utiliser des thérapeutiques de façon combinée dans le but d'agir à différents niveaux des voies et obtenir un blocage complet de la transduction du signal. L'association des thérapies ciblées est une des pistes à étudier pour contourner la résistance à certains traitements.

Les mécanismes à l'origine de l'apparition des résistances sont complexes. Ils nécessitent une approche multiparamétrique et une modélisation des réseaux de signalisation prenant en compte les interactions entre les voies.

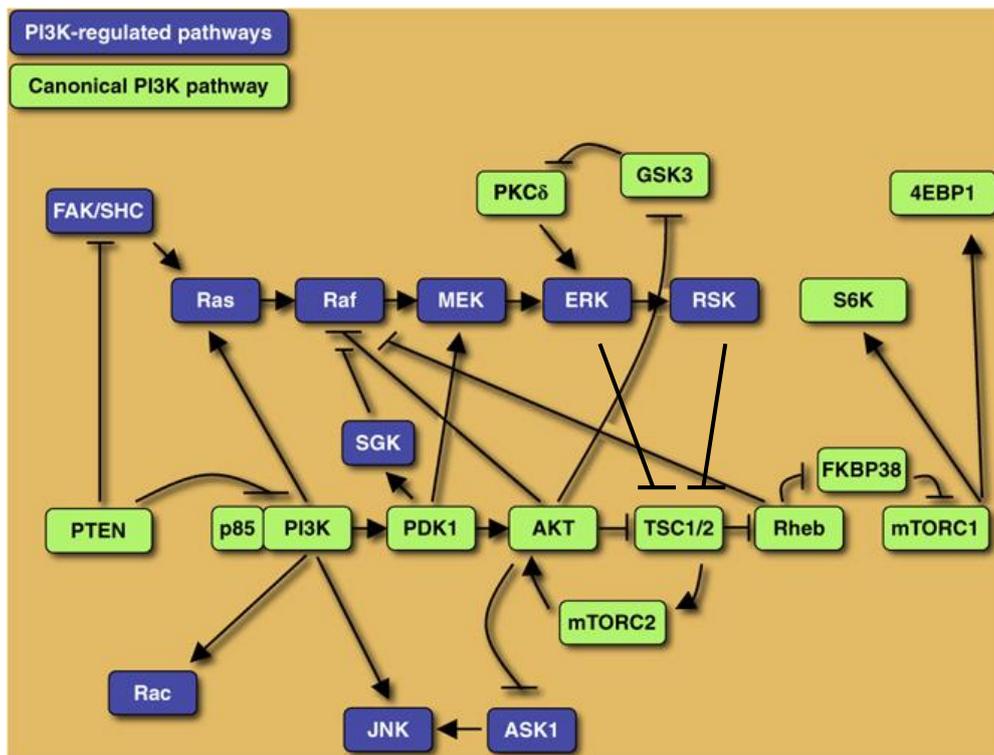


Figure 20: Interactions entre les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinases.

Les 2 voies présentent de multiples points de convergence, se régulent mutuellement mais régulent également d'autres voies de signalisation. Modifié d'après Carracedo A. *et al.* (206).

Parallèlement au manque de connaissances concernant les mécanismes qui contrôlent la régulation des voies de signalisation, nous avons également encore une connaissance incomplète des mécanismes d'action mis en jeu par les thérapies ciblées comme nous avons pu le constater avec le trastuzumab. Ainsi, le mécanisme d'action mis en jeu et la réponse au traitement sont également conditionnés par les conditions cellulaires, la situation clinique, le protocole d'administration mais également par la dose administrée comme l'ont démontré certaines études (192, 205).

A tous ces problèmes inhérents à la maîtrise des étapes de la phase pré-analytique, et à la compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent la réponse aux traitements viennent s'ajouter les problèmes liés à l'hétérogénéité des tumeurs.

La prise en charge des cancers du sein est complexe de par la grande hétérogénéité des cancers du sein que ce soit sur le plan histologique, morphologique ou moléculaire.

L'établissement d'une classification moléculaire depuis le début des années 2000 à partir des profils d'expression génique a permis de mettre en évidence que les tumeurs se comportaient biologiquement différemment et d'identifier des biomarqueurs d'intérêt et d'adapter les traitements en fonction des caractéristiques moléculaires des tumeurs.

Des sous-types moléculaires ont été ainsi établis mais cette classification nécessite encore d'être affinée.

On observe également une hétérogénéité au niveau de la répartition des cellules tumorales et du stroma au sein des échantillons, ce qui ne nous permet pas de savoir si la zone biopsiée est représentative de la tumeur ou si elle contient d'avantage de stroma que de cellules tumorales ou inversement. Ceci peut également faire varier les résultats des analyses.

Il a par ailleurs été mis en évidence que le microenvironnement stromal jouait un rôle dans le développement et la progression cellulaire tumorale (227-229). Le rapport tumeur/stroma aurait une valeur pronostic dans certains types de cancers du sein (230, 231) et l'hétérogénéité morphologique intratumorale aurait une influence sur l'efficacité des traitements en situation néoadjuvante. Certains profils d'expression génique du stroma seraient prédictifs de la résistance à certains traitements (232, 233).

Un autre problème réside dans le fait que les biomarqueurs sont modifiés au cours du temps, en fonction des traitements et sont également différents en fonction du site tumoral. Une différence du niveau d'expression des phosphoprotéines p-AKT et p-ERK analysées en IHC a notamment été mise en évidence entre la tumeur primitive et les métastases dans les cancers colorectaux (234). D'autres études ont, quant à elles, mis en évidence une augmentation des mutations du gène *PIK3CA* après traitement par paclitaxel ou des mutations *MED1* (Mediator complex subunit 1) suite au traitement par trastuzumab ou lapatinib dans les cancers du sein (235).

Ces constatations amènent à se poser certaines questions: Comment réévaluer les biomarqueurs au cours du traitement ? Faut-il rebiopsier? Problème éthique vis à vis des patients ? Quel site doit-on biopsier? Car du fait de l'hétérogénéité intratumorale et de la modification des biomarqueurs en fonction du traitement, l'analyse de la tumeur primitive est probablement insuffisante pour avoir une expression de biomarqueurs représentative de la tumeur.

Il existe donc une hétérogénéité à la fois spatiale et temporelle. Selon le modèle Darwinien de développement d'un cancer, il existe des sous populations différents par leurs altérations génétiques au sein d'une même tumeur. Les cancers auraient une expansion clonale et seraient un ensemble théorique de plusieurs populations en voie de transformation ou déjà transformées par un processus continu de mutations et de sélection donnant naissance à des populations génétiques distinctes (**Figure 21**) (236).

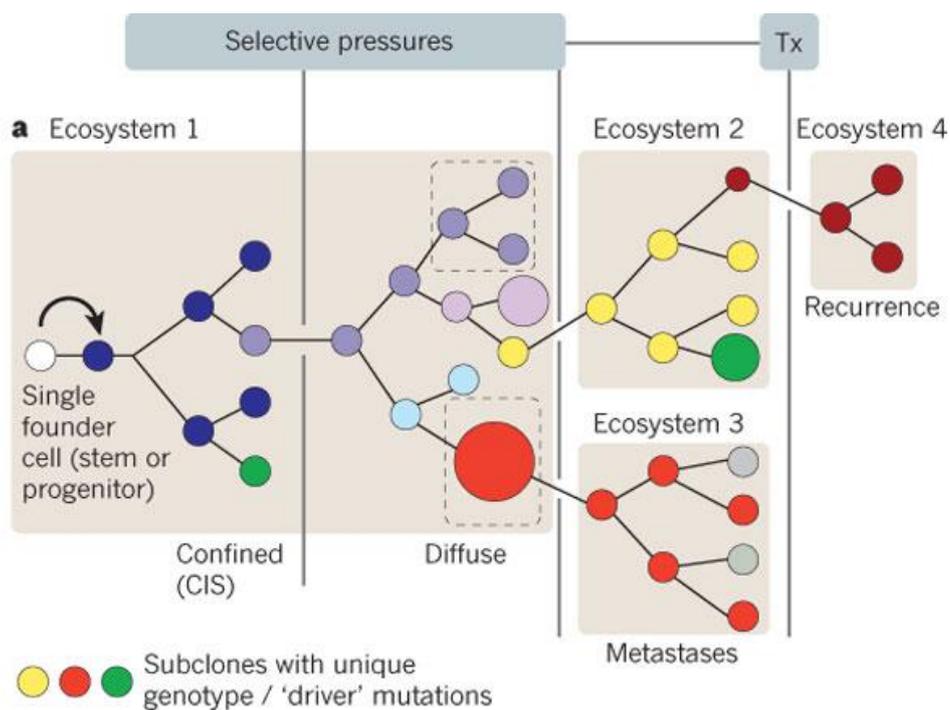


Figure 21: Expansion clonale des cancers selon le modèle Darwinien.

Une même tumeur est constituée de sous populations différents par leurs altérations génétiques (TX: traitement). D'après Greaves M. *et al.* (237).

Des études ont par exemple mis en évidence une hétérogénéité intratumorale dans des tumeurs HER2+ due à la présence de sous clones HER2+ mais également de sous clones HER2- au sein desquels ont été retrouvées des mutations dites "*driver*", telles que des mutations activatrices du gène HER2 ou encore des amplifications de PI3K. La présence de ces mutations dans les sous-populations HER2- pourrait être une des causes de la résistance au traitement par trastuzumab (238).

Cet exemple illustre bien la complexité d'adapter les traitements face à cette hétérogénéité tumorale.

L'hétérogénéité intratumorale pourrait également être due à la présence de cellules souches cancéreuses capable de donner naissance à différents types cellulaires contribuant à l'hétérogénéité au sein d'une même tumeur (239).

Les progrès de la génomique, et l'apparition de techniques de séquençage ultraperformantes type NGS (*Next Generation Sequencing*) ont permis l'identification de millions de mutations somatiques, de modifications épi-génétiques dans les cellules cancéreuses et ont confirmé la présence d'une très grande hétérogénéité intratumorale (240). Ces techniques qui permettent de séquencer le génome humain sont sensibles et permettent l'analyse d'un grand nombre d'échantillons en parallèle. Elles ont mis en évidence que le nombre de mutations retrouvées dans les cancers était très variable et pouvait aller d'une vingtaine à plusieurs centaines de milliers. Le véritable challenge réside dans l'interprétation de ces mutations et dans la distinction des mutations dites "*driver*", jouant un rôle dans le développement tumoral, des mutations "*passengers*" (237). La question est de savoir quelle est la signification clinique de l'hétérogénéité intratumorale.

Les mutations ou anomalies retrouvées sont-elles toutes fonctionnellement et cliniquement significatives? Lesquelles pourront faire l'objet d'un ciblage efficace? Une mutation "*passenger*" peut-elle devenir une mutation "*driver*"?

L'hétérogénéité intratumorale joue probablement un rôle majeur dans l'apparition de résistances aux traitements car actuellement le profil moléculaire de la tumeur est défini en se basant sur l'analyse d'une seule biopsie, ce qui revient finalement à donner un traitement adapté à un seul sous-clone.

L'hétérogénéité évoluant au cours des traitements, les techniques de séquençage pourraient permettre de suivre l'évolution des profils d'expression génique au cours des traitements et permettraient d'identifier l'émergence de résistance.

Cependant, actuellement toute analyse nécessite au préalable la réalisation d'une biopsie ou d'une exérèse chirurgicale de la tumeur primitive ou d'une métastase. Ce qui n'est pas un geste anodin. La réalisation d'une biopsie est un geste douloureux et invasif qui ne permet pas de renouveler les prélèvements au cours des traitements. Il existe de plus des contraintes liées à l'accessibilité du site à biopsier.

Ainsi pour contourner ces problèmes, depuis quelques années est apparu le concept de biopsie liquide. Ce concept consiste à isoler de l'ADN relargué par la tumeur dans la circulation sanguine et donc à détecter les mutations somatiques à partir d'un simple prélèvement sanguin.

Lors de la croissance tumorale, certaines cellules meurent et relarguent leur contenu dans la circulation sanguine (241, 242). Le plasma contient alors une représentation de l'ensemble du génome de la tumeur et donc les mêmes altérations géniques et épigéniques que la tumeur dont il provient (243, 244). Toutes les mutations sont retrouvées que ce soit celles des métastases ou celles de la tumeur primitive. Ce concept moins invasif, beaucoup moins douloureux et moins contraignant pour les patients, permettrait de multiplier les analyses. L'ADN tumoral circulant est donc un potentiel futur biomarqueur de choix pour le diagnostic et pour la réponse au traitement.

Plusieurs études ont déjà mis en évidence que l'analyse quantitative de l'ADN tumoral circulant permettait un monitoring de la maladie (245, 246). Il existe de plus une meilleure corrélation entre les variations du volume tumoral et le taux d'ADN tumoral circulant qu'avec le marqueur CA 15.3 ou les cellules tumorales circulantes dans les cancers du sein. L'augmentation du nombre de copie d'ADN tumoral serait donc un marqueur précoce de progression tumorale et permettrait d'évaluer l'efficacité des traitements (245).

La détection des mutations à partir d'ADN tumoral circulant permet de pallier les problèmes d'hétérogénéité par détection des mutations rares dans les sous-clones mineurs ou dans des sous clones issus de différents sites métastatiques qui pourraient ne pas être identifiés par séquençage à partir d'une biopsie conventionnelle d'un site tumoral unique (247).

En revanche cette technique de détection ne permet pas de savoir à quels sites appartiennent les mutations détectées. De plus, certains tissus relarguent d'avantage que d'autres ce qui pourrait poser des problèmes pour le diagnostic (247).

Cette technique pourrait cependant permettre la caractérisation moléculaire des tumeurs, mais également de suivre l'évolution des variations génomiques du cancer en réponse aux thérapies ciblées et d'adapter le traitement de manière continue (235). De nombreuses techniques telles que le Beaming, la digitale PCR ou encore la droplet digital PCR ont été développées mais leur faisabilité en routine reste encore à démontrer (**Annexe 1**).

Chapitre V

Conclusion

V. Conclusion

Les thérapies ciblées que ce soit les anticorps monoclonaux ou les inhibiteurs de kinase, ont considérablement amélioré la prise en charge des cancers. Le ciblage thérapeutique est devenu la clef de la prise en charge en cancérologie. Cependant, malgré ces progrès, on observe souvent l'apparition de résistances. La compréhension des mécanismes à l'origine des résistances est primordiale pour améliorer l'efficacité des traitements. L'un des enjeux actuels de la recherche translationnelle est de trouver des solutions pour contourner cette résistance.

A travers ce travail qui a consisté en l'étude de potentiels biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements, nous avons mis en évidence l'importance de l'implication des voies de signalisation dans la cancérogenèse mammaire et la complexité des mécanismes mis en jeu.

La détermination du statut mutationnel du gène *PIK3CA* et du niveau d'expression des phosphoprotéines pourrait être intéressante pour affiner la caractérisation moléculaire des tumeurs et optimiser les critères utiles à la personnalisation des prescriptions afin d'améliorer l'efficacité des traitements.

Cependant, cette étude, ainsi que les travaux précédemment publiés, ne permettent pas de déterminer précisément le rôle de ces biomarqueurs dans l'oncogenèse mammaire. Il reste nécessaire d'approfondir les investigations concernant les multiples mécanismes moléculaires impliqués dans le développement tumoral et notamment les mécanismes de régulation qui existent entre les différentes voies de signalisation.

Les voies PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase restent des cibles prometteuses pour de nouvelles thérapeutiques dans le traitement du cancer du sein. De nombreux inhibiteurs ciblant ces voies sont actuellement à l'étude, notamment des inhibiteurs de PI3K, des inhibiteurs de mTOR ou encore des inhibiteurs de P38MAPKinase.

La mise en évidence des multiples points de convergence entre les voies de signalisation et de leur capacité à se réguler mutuellement oriente actuellement les recherches vers l'évaluation de combinaisons d'inhibiteurs multikinase « dirty drugs » qui pourraient permettre un blocage complet des voies et éviter l'émergence de résistance.

La résistance au traitement est multifactorielle, ainsi les caractéristiques morphologiques, histologiques, moléculaires de la tumeur mais également, la présence de molécules co-administrées, la dose administrée, le microenvironnement de la tumeur et le moment de l'administration sont autant de facteurs à prendre en considération s'il on veut comprendre les mécanismes à l'origine des résistances et réussir à les contourner. Voici autant de paramètres qui rendent la détection de biomarqueurs d'intérêt et leur utilisation en clinique complexes et qui justifient une pluridisciplinarité des équipes de recherche pour mener à bien les investigations.

Annexe

ADN tumoral circulant

11

M. Lion, A. Harlé, J.-L. Merlin

En oncologie, la recherche de mutations somatiques à visée théranostique est devenue la règle pour la prescription de certaines thérapies ciblées. Dans le cas du cancer colorectal, la recherche des mutations des gènes *RAS* est devenue essentielle pour la décision thérapeutique, le statut *RAS* sauvage étant nécessaire pour assurer l'efficacité des anti-EGFR (cetuximab et panitumumab) [1, 2]. De même, le géfitinib ne peut être prescrit qu'aux patients présentant une mutation activatrice de l'EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules [3]. La mise en évidence de nouveaux biomarqueurs joue un rôle important dans l'évaluation de la réponse aux traitements expliquant la place de plus en plus importante qu'occupe la biologie moléculaire en oncologie. La caractérisation moléculaire des tumeurs permet de prédire l'efficacité des thérapies ciblées. D'où la nécessité de développer des techniques de détection de plus en plus sensibles, rapides et performantes, l'objectif actuel étant de fournir une thérapeutique la plus personnalisée possible, adaptée à chaque type de tumeur et à chaque patient.

Actuellement, toute recherche de mutation somatique nécessite au préalable la réalisation d'une biopsie ou d'une exérèse chirurgicale d'une métastase ou de la tumeur primitive. Le matériel prélevé est ensuite fixé, conformément aux recommandations de l'INCa [4] dans du formol tamponné ou plus rarement dans d'autres fixateurs comme l'AFA (acide acétique, formol et alcool) puis inclus en paraffine. Outre les problèmes liés au pré-analytique (temps d'ischémie chaude et froide, fixation des tissus...) [5], la réalisation de biopsie présente parfois certains inconvénients, notamment les contraintes liées à l'accessibilité du site à biopsier mais surtout relatives à l'invasivité et à la douleur que peut provoquer ce geste médical. De plus, il est considéré comme non éthique et, pour le moment, non scientifiquement fondé de pratiquer une seconde biopsie chez un patient pour lequel un premier résultat contributif

M. Lion, A. Harlé, J.-L. Merlin (✉) Institut de cancérologie de Lorraine, service de biopathologie, 6, avenue de Bourgogne, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy – E-mail : m.lion@nancy.unicancer.fr

Sous la direction de Jean-Louis Merlin, *Les biomarqueurs moléculaires en oncologie*
ISBN : 978-2-8178-0444-6, © Springer-Verlag Paris, 2014

aurait été obtenu. Ces différents points justifient l'intérêt de développer des techniques innovantes pouvant apporter les mêmes informations que les techniques de biopsies conventionnelles, moins invasives, moins douloureuses et moins contraignantes pour le patient.

Lors de la croissance tumorale, certaines cellules tumorales meurent et relarguent leur contenu dans la circulation sanguine [6, 7]. Il a été mis en évidence que le plasma contenait une représentation de l'ensemble du génome de la tumeur et donc les mêmes altérations géniques et épigéniques que la tumeur dont il provient [8, 9].

Le concept de « biopsie liquide » a ainsi été développé. Ce concept consiste à isoler de l'ADN relargué par la tumeur dans les systèmes fluides (sang, sécrétions, urine...) et de détecter les mutations somatiques [9, 10]. Le développement de cette technique assurerait ainsi un meilleur confort au patient et serait donc plus facile à mettre en œuvre. L'ADN tumoral circulant pourrait devenir un biomarqueur de choix dans le diagnostic, le suivi mais également dans la théranostique des cancers.

Dans ce contexte, un certain nombre de techniques permettant la détection d'ADN en très faible quantité dans le sang ont été développées. Ces techniques doivent être simples à mettre en œuvre, reproductibles, peu coûteuses mais surtout très sensibles et spécifiques. La principale difficulté rencontrée avec cette méthode est la quantité faible d'ADN tumoral circulant pouvant être isolée et détectée dans le sang [10, 11]. Elle représente une quantité infime de l'ADN total circulant [11, 12], ce qui nécessite des techniques très spécifiques de détection.

Plusieurs études ont montré que la mesure quantitative de l'ADN tumoral permettrait un monitoring de la maladie métastatique [8, 10, 13, 14]. Par exemple, dans les cancers du sein, il apparaît que la corrélation entre les variations du volume tumoral et le taux d'ADN tumoral circulant est meilleure qu'avec d'autres marqueurs tels que les cellules tumorales circulantes ou le marqueur sanguin CA15-3. La spécificité serait donc supérieure pour le diagnostic et le suivi de la maladie, notamment en termes de progression tumorale ou métastatique dans les cancers du sein [10, 13]. L'augmentation du nombre de copies d'ADN tumoral circulant serait donc un marqueur plus précoce que les éléments obtenus en radiologie standard, capable de prédire des rechutes cinq mois plus tôt [10, 13]. L'augmentation du nombre de copies d'ADN tumoral circulant apparaît donc comme un facteur de mauvais pronostic et posséderait un impact sur la survie globale. L'évaluation régulière du nombre de copies permettrait donc un monitoring de l'efficacité des thérapies anticancéreuses, qu'elles soient standards ou ciblées. L'essor du séquençage haut débit a permis de développer nos connaissances, de confirmer la complexité de l'hétérogénéité intratumorale et de montrer qu'il existe de manière très vraisemblable des différences entre les tumeurs primitives et les métastases à distance mais également entre les différents sites métastatiques [14, 15]. Il a été mis en évidence que différents sous-clones

tumoraux issus de la même tumeur pouvaient acquérir des mutations différentes [16]. La détection de mutations à partir d'ADN tumoral circulant permet donc de pallier les problèmes d'hétérogénéité tumorale par détection des mutations rares dans les sous-clones mineurs, ou dans des sous-clones de différents sites métastatiques, qui pourraient ne pas être identifiés par séquençage à partir d'une biopsie conventionnelle réalisée à partir d'un site tumoral unique [16]. Il n'est en revanche pas possible pour le moment de savoir à quel site appartiennent les mutations détectées sur de l'ADN tumoral circulant (tumeur primitive, métastase...). De plus, il apparaît que certains sites tumoraux relarguent plus de cellules que d'autres. Les tissus osseux par exemple relarguent plus de cellules comparativement au tissu cérébral, ce qui peut également ajouter des difficultés au diagnostic et à la détection de mutations dans certaines tumeurs [16].

Les études réalisées sur ADN tumoral circulant ont été effectuées à différents stades de la maladie afin d'établir une corrélation entre les mutations identifiées, la taille de la tumeur et le stade de la maladie [8, 9].

Des études ont mis en évidence la concordance des mutations détectées par prise de sang et à partir de la biopsie de la tumeur primitive [8, 9]. La mise en évidence de la concordance entre mutations trouvées par prélèvement sanguin et biopsie solide nécessite de réaliser les prélèvements en même temps en raison de l'évolution des caractéristiques moléculaires de la tumeur au cours de la maladie [9]. La prise de sang doit être de plus réalisée avant la biopsie pour éviter les phénomènes de relargage qui pourraient biaiser les résultats obtenus.

La « biopsie liquide » apparaît donc comme le nouveau paradigme pour la caractérisation et le diagnostic moléculaire de la tumeur au cours du traitement et la mise en évidence de résistances. Une pression de sélection associée à certains traitements et conférant une résistance a en effet été démontrée [16]. La détection et la recherche de mutation sur ADN tumoral circulant seraient donc essentielles dans l'évaluation de la réponse au traitement mais également permettraient l'adaptation des traitements en fonction de l'apparition des résistances [17]. Il a notamment été mis en évidence une augmentation des mutations du gène *PIK3CA* après traitement par paclitaxel, des mutations *MED1* induit par tamoxifène et trastuzumab puis par lapatinib dans le cancer du sein, ou encore des mutations *RBI* après traitement par cisplatine dans les cancers de l'ovaire, ainsi que des mutations de *EGFR* après traitement par géfitinib. Le suivi moléculaire par biopsie liquide permettrait donc de suivre l'évolution des variations génomiques du cancer en réponse aux thérapies [10, 17].

La mise en place de ce type d'analyse en routine serait donc une avancée majeure dans le domaine du diagnostic moléculaire en oncologie. Cependant, cela nécessite au préalable une standardisation des techniques afin d'assurer des résultats de qualité et comparables entre laboratoires (procédures sur les conditions de collecte de sang, le traitement du plasma ou du sérum, le stockage, la conservation, les conditions cliniques, les variations diurnes, etc.) [18].

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses techniques de diagnostic moléculaire ultrasensibles destinées à l'analyse de l'ADN tumoral circulant ont fait leur apparition sur le marché, parmi lesquelles nous pouvons citer la digital PCR, la droplet digital PCR (BioRad®, Marnes-la-Coquette, France), le beaming (Sysmex®, Kobe, Japan), la raindrop digital PCR (RainDance®, Billerica, États-Unis) et la méthode Intplex (INSERM, Montpellier, France). Toutes ces technologies permettent la détection et l'énumération de variations génétiques à partir d'ADN tumoral circulant (Tableau I).

- **Le beaming** (*beads, emulsion, amplification and magnetics*) (Sysmex®) est une technique réalisée en quatre étapes : pré-amplification, PCR en émulsion, hybridation et cytométrie de flux. Il s'agit d'une technique de PCR sur molécule d'ADN fixée sur bille magnétique sur lesquelles se trouvent les amorces spécifiques du gène d'intérêt. La PCR est réalisée sur les billes en émulsion. Des sondes fluorescentes marquées spécifiques de la séquence sauvage ou de la mutation sont ensuite ajoutées et s'hybrident à l'ADN amplifié. La dernière étape de la technique consiste en la détection de la fluorescence par cytométrie de flux et donc en la quantification du nombre de billes contenant de l'ADN muté. Le seuil de détection d'ADN circulant est de 0,01 % [7, 11, 16, 19-21].
- **La digital PCR** est une approche offrant une plus grande sensibilité et spécificité en comparaison à la PCR temps réel. Elle permet la détection d'un allèle cible à partir d'une faible quantité d'un échantillon en utilisant des quantités de réactifs plus faibles que la PCR conventionnelle. Elle permet la détection d'une copie par population. Cette technique nécessite au préalable l'isolement de molécules d'ADN par répartition de l'échantillon dans de multiples puits selon la méthode de dilution ultime. Une fois chaque molécule d'ADN isolée, une PCR est réalisée dans chaque puits. Chaque puits contient *in fine* une seule molécule d'ADN, c'est-à-dire que chaque puits contient zéro ou une copie de la séquence d'intérêt, d'où l'appellation « digitale » en comparaison à l'aspect binaire de l'approche [22-24].
 Cette technique permet l'identification des portions portant la mutation (positif) et des portions ne portant pas l'anomalie recherchée (négatif). Ainsi, à l'issue des réactions de PCR, le nombre de copies d'un allèle cible correspond au nombre de puits dans lesquels on peut détecter un signal de fluorescence.
 L'étude du rapport négatif/positif permet également de déterminer un nombre de copies d'ADN mutés, sans avoir recours à des contrôles internes [22-24].
- **La droplet digital PCR.** L'échantillon à analyser est émulsionné et réparti dans 20 000 gouttelettes contenant la cible d'intérêt et l'ADN non muté, distribués au hasard dans les gouttelettes. Ces gouttelettes sont ensuite transférées sur une plaque de 96 puits et l'amplification a lieu à l'aide d'un thermocycleur classique. Après amplification, chaque gouttelette

produit un signal fluorescent positif ou négatif indiquant si la mutation cible est présente ou non. Le nombre de gouttelettes positives et négatives dans chaque puits est utilisé pour calculer la concentration de la séquence d'intérêt. Les gouttelettes positives et négatives sont comptées dans l'échantillon puis un logiciel calcule la concentration d'ADN en copies par mL [25-27].

- **La raindrop digital PCR** (Raindance) est une technique de PCR digitale qui permet la détection d'allèles tumoraux peu fréquents. Il s'agit d'une technique sensible, spécifique qui permet une détection quantitative des mutations. Elle utilise des marqueurs de couleurs et d'intensités différentes permettant la détection de mutations spécifiques. Cette technique génère 1 à 10 millions de gouttelettes de taille de l'ordre du picolitre, ce qui est 500 à 10 000 fois plus performant que les autres techniques. Chaque gouttelette contient une molécule d'ADN. Cette technique mesure le ratio des gouttelettes présentant une mutation spécifique aux gouttelettes ne contenant que de l'ADN sauvage. Quatre-vingt mille réactions de PCR par seconde par gouttelette sont réalisées simultanément. Cette PCR en émulsion fait appel à des sondes Taqman® spécifiques des gènes mutés et non mutés en présence d'amorces et de l'échantillon d'ADN. Les sondes spécifiques sont conjuguées à un fluorophore qui générera un signal fluorescent [28-31].

Cette technique se réalise en trois grandes étapes : mise en émulsion, puis recueil de l'émulsion dans un tube PDMS (polydiméthylsiloxane) scellé (dispositif de collecte et de réinjection), thermocyclage de l'émulsion pour effectuer la PCR, puis dépôt sur un dispositif microfluidique. Au cours de l'amplification, les sondes Taqman® sont clivées et le fluorophore est libéré. L'amplification de l'ADN non muté génère un signal rouge fluorescent et celle de l'ADN muté un signal vert fluorescent. L'émulsion est ensuite réinjectée sur une puce microfluidique et les gouttelettes sont espacées par une solution huileuse, le signal fluorescent de chaque gouttelette est analysé avec calcul du ratio muté/non muté. Une fluorescence jaune est générée par les gouttelettes contenant de l'ADN à la fois muté et non muté, l'absence de fluorescence quant à elle est due à l'absence d'ADN. Cette technique présente de nombreux avantages, notamment une très bonne sensibilité. Elle peut détecter 1 mutant parmi 250 000 molécules de type sauvage avec une limite inférieure de détection de 1 à plus de 1 000 000. C'est une technique en multiplexage qui permet donc de réaliser simultanément l'analyse de 10 mutations [28-31]. La réaction a lieu en tube fermé afin d'assurer la meilleure qualité en éliminant les risques de contamination [28-31].

- **La méthode Intplex** est une Q-PCR spécifique d'allèle qui permet la détection de mutation et la détermination de la concentration d'ADN circulant [6]. Elle utilise un bloqueur spécifique d'allèle qui empêche l'amplification des séquences non mutées. Elle prend en compte la taille

Tableau 1 - Différentes techniques de digital PCR

Fabricant	Technique	Volume de l'échantillon	Nombre d'échantillons	qPCR	Précision	Multiplexage
Bio-Rad	QX200™ Droplet Digital™ PCR System	- 20 µl	- 1-8 échantillons/cartouche - 1-96 échantillons/run - 20 000 gouttelettes par échantillon	Non	+/- 10 %	Oui - Utilisation de 2 couleurs - Détection possibles de 2 mutations
RainDance Technologies	RainDrop™ Digital PCR System	- 5-50 µl	- 8 échantillons par run (5 millions de gouttelettes par minute) - 10 ⁷ gouttelettes par échantillon - 8 x 10 ⁷ gouttelettes par run	Non	Détection : 1 mutant/25 x 10 ⁴ wildtype Limite de détection : 1/10 ⁶	Oui - Utilisation de 2 couleurs (avec possibilité de faire varier la concentration des sondes) - Détection possible de 10 mutations
IRCM	Intplex	- 1 ml de Plasma - 5 µl d'ADN extrait	Plaque 96 puits	Oui	< 0,01 %	Oui - Détection possible de 1 à 10 mutations
Symex	BEAMing	- Echantillon initial de sérum/plasma: 0,5 ml-4 ml	Plaque 96 puits (5 puits contenant chacun 100µl d'émulsion) - Diamètre billes : 1µm - Compartiment de PCR : → diamètre : 3-10 µm → volume : 15-400 fl	Non	< 0,1 %	Oui - Détection possible de 10 mutations
Life technologies	QuantStudio™ 12K Flex System	- Plaque 96 puits : 10-100 µl - Plaque 384 puits : 5-20 µl	Plaque 96 puits : 10-100 µl Plaque 384 puits : 5-20 µl	Oui	< 1 copie	Oui - Utilisation de 2 couleurs - Détection possibles de 2 mutations
Fluidigm Corporation	- Digital PCR Biomark HD 48.770 digital Array IFC - Digital PCR EP1 48.770 Digital Array IFC	- 8 µl d'échantillon minimum	48 entrées par puce	Oui	1 copie/0,85 nl de réaction	Oui - Utilisation de 5 couleurs - Détection possible de 5 mutations

des ADN circulants < 135 pb et compare l'amplification des séquences de même taille et de même région (300 pb). Il s'agit d'un design expérimental permettant une grande sensibilité (0,005 % *mutant to WT ratio*). De plus, il s'agit d'une technique peu chère et rapide, ne durant que 2 jours et qui est environ 3 fois plus rapide que le *beaming* (ou *Fluidigm based methods*). Cette méthode a été testée sur 29 échantillons de plasma de sujets sains et aucune mutation n'a été détectée. Sur les échantillons cliniques de patients, le plus faible taux de mutations des gènes *KRAS* détectées dans le CCRm est de 0,013 %.

Concernant les techniques, les seuils de détection des différentes méthodes utilisées pour analyser les mutations à partir d'ADN extrait de tissu hétérogène sont variables : 10-20 % pour le séquençage directe, 5 à 10 % pour les techniques de PCR et < 10^{-6} pour les techniques de PCR digitale. Ces seuils ont un impact potentiel direct sur le diagnostic moléculaire exprimé de façon qualitative [32].

L'analyse de l'ADN tumoral circulant est un examen en plein essor faisant appel à des techniques sensibles innovantes. Sa détection devrait permettre à court ou moyen terme la mise en place d'un suivi thérapeutique, mais également la mise en évidence de l'apparition de résistances aux traitements ou tout simplement la réponse à une thérapie anticancéreuse. Son rôle prédictif de la récurrence de la maladie est également un point particulièrement intéressant. Les techniques actuellement disponibles sont cependant, pour la plupart, toujours à l'état de recherche et ne sont pas reconnues comme des examens diagnostiques validés. L'étude récente d'une équipe Montpelliéraine a démontré la faisabilité clinique sur 106 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et l'existence d'une corrélation forte entre l'ADN tumoral retrouvé au niveau circulant et le génome tumoral [33]. La faisabilité de ces techniques en routine reste cependant à démontrer.

Références

1. Douillard JY, Olinier KS, Tabernero J, *et al.* (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 369(11):1023-34
2. Stintzing S, Jung A, Rossius L, *et al.* (2013) Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in Fire-3: A Randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as first-line treatment for wild-type (WT) KRAS (exon 2) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. European Cancer Congress, LBA 17.
3. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11(6): 426-37
4. Bonnes pratiques pour la recherche à visée théranostique de mutations somatiques dans les tumeurs solides. *e-cancer*; 2010
5. Hofman V, Ilie M, Gavric-Tanga V, *et al.* (2010) [Role of the surgical pathology laboratory in the pre-analytical approach of molecular biology techniques]. *Ann Pathol* 30(2): 85-93

6. Mouliere F, Thierry AR (2012) The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opin Biol Ther* 2012(12): 18
7. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P (2007) Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res* 635(2-3): 105-17
8. Ramirez JL, Taron M, Balana C, *et al.* (2003) Serum DNA as a tool for cancer patient management. *Rocz Akad Med Bialymst* 48: 34-41
9. Madic J, Piperno-Neumann S, Servois V, *et al.* (2013) Pyrophosphorolysis-activated polymerization detects circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Clin Cancer Res* 18(14): 3934-41
10. Kirk R (2013) Breast cancer: Circulating tumour DNA the better of the blood biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 10(5): 26
11. Benesova L, Belsanova B, Suchanek S, *et al.* (2013) Mutation-based detection and monitoring of cell-free tumor DNA in peripheral blood of cancer patients. *Anal Biochem* 433(2): 227-34
12. Tong YK, Lo YM (2006) Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta* 363(1-2):187-96
13. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, *et al.* (2013) Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 368(13): 1199-209
14. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A (2013) Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 10(8): 472-84
15. De Mattos-Arruda L, Cortes J, Santarpia L, *et al.* (2013) Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 10(7): 377-89
16. Richardson AL, Iglehart JD (2012) BEAMing up personalized medicine: mutation detection in blood. *Clin Cancer Res* 18(12): 3209-11
17. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, *et al.* (2013) Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497(7447): 108-12
18. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR (2013) Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* 424: 222-30
19. Lauring J, Park BH (2011) BEAMing sheds light on drug resistance. *Clin Cancer Res* 17(24): 7508-10
20. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, *et al.* (2013) Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer* 133(2): 346-56
21. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, *et al.* (2012) Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res* 18(12): 3462-9
22. Pohl G, Shih Ie M (2004) Principle and applications of digital PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 4(1): 41-7
23. Vogelstein B, Kinzler KW (1999) Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16): 9236-41
24. Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, *et al.* (2011) Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal Chem* 83(17): 6474-84
25. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, *et al.* (2011) High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83(22): 8604-10
26. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, *et al.* (2011) Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem* 84(2): 1003-11
27. Shuga J, Zeng Y, Novak R, *et al.* (2013) Single molecule quantitation and sequencing of rare translocations using microfluidic nested digital PCR. *Nucleic Acids Res* 41(16):e159
28. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, *et al.* (2011) Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip* 11(13): 2156-66
29. Brouzes E, Medkova M, Savenelli N, *et al.* (2009) Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(34): 14195-200

30. Zhong Q, Bhattacharya S, Kotsopoulos S, *et al.* (2011) Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab Chip* 11(13): 2167-74
31. Taly V, Pekin D, Benhaim L, *et al.* (2013) Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clin Chem* 2013: 12
32. Mouliere F, El Messaoudi S, Gongora C, *et al.* (2013) Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Transl* 6(3): 319-28
33. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, *et al.* (2014) Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* 20(4):430-5.

Bibliographie

Bibliographie

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013 [18/12/2013]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Binder-Foucard F, Bossard N, Delafosse P, Belot A, Woronoff AS, Remontet L. Cancer incidence and mortality in France over the 1980-2012 period: solid tumors. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2014;62(2):95-108.
3. *Les cancers en France en 2013*. Collection Etat des lieux et des connaissances, ouvrage collectif édité par l'INCa, Boulogne-Billancourt. janvier 2014.
4. Robert J. *Signalisation cellulaire et cancer*. Paris, France: Springer-Verlag. 2010.
5. Harle A, Lion M, Lozano N, Husson M, Harter V, Genin P, et al. Analysis of PIK3CA exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: correlation with clinicopathological criteria. *Oncol Rep*. 2013;29(3):1043-52.
6. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res*. 2012;14(1):R28.
7. Liu P, Cheng H, Santiago S, Raeder M, Zhang F, Isabella A, et al. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms. *Nat Med*. 2011;17(9):1116-20.
8. Rexer BN, Chanthaphaychith S, Dahlman K, Arteaga CL. Direct inhibition of PI3K in combination with dual HER2 inhibitors is required for optimal antitumor activity in HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2014;16(1):R9.
9. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65(7):2554-9.
10. Anatomie du sein, cancer du sein, INCa. 2010 [16/09/2013]. Available from: <http://www.e-cancer.fr>.
11. *Les traitements des cancers du sein*. Collection Guides patients Cancer info, INCa. octobre 2013.
12. Oncolor, Réseau Régional de Cancérologie Lorraine, Carol, Réseau Régional de Cancérologie Alsace, OncoBourgogne, Réseau de Cancérologie Bourgogne, et al. Référentiel interrégional (Alsace, Bourgogne, Franche-Comté et Lorraine) de prise en charge du cancer du sein 2012: Oncolor. 2012.

13. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):361-70.
14. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001;411(6835):355-65.
15. De Cremoux P, Robert J. Cell signalling and cancer: characterisation of therapeutic targets. *Pathol Biol*. 2012;60(4):217-22.
16. Lahiry P, Torkamani A, Schork NJ, Hegele RA. Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):60-74.
17. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-34.
18. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):341-54.
19. Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer*. 2001;8(3):151-9.
20. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(2):177-84.
21. Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med*. 2007;13(12):527-34.
22. Hubert P. [Growth factors of the EGF family and their receptors]. *Bull Cancer*. 2007;94(7 Suppl):F137-45.
23. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):127-37.
24. Linardou H, Dahabreh IJ, Bafaloukos D, Kosmidis P, Murray S. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(6):352-66.
25. Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle*. 2004;3(10):1221-4.
26. Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Carney WP. The c-erbB-2 protein in oncogenesis: molecular structure to molecular epidemiology. *Crit Rev Oncog*. 1994;5(2-3):313-29.
27. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.
28. Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R, Weinberg RA. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell*. 1982;28(4):865-71.

29. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984;312(5994):513-6.
30. Tan M, Yu D. Molecular mechanisms of erbB2-mediated breast cancer chemoresistance. *Adv Exp Med Biol*. 2007;608:119-29.
31. Abbott AM, Bueno R, Pedrini MT, Murray JM, Smith RJ. Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J Biol Chem*. 1992;267(15):10759-63.
32. Christopoulos PF, Msaouel P, Koutsilieris M. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. *Mol Cancer*. 2015;14:43.
33. Kucab JE, Dunn SE. Role of IGF-1R in mediating breast cancer invasion and metastasis. *Breast Dis*. 2003;17:41-7.
34. Farabaugh SM, Boone DN, Lee AV. Role of IGF1R in Breast Cancer Subtypes, Stemness, and Lineage Differentiation. *Front Endocrinol*. 2015;6:59.
35. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7(8):606-19.
36. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(6):320-8.
37. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2013;39(8):935-46.
38. Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer*. 2011;2(3):261-74.
39. Carracedo A, Baselga J, Pandolfi PP. Deconstructing feedback-signaling networks to improve anticancer therapy with mTORC1 inhibitors. *Cell Cycle*. 2008;7(24):3805-9.
40. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3065-74.
41. McAuliffe PF, Meric-Bernstam F, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Deciphering the role of PI3K/Akt/mTOR pathway in breast cancer biology and pathogenesis. *Clin Breast Cancer*. 2010;10 Suppl 3:S59-65.
42. Brunner-Kubath C, Shabbir W, Saferding V, Wagner R, Singer CF, Valent P, et al. The PI3 kinase/mTOR blocker NVP-BE2235 overrides resistance against irreversible ErbB inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;129(2):387-400.

43. Gonzalez-Angulo AM, Blumenschein GR, Jr. Defining biomarkers to predict sensitivity to PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(4):313-20.
44. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(8):627-44.
45. Bendell JC, Rodon J, Burris HA, de Jonge M, Verweij J, Birlle D, et al. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2012;30(3):282-90.
46. Coutte L, Dreyer C, Sablin MP, Faivre S, Raymond E. [PI3K-AKT-mTOR pathway and cancer]. *Bull Cancer.* 2012;99(2):173-80.
47. Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene.* 2007;26(9):1338-45.
48. Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM. The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):751-9.
49. Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol.* 2001;14(7):672-6.
50. Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(4):289-301.
51. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, Cotrupi S, Barassi F, Del Grammastro M, et al. Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2007;13(20):6064-9.
52. Boyault S, Drouet Y, Navarro C, Bachelot T, Lasset C, Treilleux I, et al. Mutational characterization of individual breast tumors: TP53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(1):29-39.
53. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu MF, Chamness GC, Wong H, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositide-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol.* 2011;29(2):166-73.
54. Wang L, Zhang Q, Zhang J, Sun S, Guo H, Jia Z, et al. PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC Cancer.* 2011;11:248.
55. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 2004;6(2):117-27.
56. Pandolfi PP. Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment. *N Engl J Med.* 2004;351(22):2337-8.

57. Razis E, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Kalofonos HP, Pavlakis K, et al. Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(2):447-56.
58. Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, et al. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer.* 2006;94(2):247-52.
59. Kechagioglou P, Papi RM, Provatopoulou X, Kalogera E, Papadimitriou E, Grigoropoulos P, et al. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Res.* 2014;34(3):1387-400.
60. Yang J, Cron P, Thompson V, Good VM, Hess D, Hemmings BA, et al. Molecular Mechanism for the Regulation of Protein Kinase B/Akt by Hydrophobic Motif Phosphorylation. *Molecular Cell.* 2002;9(6):1227-40.
61. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 2002;14(5):381-95.
62. Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle.* 2009;8(16):2502-8.
63. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74.
64. Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(12):2168-78.
65. Park SS, Kim SW. Activated Akt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with HER2 overexpression. *Oncol Rep.* 2007;18(1):139-43.
66. Lin HJ, Hsieh FC, Song H, Lin J. Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. *Br J Cancer.* 2005;93(12):1372-81.
67. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 20):3589-94.
68. Masahiro A, Blazek E, Vogt PK. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:136-41.
69. Villarreal-Garza C, Cortes J, Andre F, Verma S. mTOR inhibitors in the management of hormone receptor-positive breast cancer: the latest evidence and future directions. *Ann Oncol.* 2012;23(10):2526-35.
70. Wang X, Proud CG. mTORC1 signaling: what we still don't know. *J Mol Cell Biol.* 2011;3(4):206-20.

71. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(1):9-22.
72. Nardella C, Chen Z, Salmena L, Carracedo A, Alimonti A, Egia A, et al. Aberrant Rheb-mediated mTORC1 activation and Pten haploinsufficiency are cooperative oncogenic events. *Genes Dev*. 2008;22(16):2172-7.
73. Avruch J, Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, et al. Activation of mTORC1 in two steps: Rheb-GTP activation of catalytic function and increased binding of substrates to raptor. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 1):223-6.
74. Huber TB, Walz G, Kuehn EW. mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. *Kidney Int*. 2011;79(5):502-11.
75. Kozma SC, Thomas G. p70s6k/p85s6k: mechanism of activation and role in mitogenesis. *Semin Cancer Biol*. 1994;5(4):255-60.
76. Brennan P, Babbage JW, Thomas G, Cantrell D. p70(s6k) integrates phosphatidylinositol 3-kinase and rapamycin-regulated signals for E2F regulation in T lymphocytes. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4729-38.
77. Thomas G, Hall MN. TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(6):782-7.
78. Laser M, Kasi VS, Hamawaki M, Cooper Gt, Kerr CM, Kuppuswamy D. Differential activation of p70 and p85 S6 kinase isoforms during cardiac hypertrophy in the adult mammal. *J Biol Chem*. 1998;273(38):24610-9.
79. Mahalingam M, Templeton DJ. Constitutive activation of S6 kinase by deletion of amino-terminal autoinhibitory and rapamycin sensitivity domains. *Mol Cell Biol*. 1996;16(1):405-13.
80. Weng QP, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb MJ, Avruch J. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. *J Biol Chem*. 1998;273(26):16621-9.
81. Berven LA, Crouch MF. Cellular function of p70S6K: A role in regulating cell motility. *Immunol Cell Biol*. 2000;78(4):447-51.
82. Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol*. 1998;8(2):69-81.
83. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 7):1175-86.
84. Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(10):769-76.

85. Cole A, Frame S, Cohen P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J.* 2004;377(Pt 1):249-55.
86. Beffert U, Morfini G, Bock HH, Reyna H, Brady ST, Herz J. Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49958-64.
87. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 1998;12:3499-511.
88. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007;26(22):3279-90.
89. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012;66(2):105-43.
90. Maemura M, Iino Y, Koibuchi Y, Yokoe T, Morishita Y. Mitogen-activated protein kinase cascade in breast cancer. *Oncology.* 1999;57 Suppl 2:37-44.
91. Avruch J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1150-60.
92. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2008;60(3):261-310.
93. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 5):843-6.
94. Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res.* 2010;16(13):3329-34.
95. Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol.* 2002;192(2):125-30.
96. Niemitz E. Ras pathway activation in breast cancer. *Nat Genet.* 2013;45(11):1273-.
97. von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;62(1):51-62.
98. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(11):875-85.
99. Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(27):6771-90.

100. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2507-16.
101. Jylling A, Rasmussen A, Jakobsen E, Christensen R, Sorensen F. Are mutations in K-RAS, BRAF and PIK3CA genes critical for response to adjuvant trastuzumab treatment in patients with HER-2 positive breast cancer? *J Cancer Ther Res.* 2014;3(1).
102. Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1213-26.
103. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.* 2012;92(2):689-737.
104. Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(12):2707-19.
105. Smith JA, Poteet-Smith CE, Xu Y, Errington TM, Hecht SM, Lannigan DA. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 2005;65(3):1027-34.
106. Moon HG, Yi JK, Kim HS, Lee HY, Lee KM, Yi M, et al. Phosphorylation of p90RSK is associated with increased response to neoadjuvant chemotherapy in ER-positive breast cancer. *BMC Cancer.* 2012;12:585.
107. Serra V, Eichhorn PJA, Garc, xEd, a G, xEd, et al. RSK3/4 mediate resistance to PI3K pathway inhibitors in breast cancer. *J Clin Invest.* 2013;123(6):2551-63.
108. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(5):283-96.
109. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1358-75.
110. Chen L, Mayer JA, Krisko TI, Speers CW, Wang T, Hilsenbeck SG, et al. Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009;69(23):8853-61.
111. Merlin JL, Harle A, Lion M, Ramacci C, Leroux A. Expression and activation of P38 MAP kinase in invasive ductal breast cancers: correlation with expression of the estrogen receptor, HER2 and downstream signaling phosphorylated proteins. *Oncol Rep.* 2013;30(4):1943-8.
112. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* 2000;12(1):1-13.

113. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005;15(1):11-8.
114. New L, Han J. The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trends Cardiovasc Med.* 1998;8(5):220-8.
115. Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res.* 2009;11(5):209.
116. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer.* 2013;4(9-10):342-59.
117. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):537-49.
118. Tang L, Han X. The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(2):179-82.
119. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol.* 2005;23(11):2469-76.
120. Esteva FJ, Sahin AA, Smith TL, Yang Y, Pusztai L, Nahta R, et al. Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma. *Cancer.* 2004;100(3):499-506.
121. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):537-49.
122. Green AR, Powe DG, Rakha EA, Soria D, Lemetre C, Nolan CC, et al. Identification of key clinical phenotypes of breast cancer using a reduced panel of protein biomarkers. *Br J Cancer.* 2013;109(7):1886-94.
123. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
124. Sorlie 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;98(19):10869-74.
125. 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;100(14):8418-23.

126. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10393-8.
127. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:127.
128. Van 't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
129. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(4):325-38.
130. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit Herceptin®. Paris, France 2013.
131. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-92.
132. Gemmete JJ, Mukherji SK. Trastuzumab (Herceptin). *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32(8):1373-4.
133. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol*. 2007;18(6):977-84.
134. Baselga J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 7:vii36-40.
135. Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006;3(5):269-80.
136. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol*. 2005;23(19):4265-74.
137. HERCEPTIN® sous-cutanée: Avis de la Commission de la Transparence du 2 Avril 2014, HAS. 2014 [12/05/2014]. Available from: www.has-sante.fr/.
138. Hubbard SR. EGF receptor inhibition: attacks on multiple fronts. *Cancer Cell*. 2005;7(4):287-8.
139. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;367(19):1783-91.

140. McCormack PL. Pertuzumab: a review of its use for first-line combination treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. *Drugs*. 2013;73(13):1491-502.
141. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol*. 2010;28(7):1138-44.
142. Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(2):109-19.
143. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(26):2666-76.
144. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit Avastin®. Paris, France, 2013.
145. Avastin®: Avis de la Commission de la Transparence 25 mai 2011, HAS, 2011 [04/04/2013]. Available from: www.has-sante.fr/.
146. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(26):2733-43.
147. Moy B, Goss PE. Lapatinib: current status and future directions in breast cancer. *Oncologist*. 2006;11(10):1047-57.
148. Xia W, Bisi J, Strum J, Liu L, Carrick K, Graham KM, et al. Regulation of survivin by ErbB2 signaling: therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Res*. 2006;66(3):1640-7.
149. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit TYVERB®. Paris, France, 2013.
150. Campone M, Kerbrat P, Roché H, Bennouna J, Cuillière J, Le Mevel B, et al. Prospects from the bench to the development of signal transduction inhibitors: application for breast cancer. *Bull Cancer*. 2003.
151. Andre F, O'Regan R, Ozguroglu M, Toi M, Xu B, Jerusalem G, et al. Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(6):580-91.
152. LoRusso PM. Mammalian target of rapamycin as a rational therapeutic target for breast cancer treatment. *Oncology*. 2013;84(1):43-56.
153. Borders EB, Bivona C, Medina PJ. Mammalian target of rapamycin: biological function and target for novel anticancer agents. *Am J Health Syst Pharm*. 2010;67(24):2095-106.

154. Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*. 2013;497(7448):217-23.
155. Barnett CM. Everolimus: targeted therapy on the horizon for the treatment of breast cancer. *Pharmacotherapy*. 2012;32(4):383-96.
156. Hurvitz SA, Dalenc F, Campone M, O'Regan RM, Tjan-Heijnen VC, Gligorov J, et al. A phase 2 study of everolimus combined with trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-overexpressing advanced breast cancer that progressed during prior trastuzumab and taxane therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;141(3):437-46.
157. AFINITOR®: Avis de la Commission de la Transparence 3 Avril 2013, HAS, 2013 [25/05/2013]. Available from: <http://www.has-sante.fr>.
158. Oudard S, Elaidi RT. Sequential therapy with targeted agents in patients with advanced renal cell carcinoma: optimizing patient benefit. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(8):981-7.
159. Nahta R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol*. 2012;2012:428062.
160. Nahta R, Esteva FJ. Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene*. 2007;26(25):3637-43.
161. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(4):395-402.
162. Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BE235. *Cancer Res*. 2008;68(22):9221-30.
163. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*. 2005;7(6):561-73.
164. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(8):772-5.
165. Perez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjold B, Rutqvist LE, et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(12):3577-84.
166. Harle A, Lion M, Lozano N, Merlin JL. [Clinical, diagnostic significance and theranostic interest of PIK3CA gene mutations in breast cancer]. *Bull Cancer*. 2013;100(10):947-54.

167. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer*. 2006;94(4):455-9.
168. Dunlap J, Le C, Shukla A, Patterson J, Presnell A, Heinrich MC, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;120(2):409-18.
169. Mangone FR, Bobrovnitchaia IG, Salaorni S, Manuli E, Nagai MA. PIK3CA exon 20 mutations are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Clinics*. 2012;67(11):1285-90.
170. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(16):5049-59.
171. Chen FL, Xia W, Spector NL. Acquired resistance to small molecule ErbB2 tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):6730-4.
172. Guo S, Sonenshein GE. Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2004;24(19):8681-90.
173. Trowe T, Boukouvala S, Calkins K, Cutler RE, Jr., Fong R, Funke R, et al. EXEL-7647 inhibits mutant forms of ErbB2 associated with lapatinib resistance and neoplastic transformation. *Clin Cancer Res*. 2008;14(8):2465-75.
174. Lee JW, Soung YH, Seo SH, Kim SY, Park CH, Wang YP, et al. Somatic mutations of ERBB2 kinase domain in gastric, colorectal, and breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2006;12(1):57-61.
175. Luporsi E. Validation des biomarqueurs, niveau de preuve et essais cliniques adaptatifs. Les biomarqueurs moléculaires en oncologie, sous la direction de Jean-Louis Merlin. Paris, France: Springer-Verlag; 2014. p. 19-27.
176. Cizkova M, Dujaric ME, Lehmann-Che J, Scott V, Tembo O, Asselain B, et al. Outcome impact of PIK3CA mutations in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab. *Br J Cancer*. 2013;108(9):1807-9.
177. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol*. 2010;177(4):1647-56.
178. Jensen JD, Knoop A, Laenkholm AV, Grauslund M, Jensen MB, Santoni-Rugiu E, et al. PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol*. 2012;23(8):2034-42.

179. Abramson V, Arteaga CL. New strategies in HER2-overexpressing breast cancer: many combinations of targeted drugs available. *Clin Cancer Res.* 2011;17(5):952-8.
180. Orlando L, Schiavone P, Fedele P, Calvani N, Nacci A, Rizzo P, et al. Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2010;36 Suppl 3:S67-71.
181. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(33):4452-61.
182. Ma CX, Crowder RJ, Ellis MJ. Importance of PI3-kinase pathway in response/resistance to aromatase inhibitors. *Steroids.* 2011;76(8):750-2.
183. Loi S, Michiels S, Baselga J, Bartlett JM, Singhal SK, Sabine VS, et al. PIK3CA genotype and a PIK3CA mutation-related gene signature and response to everolimus and letrozole in estrogen receptor positive breast cancer. *PLoS One.* 2013;8(1):e53292.
184. Donnelly SM, Paplomata E, Peake BM, Sanabria E, Chen Z, Nahta R. P38 MAPK contributes to resistance and invasiveness of HER2- overexpressing breast cancer. *Curr Med Chem.* 2014;21(4):501-10.
185. Lu CH, Wyszomierski SL, Tseng LM, Sun MH, Lan KH, Neal CL, et al. Preclinical testing of clinically applicable strategies for overcoming trastuzumab resistance caused by PTEN deficiency. *Clin Cancer Res.* 2007;13(19):5883-8.
186. Morrow PK, Wulf GM, Ensor J, Booser DJ, Moore JA, Flores PR, et al. Phase I/II study of trastuzumab in combination with everolimus (RAD001) in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer who progressed on trastuzumab-based therapy. *J Clin Oncol.* 2011;29(23):3126-32.
187. Andre F, Campone M, O'Regan R, Manlius C, Massacesi C, Sahmoud T, et al. Phase I study of everolimus plus weekly paclitaxel and trastuzumab in patients with metastatic breast cancer pretreated with trastuzumab. *J Clin Oncol.* 2010;28(34):5110-5.
188. Hurvitz SA, Dalenc F, Campone M, O'Regan RM, Tjan-Heijnen VC, Gligorov J, et al. A phase 2 study of everolimus combined with trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-overexpressing advanced breast cancer that progressed during prior trastuzumab and taxane therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;141(3):437-46.
189. Hurvitz SA, Andre F, Jiang Z, Shao Z, Mano MS, Neciosup SP, et al. Combination of everolimus with trastuzumab plus paclitaxel as first-line treatment for patients with HER2-positive advanced breast cancer (BOLERO-1): a phase 3, randomised, double-blind, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(7):816-29.
190. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1673-84.

191. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1659-72.
192. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res*. 2004;10(17):5650-5.
193. Coudert BP, Largillier R, Arnould L, Chollet P, Campone M, Coeffic D, et al. Multicenter phase II trial of neoadjuvant therapy with trastuzumab, docetaxel, and carboplatin for human epidermal growth factor receptor-2-overexpressing stage II or III breast cancer: results of the GETN(A)-1 trial. *J Clin Oncol*. 2007;25(19):2678-84.
194. Coudert BP, Arnould L, Moreau L, Chollet P, Weber B, Vanlemmens L, et al. Pre-operative systemic (neo-adjuvant) therapy with trastuzumab and docetaxel for HER2-overexpressing stage II or III breast cancer: results of a multicenter phase II trial. *Ann Oncol*. 2006;17(3):409-14.
195. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(16):3676-85.
196. Chergui F, Chretien AS, Bouali S, Ramacci C, Rouyer M, Bastogne T, et al. Validation of a phosphoprotein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. *Clin Chem*. 2009;55(7):1327-36.
197. Denkert C, Darb-Esfahani S, Loibl S, Anagnostopoulos I, Johrens K. Anti-cancer immune response mechanisms in neoadjuvant and targeted therapy. *Semin Immunopathol*. 2011;33(4):341-51.
198. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6(4):443-6.
199. Kohrt HE, Houot R, Weiskopf K, Goldstein MJ, Scheeren F, Czerwinski D, et al. Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *J Clin Invest*. 2012;122(3):1066-75.
200. Loi S. Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *Oncoimmunology*. 2013;2(7):e24720.
201. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1544-50.

202. Andre F, Dieci MV, Dubsky P, Sotiriou C, Curigliano G, Denkert C, et al. Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(1):28-33.
203. Beano A, Signorino E, Evangelista A, Brusa D, Mistrangelo M, Polimeni MA, et al. Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *J Transl Med.* 2008;6:25.
204. Untch M, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. *J Clin Oncol.* 2010;28(12):2024-31.
205. Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM, Menard S, Balsari A. Activity and resistance of trastuzumab according to different clinical settings. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(3):212-7.
206. Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene.* 2008;27(41):5527-41.
207. Serra V, Scaltriti M, Prudkin L, Eichhorn PJ, Ibrahim YH, Chandarlapaty S, et al. PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene.* 2011;30(22):2547-57.
208. Soares HP, Ni Y, Kisfalvi K, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(2):e57289.
209. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer.* 2006;94(2):259-67.
210. Mohsin SK, Weiss HL, Gutierrez MC, Chamness GC, Schiff R, Digiovanna MP, et al. Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol.* 2005;23(11):2460-8.
211. Board RE, Thelwell NJ, Ravetto PF, Little S, Ranson M, Dive C, et al. Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA. *Clin Chem.* 2008;54(4):757-60.
212. Hofman V, Ilie M, Gavric-Tanga V, Lespinet V, Mari M, Lassalle S, et al. [Role of the surgical pathology laboratory in the pre-analytical approach of molecular biology techniques]. *Ann Pathol.* 2010;30(2):85-93.
213. Pinhel IF, Macneill FA, Hills MJ, Salter J, Detre S, A'Hern R, et al. Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R76.
214. Siddiqui S, Rimm DL. Pre-analytic variables and phospho-specific antibodies: the Achilles heel of immunohistochemistry. *Breast Cancer Res.* 2010;12(6):113.

215. David K, Juhl H. Immunohistochemical Detection of Phosphoproteins and Cancer Pathways. In: Lin F, Prichard J, editors. Handbook of Practical Immunohistochemistry: Springer New York; 2015. p. 85-90.
216. Trigka EA, Levidou G, Saetta AA, Chatziandreou I, Tomos P, Thalassinou N, et al. A detailed immunohistochemical analysis of the PI3K/AKT/mTOR pathway in lung cancer: correlation with PIK3CA, AKT1, K-RAS or PTEN mutational status and clinicopathological features. *Oncol Rep.* 2013;30(2):623-36.
217. Hudelist G, Kostler WJ, Czerwenka K, Kubista E, Attems J, Muller R, et al. Her-2/neu and EGFR tyrosine kinase activation predict the efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer.* 2006;118(5):1126-34.
218. Felip E, Rojo F, Reck M, Heller A, Klughammer B, Sala G, et al. A phase II pharmacodynamic study of erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14(12):3867-74.
219. Merlin J-L, Lion M, Wong J, Bachelot T, Andre F, Treilleux I, et al. Abstract P3-06-07: Alterations of intratumoral signalling in breast cancer patients receiving pre-operative trastuzumab alone or combined with everolimus. *Cancer Research.* 2015;75(9 Suppl):P3-06-7.
220. Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science.* 1999;286(5445):1741-4.
221. Guan KL, Figueroa C, Brtva TR, Zhu T, Taylor J, Barber TD, et al. Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27354-9.
222. Yuan ZQ, Feldman RI, Sussman GE, Coppola D, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance. *J Biol Chem.* 2003;278(26):23432-40.
223. Vivanco I, Palaskas N, Tran C, Finn SP, Getz G, Kennedy NJ, et al. Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell.* 2007;11(6):555-69.
224. Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol.* 1998;143(5):1375-83.
225. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):320-44.
226. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell.* 2005;121(2):179-93.

227. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med.* 2008;14(5):518-27.
228. Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(1-2):303-15.
229. Winslow S, Leandersson K, Edsjö A, Larsson C. Prognostic stromal gene signatures in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2015;17(1):23.
230. De Kruijf EM, van Nes JG, van de Velde CJ, Putter H, Smit VT, Liefers GJ, et al. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(3):687-96.
231. Downey CL, Thygesen HH, Sharma N, Shaaban AM. Prognostic significance of tumour stroma ratio in inflammatory breast cancer. *Springerplus.* 2015;4:68.
232. Denisov EV, Litviakov NV, Zavyalova MV, Perelmuter VM, Vtorushin SV, Tsyganov MM, et al. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistance gene expression. *Sci Rep.* 2014;4:4709.
233. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med.* 2009;15(1):68-74.
234. Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Pierantoni C, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream signalling pathway in primary colorectal tumours and related metastatic sites: optimising EGFR-targeted treatment options. *Br J Cancer.* 2007;97(1):92-7.
235. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature.* 2013;497(7447):108-12.
236. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194(4260):23-8.
237. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012;481(7381):306-13.
238. Ng CK, Martelotto LG, Gauthier A, Wen HC, Piscuoglio S, Lim RS, et al. Intra-tumor genetic heterogeneity and alternative driver genetic alterations in breast cancers with heterogeneous HER2 gene amplification. *Genome Biol.* 2015;16:107.
239. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell.* 2009;138(5):822-9.

240. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883-92.
241. Mouliere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12 Suppl 1:S209-15.
242. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res.* 2007;635(2-3):105-17.
243. Ramirez JL, Taron M, Balana C, Sarries C, Mendez P, de Aguirre I, et al. Serum DNA as a tool for cancer patient management. *Rocz Akad Med Bialymst.* 2003;48:34-41.
244. Madic J, Piperno-Neumann S, Servois V, Rampanou A, Milder M, Trouiller B, et al. Pyrophosphorolysis-activated polymerization detects circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(14):3934-41.
245. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(13):1199-209.
246. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(8):472-84.
247. Richardson AL, Iglehart JD. BEAMing up personalized medicine: mutation detection in blood. *Clin Cancer Res.* 2012;18(12):3209-11.

Résumé

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme et constitue un véritable problème de santé publique. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis la caractérisation des principales voies de signalisation et ont mis en évidence l'implication majeure de la signalisation cellulaire dans les processus de cancérogenèse. Des cibles moléculaires ont ainsi été identifiées et ont permis le développement de thérapeutiques dites ciblées, telles que les anticorps monoclonaux ou encore les inhibiteurs de kinase. Malgré ces avancées considérables qui ont permis l'amélioration de la prise en charge des patientes, on constate l'apparition de résistances aux traitements. Ce travail avait pour objectifs d'identifier de nouveaux biomarqueurs et de déterminer leur signification clinique, leur intérêt théranostique ainsi que leur impact sur la réponse aux traitements.

Dans un premier temps nous avons étudié les mutations activatrices du gène *PIK3CA*. Ces mutations sont retrouvées dans 25% des cancers du sein et sont impliquées dans la résistance au trastuzumab, aux anti-œstrogènes et aux inhibiteurs de mTOR. 149 échantillons de tumeurs de sein infiltrantes ont été analysés par une technique de PCR-HRM (*High Resolution Melting*) et 118 échantillons par une technique de PCR-ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*). Les résultats des 2 techniques étaient concordants ($\kappa=0,845$; $p<0,001$) et une relation entre mutations du gène *PIK3CA* et grade SBR a été mise en évidence, les tumeurs de grade SBR III étant moins fréquemment mutées que les autres ($p=0.025$ en HRM et $p=0.009$ en ARMS).

Dans un second temps, notre travail a consisté en l'exploration fonctionnelle des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases et P38MAPKinase. Pour cela nous avons analysé le niveau d'expression des phosphoprotéines p-AKT, p-GSK3 β , p-S6 kinase, p-MEK1, p-ERK1/2, p-P90RSK, p-IGF1R ainsi que p-P38MAPK par immuno-analyse multiplexe. Cette partie a comporté 3 études. Une première étude rétrospective sur 45 échantillons de tumeurs mammaires invasives congelées a mis en évidence des niveaux d'expression de P38 et de p-P38 plus élevés dans les tumeurs RE+. La deuxième étude était une étude prospective visant à déterminer des biomarqueurs de réponse à l'association trastuzumab-évérolimus chez des patientes présentant un cancer du sein précoce traitées en préopératoire. Cette étude a révélé une augmentation statistiquement significative du niveau d'expression de p-MEK1 ($p=0.012$), p-ERK1/2 ($p=0.003$) et p-P38MAPK ($p<0.001$) dans le bras de traitement associant l'évérolimus au trastuzumab qui pourrait s'expliquer par la suppression par l'évérolimus d'une boucle de rétrocontrôle négatif contrôlant l'activation de la voie RAS/RAF/MAPKinases. Dans le bras de traitement évaluant le trastuzumab seul, aucune variation du niveau d'expression des phosphoprotéines n'a été mise en évidence, y compris en aval du récepteur HER2, ce qui soulève l'hypothèse d'un mécanisme d'action prédominant immunologique du trastuzumab. La troisième étude qui comparait l'impact du trastuzumab in vitro et en situation clinique confirme la différence des mécanismes d'action mis en jeu en fonction des conditions cellulaires et cliniques.

Dans son ensemble, ce travail a mis en évidence que la détermination du statut mutationnel du gène *PIK3CA* et du niveau d'expression des phosphoprotéines pourrait être utile à une meilleure caractérisation moléculaire des cancers du sein et à l'optimisation de la personnalisation des prescriptions de thérapies ciblées.

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women and is a real public health problem. Advances in molecular biology have allowed the characterization of the major signaling pathways and revealed their major implication in carcinogenesis processes. Molecular targets have been identified and have enabled the development of targeted therapies, such as monoclonal antibodies, or kinase inhibitors. Despite these considerable advances that have improved the care of patients, emerging of resistance to treatments has been observed. The aim of this work was to identify new tumor biomarkers and determine their clinical significance, their theranostic interest and their impact on the response to targeted therapies.

Initially, we studied the activating mutations of the *PIK3CA* gene. These mutations are found in 25% of breast cancers and are involved in resistance to trastuzumab, antiestrogens and mTOR inhibitors. We analyzed 149 invasive breast tumor samples for *PIK3CA* gene mutations by PCR-HRM (High Resolution Melting) and 118 by PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System). The results achieved with the 2 techniques were consistent ($\kappa = 0.845$; $p < 0.001$) and a relationship between *PIK3CA* mutations and grade SBR was highlighted with a lower occurrence of mutations in SBR grade III tumors ($p=0.025$ in HRM and $p=0.009$ in ARMS).

Secondly, we investigated the functional alteration of PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPKinases and P38MAPKinase signaling pathways. We have analyzed the expression level of phosphoproteins p-AKT, p-GSK3 β , p-S6 kinase, p-MEK1, p-ERK1 / 2, p-P90RSK, p-IGF1R and p-p38MAPK by multiplex immunoanalysis. This part includes 3 studies. The first study was a retrospective study of 45 frozen samples of invasive breast tumors in which we observed that the level of expression of P38 and p-P38 was higher in the ER + tumors. The second study was a prospective study to identify biomarkers of response to trastuzumab-everolimus association in patients with early breast cancer treated preoperatively. This study showed a statistically significant increase of the expression level of p-MEK1 ($p = 0.012$), p-ERK1/2 ($p = 0.003$) and p-p38MAPK ($p < 0.001$) in arm treated by trastuzumab associated with everolimus. It could be explained by the repression of a negative feedback loop involving S6K, PI3K and RAS by everolimus, leading to the activation of RAS/RAF/MAPKinases signaling pathway. In the control arm investigating trastuzumab alone, no significant variations of the level of expression of phosphoproteins was demonstrated, raising the hypothesis of the implementation of a predominant immunological mechanism of action for Trastuzumab. The third study that compared effect of trastuzumab in vitro and in clinical setting confirms that trastuzumab has different modes of action when evaluated in cells and in clinical conditions.

As a whole, this work showed that determining the mutation status of *PIK3CA* and the expression level of phosphoproteins could be useful to refine the molecular characterization of breast cancers and optimize the criteria used to personalize the prescription of targeted therapies.
