UNIVERSITE DE STRASBOURG - FACULTE DE PHARMACIE

Année 2012 N° 2012/1

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE EN VUE DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TFF1 ET TFF3 DANS LES CANCERS DU SEIN

Stéphanie DELPOUS

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 30 novembre 2012 à 16h

Salle des thèses de la Faculté de Médecine de Strasbourg

Jury approuvé en date du 24 juillet 2012

Président du jury : Monsieur le Professeur Jean Marc Lessinger

Directrice de thèse : Madame le Docteur Catherine Tomasetto

Membres du jury : Monsieur le Professeur Etienne Chatelut

Monsieur le Professeur Thierry Vandamme

Monsieur le Docteur Dominique Levêque

SOMMAIRE

SERMENT DE GALIEN i

REMERCIEMENTS ii

ABREVIATIONS iii

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX iv

PREAMBULE 1

CHAPITRE 1. LE CANCER DU SEIN 2

I. EPIDEMIOLOGIE DES CANCERS DU SEIN 2

A. Les facteurs génétiques 2

B. Les facteurs hormonaux 4

C. Les facteurs histologiques 5

D. Le mode de vie 6

II. ANATOMO-PHYSIO-PATHOLOGIE DE LA GLANDE MAMAIRE 6

A. Anatomophysiologie du sein 7

B. Développement au cours de la vie 7

i. Au cours de la vie embryonnaire 8

ii. A la puberté 8

iii. Période de grossesse et de lactation 8

iv. A la ménopause 9

C. Les cellules souches mammaires 10

D. Anatomo-pathologie du sein 10

i. Les carcinomes non-infiltrants ou in situ 11

ii. Les carcinomes infiltrants ou invasifs 11

iii. Les formes rares de carcinomes 11

III. LA BIOLOGIE DU CANCER 12

A. L'histoire naturelle du cancer 12

B. Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs 13

IV. LES MARQUEURS BIOLOGIQUES 14

A. Les marqueurs « non-circulants » 15

i. Les récepteurs hormonaux 15

ii. Le statut Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2) 16
iii. Le Ki67 18
iv. UPA et PAI-1 18
v. Oncotype DX™ 20
vi. MammaPrint® 20
B. Les marqueurs « circulants » *20*
i. Le CA15.3 20
ii. Les cellules tumorales circulantes (CTC) ou disséminées (DTC) 21
V. CLASSIFICATION DES TUMEURS DU SEIN 22
A. Classification clinique *22*
B. Classification histologique *22*
C. Classification moléculaire *23*
i. Luminal-like 24
ii. HER2+ 24
iii. Triple-négatif 25
iv. Cas particuliers 25
VI. LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES 26
A. La chirurgie *26*
B. La radiothérapie *27*
C. La chimiothérapie *27*
D. L'hormonothérapie *28*
E. Thérapie ciblée *29*
VII. LE PARCOURS D'UNE PATIENTE 30
A. La découverte de la maladie *30*
B. Le bilan initial et d'extension *30*
C. La Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP) *31*
D. La prise en charge thérapeutique de la maladie non métastatique *31*
E. La prise en charge thérapeutique de la maladie métastatique *32*
F. La surveillance *33*
VIII. LES CAS PARTICULIERS 33
A. Cancer du sein chez l'homme *33*

B. Cancers du sein associés à la grossesse *33*

CHAPITRE 2. LES PROTEINES EN TREFLE 34

I. LES GENES TFF 34

A. Structure des gènes *34*

B. Régulation des gènes TFF *35*

II. LES PROTEINES TFF 36

A. Structure protéique *36*

B. Interactions protéiques *36*

III. EXPRESSION DES TFF DANS LES TISSUS NORMAUX 37

A. Localisation de TFF1 ..... *37*

B. Localisation de TFF2 ..... *38*

C. Localisation de TFF3 ..... *38*

IV. FONCTION DES TFF 38

A. Protection de l'intégrité de la muqueuse gastrique *38*

B. Réparation de la muqueuse gastrique lésée *39*

C. Effet anti-apoptotique *40*

D. Effet angiogénique *40*

E. Rôle dans la réponse immunitaire et l'inflammation *40*

V. LES TFF DANS LES TISSUS TUMORAUX 41

A. Tractus gastro-intestinal *41*

B. Glande mammaire *41*

C. Rôle des protéines en trèfle dans la genèse des tumeurs *43*

CHAPITRE 3. RATIONNEL DE L'ETUDE CLINIQUE 45

CHAPITRE 4. MATERIELS ET METHODES 47

I. DESCRIPTIF DE L'ETUDE 47

II. SELECTION DES PATIENTS 47

III. PREPARATION DE L'ECHANTILLON TUMORAL 47

IV. EXTRACTION DES PROTEINES 48

Pulvérisation des tissus *48*

Extraction tissulaire *48*

Dosage des protéines *48*

V. WESTERN BLOT 49

Préparation des extraits protéiques : *49*

Gel SDS-PAGE *49*
Immunoblot *49*
VI. RECUEIL DES DONNES CLINIQUES 50
VII. CULTURE CELLULAIRE 50
Culture cellulaire *50*
Préparation des extraits protéiques cellulaires : *51*
VIII. ANALYSE STATISTIQUE 51
CHAPITRE 5. MISE AU POINT DU DOSAGE 52
I. CHOIX DES OUTILS 52
La technique de dosage. 52
Le témoin de charge 52
Le gel SDS-PAGE 53
Les anticorps secondaires 53
Le révélateur 53
II. PRINCIPE DU CALIBRATEUR 54
A. Le calibrateur *54*
i. Confection de la gamme 54
ii. Intérêt du calibrateur 54
B. Définition d'un score clinique *55*
CHAPITRE 6. RESULTATS DE L'ETUDE CLINIQUE ET DISCUSSION 56
I. DESCRIPTION DE LA POPULATION ETUDIEE 56
II. ANALYSE DES RESULTATS ET DISCUSSION 57
CHAPITRE 7. CCONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 64
BIBLIOGRAPHIE 68

SERMENT DE GALIEN

« Je Jure,

en présence des Maîtres de la Faculté,

des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens

et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit

dans les préceptes de mon art et de

leur témoigner ma reconnaissance en

restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,

ma profession avec conscience et de respecter non

seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles

de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets

qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu

connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,

que je sois moi-même honoré

et estimé de mes confrères »

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je tiens à remercier très chaleureusement ma directrice de thèse le Docteur Catherine Tomasetto. Je vous remercie de m'encadrer chaque jour depuis deux ans avec beaucoup de disponibilité et de gentillesse.

Je tiens à remercier les membres du jury le Professeur Jean Marc Lessinger**,** le Professeur Etienne Chatelut, le Professeur Thierry Vandamme, le Docteur Dominique Levêque d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie particulièrement le Professeur Etienne Chatelut qui a fait le déplacement depuis Toulouse.

Je tiens à remercier le Professeur Carole Mathelin du service de sénologie, le Professeur Jean-Pierre Bellocq du laboratoire de pathologie et le Professeur Jean Marc Lessinger et le Docteur Nathalie Reix du laboratoire de biochimie de nous avoir donné l'opportunité de travailler sur des échantillons humains. Nous vous remercions pour votre confiance.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire de l'IGBMC : Marie-Christine, Fabien, Nassim, Corinne, Emilie, Elisabeth, David, Adrien, Léa et Jordanne, ainsi que ceux qui sont partis, Claire, Anne-Laure et Jianxiang.

Je remercie également mes collègues de RU pour les pauses déjeuners fort sympathiques : David, Adrien, Jérôme, Thomas, Rose Marie, Léa, Salim, Anne-Sophie et Thibaud, ainsi que celles qui sont parties Claire et Sarah.

Je remercie mes amis rencontrés à Strasbourg : Emilie, Nicolas, Sophie, Jérôme, Caroline, Lionel, Christopher, Aude, Shirley, Pierre, Ghislain, Bastien, Amanda, Camille, Marie, Natacha. Merci de m'avoir accueillie avec autant de chaleur.

Je remercie mes amies rencontrées à la fac, à Toulouse : Marie, Lalie, Céline et Anne, mais aussi Natacha. Merci pour cette amitié sincère, vraie et formidable.

Je remercie mes amis de toujours, rencontrés à la petite école, à Castres : Maylis, Aubane, Sophie, Capucine, Anthony, Anne Camille, Sylvain, Arnaud, Benjamin, et Olivier. Merci pour cette solide et durable amitié de « bande ».

Je remercie également mes nombreux colocataires, actuels : Sophie, Bastien et Sonia, et passés : Emilie et Aude, Marie et Lalie. Merci pour ces belles années de vie partagées ensemble.

Je remercie également avec beaucoup de chaleur mes parents, mon frère Pierre et toute ma famille pour votre soutien, votre amour et votre présence tout au long de ces années de pharmacie.

ABREVIATIONS

ADEMAS : **A**ssociation pour le **Dé**pistage des **Ma**ladies du **S**ein
ADN : **A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique
ADNc : **ADN c**omplémentaire
APS : **A**mmonium **P**er**S**ulfate)
ARN : **A**cide **R**ibo**N**ucléique
ARNm : ARN messager
ATCC : **A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection
BCA : **B**i**C**inchonic acid **A**ssay
BCEI : **B**reast **C**ancer **E**strogene **I**nduced protein
bFGFR : **b**asic **F**ibroblastic **G**rowth **F**actor **R**eceptor
CISH : Chromogenic In Situ Hybridization
DMEM : **D**ulbecco's **M**odified **E**agle's **M**edium
EGF : **E**pidermal **G**rowth **F**actor
EGFR : **E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor
ELISA : **E**nzyme **L**inked **I**mmunoSorbent **A**ssay
ERE : **E**strogen **R**esponse **E**lement
EREs : **E**strogen **R**esponse **E**lement**s**
FCS : **F**œtal **C**alf **S**eru
FISH : **F**luorescent In **S**itu **H**ybridization
GRE : **G**astrin **R**esponse **E**lement
HAS : **H**aute **A**utorité de **S**anté
HER2 : **H**uman **E**pidermal growth factor **R**eceptor type **2**
HIF-1 : **H**ypoxia **I**nducible **F**actor **1**
HIF1α : **H**ypoxia **I**nducible **F**actor
HSP : **H**eat **S**hock **P**rotein
IGBMC : **I**nstitut de **G**énétique et de **B**iologie **M**oléculaire et **C**ellulaire
InCA : **In**stitut **N**ational du **C**ancer
InVS : **In**stitut **N**ational de **V**eille **S**anitaire
ITF : **I**ntestinal **T**refoil **F**actor
kDa : **k**ilo**Da**ltons
KGFR : **K**eratinocyte **G**rowth **F**actor **R**eceptor
MEC : **M**atrice **E**xtra**C**ellulaire
min : minute
MNU : N-**m**ethyl-N-**n**itroso**u**rea
NHC : **N**ouvel **H**ôpital **C**ivil
NMD : **N**onsense **m**ediated mRNA **D**ecay
PAI-1 : **P**lasminogen **A**ctivator **I**nhibitor **1**
PAI-2 : **P**lasminogen **A**ctivator **I**nhibitor **2**
PBS : Phosphate **B**uffered **S**aline
PPAR : **P**eroxisome **P**roliferator **A**ctivated **R**eceptor
PPAR : **P**eroxisome **P**roliferator-**A**ctivated **R**eceptor
PREs : **P**rogesterone **R**esponse **E**lement**s**
PTC : **P**remature **S**top **C**odon
PTEN : **P**hosphatase and **Ten**sin homolog
RA : **R**écepteur aux **A**ndrogènes
RE : **R**écepteur aux **Œ**strogènes
RMN : **R**ésonance **M**agnétique **N**ucléaire
RP : **R**écepteur à la **P**rogestérone
rpm : **r**otation **p**ar **m**inute
SBR : **S**carff, **B**loom et **R**ichardson
SISH : **S**ilver **I**n **S**itu **H**ybridization
SP : **S**pasmolytic **P**rotein
TEMED: N,N,N',N'**TE**tra**ME**thylène**D**iamine
TFF : **T**re**f**oil **F**actor
TFIZ1 : **T**re**f**oil **I**nteracting factor **Z1**
THS : **T**raitement **H**ormonal **S**ubstitutif
TNM : **T**umor **N**ode **M**etastasis
tPA : **t**issue **P**lasminoge **A**ctivator
TPA : **T**umour **P**romoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-**A**cetate
UICC : **U**nion **I**nternationale **C**ontre le **C**ancer
uPA : **u**rokinase **P**lasminogen **A**ctivator
uPAR : **u**rokinase **P**lasminogen **A**ctivator **R**eceptor
USF : **U**pstream **S**timulating **F**actor
VWFC : **v**on **W**illebrand **F**actor **C**

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 : Evolution de l'incidence et de la mortalité des cancers du sein en France.
Figure 2 : Structure anatomique fonctionnelle d'un sein normal.
Figure 3 : Immunomarquage de tissu mammaire humain normal
Figure 4 : Différents états de différenciation de la glande mammaire
Figure 5 : Illustration des quatre principales formes histologiques de cancer du sein
Figure 6 : Immunomarquage d'un carcinome infiltrant
Figure 7 : Les principales étapes de la progression tumorale
Figure 8 : Détection des récepteurs RE/RP par IHC sur coupes de tissu mammaire tumoral
Figure 9 : Détection de HER2 par IHC sur coupes de tissu mammaire tumoral
Figure 10 : Détermination du score HER2 par FISH
Figure 11 : Système uPA plasminogène
Figure 12 : Modèle reliant la hiérarchie cellulaire mammaire et les sous-types tumoraux
Figure 13 : Technique du ganglion sentinelle
Figure 14 : Le parcours d'une patiente
Figure 15 : Structure primaire des protéines en trèfle
Figure 16 : Distribution des TFF
Figure 17 : Fonctions des TFF
Figure 18 : Le principe de l'étude
Figure 19 : Arbre décisionnel pour les tests statistiques
Figure 20 : Différents niveaux d'expression des gènes et technique adaptées
Figure 21 : Choix du témoin de charge
Figure 22 : Principe du calibrateur
Figure 23 : TFF1 et TFF3 ne sont pas nécessairement co-exprimés dans les tumeurs du sein.
Figure 24 : L'expression de TFF1 est corrélée à l'expression du RE.
Figure 25 : Association entre l'expression des TFFs et des critères histologiques.
Figure 26 : Association entre l'expression des TFFs et des marqueurs biologiques.
Figure 27 : Association entre les TFFs et l'invasion
Figure 28 : Association entre les TFFs et la ménarche, le nombre d'accouchements et l'allaitement.
Figure 29 : Association entre les TFFs et l'âge de la patiente, le statut ménopausique et le Traitement Hormonal Substitutif (THS).

TABLEAUX

Tableau 1 : Score HER2 déterminé par IHC +/- ISH et indications du trastuzumab.
Tableau 2 : Détermination du score HER2 par ISH
Tableau 3: Classification TNM (2002)
Tableau 4 : Classification par stade UICC
Tableau 5 : Grade SBR modifié par Elston et Ellis
Tableau 6 : Grade MSBR (Modified SBR)
Tableau 7 : Classification des cancers du sein
Tableau 8 : Les principales chimiothérapies utilisées dans le cancer du sein
Tableau 9 : Classification ACR des images radiographiques
Tableau 10 : Caractéristiques principales de différentes méthodes de dosage
Tableau 11 : Principaux articles ayant recherché l'expression de TFF1 dans des échantillons tumoraux mammaires humains.
Tableau 12 : Principaux articles ayant recherché l'expression de TFF3 dans des échantillons tumoraux mammaires humains.
Tableau 13 : Pourcentages moyens de tumeurs TFF1 et TFF3 positives dans des échantillons mammaires humains.
Tableau 14 : Caractéristiques de la population-1
Tableau 15 : Caractéristiques de la population-2
Tableau 16 : Caractéristiques de la population-3

PREAMBULE

L'imaginaire collectif a brossé un tableau plutôt sombre du cancer du sein. Cette maladie est associée à la mutilation, à la perte de féminité et à la condamnation à plus ou moins long terme. Depuis plusieurs décennies, les efforts conjugués des chercheurs et des cliniciens ont permis d'améliorer la survie et la qualité de vie des patientes. Aujourd'hui, les données épidémiologiques et les avancées diagnostiques et thérapeutiques permettent d'offrir une vision plus optimiste et nuancée de cette maladie. Au cours des dix dernières années, l'incidence du cancer du sein s'est stabilisée dans notre pays. On estime maintenant qu'une femme sur dix en sera atteinte au cours de sa vie. Grâce à un dépistage plus serré et à l'amélioration des traitements, la mortalité attribuable à cette maladie a régressé de 1 à 2% par année depuis la fin des années 90. Les statistiques sont encore plus encourageantes lorsque la tumeur est découverte à un stade précoce. De plus, pour la plupart des femmes sorties de la maladie, l'espérance de vie est semblable à celle des autres femmes. Cependant, il existe des formes graves et certaines patientes décèdent des suites d'un cancer du sein. Il est nécessaire de poursuivre sur tous les fronts la recherche ; des progrès sont indispensables pour combattre la maladie et continuer d'améliorer la qualité de vie des patientes.

CHAPITRE 1. LE CANCER DU SEIN

Durant les trois dernières décennies, la compréhension des cancers du sein, leur diagnostic et leur prise en charge ont fait de grandes avancées. Dans ce premier chapitre, nous attacherons à décrire l'épidémiologie des cancers du sein (**I**). Il conviendra de rappeler l'anatomie de la glande mammaire (**II**) avant de décrire succinctement la biologie du cancer (**III**). De plus, les outils (**IV**) permettant la classification des tumeurs (**V**) et la détermination des principales stratégies thérapeutiques (**VI** et **VII**) seront présentés.

I. EPIDEMIOLOGIE DES CANCERS DU SEIN

Dans les pays développés, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme [1], et représente la première cause de mortalité par cancer [2,3]. En France, 53 000 nouveaux patients ont été diagnostiqués en 2011, soit plus d'un tiers de l'ensemble des nouveaux cas de cancers féminins. Entre 1980 et 2005, l'incidence des cancers du sein a pratiquement doublé dans le monde [4]. Le taux d'incidence moyen standardisé mondial est passé de 56.8 pour 100 000 femmes en 1980 à 99.7 pour 100 000 femmes en 2005. Depuis, l'incidence semble se stabiliser ; il est estimé à 99.7 pour 100 000 femmes en 2011 [5,6]. En revanche, la mortalité, restée constante en dépit de l'augmentation du nombre de cas, est en diminution depuis quelques années (Figure 1) [5,6]. Dans notre pays, le cancer du sein bénéficie d'un pronostic à long terme favorable avec une survie moyenne de 90% à 3 ans et de 85% à 5 ans [7]. Cette évolution positive s'explique d'une part, par des diagnostics de plus en plus précoces grâce au dépistage organisé et individuel et d'autre part, par l'amélioration de la prise en charge des patientes. Néanmoins, la médiane de survie pour les stades métastatiques est courte ; elle est comprise entre 18 et 30 mois, ce qui atteste de la gravité de cette maladie [8]. Les étiologies des cancers du sein sont probablement multiples et complexes. Néanmoins, différents facteurs génétiques (**A**), hormonaux (**B**) et histologiques (**C**), ainsi que le mode de vie (**D**) influencent significativement l'apparition de la maladie.

A. Les facteurs génétiques

Des antécédents familiaux augmentent considérablement les risques de cancer du sein. Ceux-ci sont cumulatifs. Plus la parente est proche, plus le risque est élevé [9]. Il est plus élevé lors d'un cancer bilatéral, survenu avant la ménopause. Il faut distinguer les cancers familiaux des cancers héréditaires. Dans le cas des cancers familiaux, plus fréquents, on observe une

accumulation de cancers dans une même famille, sans gène responsable reconnu. Dans le cas des cancers héréditaires, un gène de susceptibilité a été identifié. Ces cancers sont rares et leur fréquence a été estimée 5-10% [10,11]. Une liste de gènes a été incriminée dans la pathologie cancéreuse [12], les principaux gènes sont détaillés ci-dessous.

Les cancers du sein liés à des mutations des gènes *Breast Cancer* (*BRCA1* et *BRCA2*) correspondent à 65% des cancers du sein héréditaires, et à entre 2 et 5% des cancers du sein totaux [13]. Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* répondent à un mode de transmission autosomique dominant ; ils sont localisés respectivement sur les chromosomes 17 et 13. Il existe un grand nombre de mutations constitutionnelles connues des gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Ces mutations inactivatrices en général diminuent l'expression de la protéine. Ces deux gènes sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires essentiels, comme la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et la transcription [14,15]. Dans plus de 90% des cas, les mutations de *BRCA1* aboutissent à l'introduction d'un codon stop prématuré (PTC ou Premature Stop Codon). Ces ARNm pourront être reconnus par le mécanisme de dégradation des ARNm porteurs d'un PTC, le NMD (Nonsense mediated mRNA Decay) et entraînent la disparition de la protéine [16]. D'autres types de mutations peuvent diminuer l'expression de la protéine : une mutation altérant le cadre de lecture, une mutation à un site d'épissage le rendant non fonctionnel, une insertion ou délétion de petite ou grande taille aboutissant à une protéine altérée [17]. Dans 80% des cas, une mutation du gène *BRCA1* est associée à des tumeurs agressives de haut grade, de mauvais pronostic, et de type « basal-like » ou triple-négatif [18,19]. Mais seulement 10% des tumeurs triple-négatives portent la mutation *BRCA1* [20]. Les cancers du sein liés au gène *BRCA2* ne sont pas liés à un phénotype spécifique mais ils sont souvent de haut grade [21]. Chez les femmes saines porteuses de la mutation, une mastectomie bilatérale prophylactique ou une surveillance annuelle par IRM (Image par Résonance Magnétique) mammaire, mammographie, et échographie sont désormais proposées. Chez les femmes atteintes, le risque de cancer controlatéral est important. Une mastectomie controlatérale peut être envisagée [22].

Dans certains cancers du sein sporadiques (non-héréditaires), l'expression de la protéine BRCA1 est diminuée, sans que le gène soit muté. Divers mécanismes moléculaires peuvent entrainer la diminution de l'expression de ce gène. Par exemple, l'activation d'AKT1 entraîne une séquestration anormale de la protéine BRCA1 dans le cytoplasme de la cellule [23]. Celle-ci ne peut plus pénétrer dans le noyau et participer aux processus de réparation de l'ADN [24]. De même, le facteur de transcription HOXA9, sous exprimé dans certains cancers du sein,

contrôle l'expression du gène *BRCA1*. Lorsqu'il est sous-exprimé, l'expression de la protéine BRCA1 diminue [25].

D'autres gènes sont impliqués dans des formes plus rares de cancer du sein [26]. Nous pouvons évoquer 2 gènes clefs de la régulation du cycle cellulaire : *TP53* et *PTEN*. Les mutations germinales du gène suppresseur de tumeurs *TP53* sont associées à une forme familiale de tumeurs multiples connues sous le nom de syndrome de Li-Fraumeni [27]. Localisé au niveau de la région chromosomique 17p13.1, le gène *TP53* est composé de 11 exons, le premier étant non codant [28]. L'expression de p53 est constitutive et ubiquitaire. Cette phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés agit comme facteur de transcription de gènes régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose, et de gènes impliqués dans la réponse aux stress [29,30]. Elle est composée de cinq domaines structuraux et fonctionnels : un domaine N-terminal de transactivation, un domaine de régulation riche en proline, un domaine de liaison à l'ADN, un domaine d'oligomérisation et un domaine C-terminal impliqué dans la régulation de la liaison de p53 à l'ADN. Les mutations du gène *TP53* les plus fréquemment observées dans les cancers affectent le repliement de la protéine ou son interaction directe avec les sillons de la molécule d'ADN et abrogent l'interaction ADN-protéine [31]. Le syndrome de Li-Fraumeni prédispose au développement de cancers du sein, d'ostéosarcomes, de leucémies, et de tumeurs cérébrales.

De manière semblable, des mutations germinales du gène suppresseur de tumeurs *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog) peuvent induire l'apparition du syndrome de Cowden. Localisé sur la région chromosomique 10q23, le gène *PTEN* comprend 9 exons [32]. Cette protéine de 403 acides aminés participe à la régulation du cycle de division cellulaire. PTEN est une phosphatase exprimée dans la grande majorité des cellules du corps humain [33]. Le syndrome de Cowden consiste en l'apparition d'hamartomes (malformations tissulaires) retrouvés au niveau des seins, de la thyroïde, du tractus gastro-intestinal, de l'endomètre et du cerveau. Ils favorisent l'apparition de lésions cancéreuses.

B. Les facteurs hormonaux

La glande mammaire étant sous le contrôle des hormones ovariennes jusqu'à la ménopause, les facteurs hormonaux jouent un rôle très important dans son développement physiopathologique [34]. En effet, l'exposition aux hormones stéroïdes est directement corrélée à la survenue d'un cancer du sein.

D'une part, la glande mammaire est exposée aux hormones endogènes : oestradiol, et progestérone. Ainsi, une exposition prolongée aux hormones due à une ménarche précoce

(avant 12 ans), et/ou à une ménopause tardive augmente le risque d'apparition de cancer du sein [34]. En revanche, les maternités, surtout à un âge jeune, et l'allaitement ont un effet protecteur [35]. Cependant, une étude récente pondère le rôle protecteur de la grossesse. En effet, donner naissance à un gros bébé augmenterait le risque de cancer du sein chez la mère [36]. Cette équipe a observé une production accrue d'œstrogènes pendant la grossesse chez les femmes donnant naissance aux plus gros nourrissons, ce qui pourrait expliquer un risque accru ultérieur de cancer du sein.

D'autre part, la glande mammaire peut être exposée à des hormones exogènes : traitement hormonal substitutif (THS) de la ménopause, contraception orale, ou traitement de l'infertilité. L'objectif des THS est de diminuer les risques d'ostéoporose, de maladie cardio-vasculaire, les troubles cognitifs et d'améliorer la qualité de vie des femmes ménopausées. Cependant, plusieurs études remettent en cause les bénéfices de ce traitement [37]. Une étude de 2006 montre que les THS augmentent le risque de cancer du sein de 25% [38]. Plus inquiétant, les THS augmenteraient le risque de maladie cardio-vasculaire, et d'accidents thromboemboliques. Ce risque serait moins important en cas de traitement court, et dès l'arrêt du traitement [39]. La contraception orale semble également être un facteur de risque du cancer du sein [39,40]. Le traitement de l'infertilité à base de diéthylstilbestrol (DES) augmente le risque de cancer du sein pour la descendance. En effet, il a été observé des cancers du sein plutôt agressifs à un âge assez jeune chez des femmes dont la mère avait été traitée par DES [39]. Par ailleurs, une interruption volontaire ou spontanée de grossesse augmenterait le risque de cancer du sein selon certaines études [41–43]; et n'aurait pas d'incidence pour d'autres auteurs [44–46]. Les stimulations hormonales lors d'AMP (Assistance Médicale à la Procréation) pourrait également augmenter le risque de cancer du sein [47–49].

C. Les facteurs histologiques

Des lésions bénignes ou malignes du sein peuvent selon les formes histologiques s'accompagner d'un risque accru de développer un cancer du sein. Des atypies épithéliales (métaplasie cylindrique atypique, hyperplasie canalaire ou lobulaire atypique) peuvent représenter des lésions précancéreuses. Les lésions bénignes comme les papillomes, les lésions sclérosantes, ou les adénofibromes peuvent aussi accroitre les risques de cancers du sein [50].

D. **Le mode de vie**

Les facteurs environnementaux sont très importants dans l'étiologie des cancers, cependant le détail de leur influence reste mal défini. En effet, dans le cas de populations migrant d'une zone géographique à faible incidence vers une zone géographique à forte incidence, le risque de développer un cancer atteint progressivement celui de la zone d'accueil [51].

L'implication des radiations ionisantes dans l'incidence des cancers du sein a été prouvée par deux approches. D'une part, l'analyse d'informations médicales concernant des femmes asiatiques exposées aux bombes atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki, a montré une augmentation des cas de cancers du sein chez les femmes âgées de moins de 40 ans au moment de l'exposition [52]. D'autre part, des données épidémiologiques de patientes exposées à des radiations dans le cadre médical vont dans le même sens [37,53]. De plus, la consommation d'alcool et de tabac, le surpoids, la sédentarité sont des facteurs de risque de survenue des cancers du sein [51]. Récemment, il a été montré que le travail de nuit, en perturbant le rythme circadien, prédispose au cancer du sein [54–56]. De même, le manque de sommeil accroît également les risques de cancers du sein [57]. Par ailleurs, la carence en vitamine D est un facteur de risque émergent dans les cancers du sein [58–61].

En conclusion, il convient de distinguer les facteurs de risque génétiques qui sont associés à un risque élevé de cancers du sein, des facteurs environnementaux ou liés au mode de vie, plus controversés et dont l'impact reste mal compris. En effet, de nombreux cancers surviennent en l'absence de tout facteur de risque identifié.

II. ANATOMO-PHYSIO-PATHOLOGIE DE LA GLANDE MAMAIRE

Le développement de la glande mammaire humaine se distingue de celui des autres tissus. En effet, il se déroule progressivement au cours de la vie fœtale, juvénile et adulte. A partir de la puberté, des cycles de prolifération et de différenciation cellulaires et d'involution (régression du tissu) se succèdent au rythme des cycles oestriens. La croissance et la différenciation complète de la glande mammaire ne se fera qu'au profit d'une première gestation. Afin de mieux comprendre l'anatomopathologie du sein (**D**), l'anatomophysiologie du sein sera brièvement présentée (**A**). Le développement de la glande mammaire (**B**) et le thème des cellules souches mammaires (**C**) seront également abordés.

A. **Anatomophysiologie du sein** [62]

Chez les mammifères, les glandes mammaires sont responsables de la lactation. Dans le lait maternel, le nourrisson puise tous les éléments nécessaires pour son développement : minéraux, vitamines, glucides, lipides et protéines. Parmi les protéines, on trouve les anticorps, nécessaires pour la défense immunitaire du tube digestif du nouveau-né. Les seins occupent la partie antéro-supérieure du thorax, de part et d'autre du sternum en avant des muscles pectoraux, en regard de l'espace compris entre la 3ème et la 7ème côte, le mamelon se situant au niveau de la 9ème vertèbre dorsale. En position debout, sous l'influence de son propre poids, le sein tombe légèrement, ce qui créé le sillon inframammaire entre la moitié inférieure du sein et le thorax. Cliniquement, le sein est divisé en quatre quadrants : supéro-externe, supéro-interne, inféro-externe et inféro-interne. Ceci ne correspond à aucune réalité anatomique, c'est une convention de « repérage ». L'aréole est un disque plus ou moins pigmenté qui entoure le mamelon.

La glande mammaire adulte comporte une vingtaine de lobes mammaires chacun drainé par un canal galactophore principal qui achemine le lait au mamelon (Figure 2.a). Chaque lobe est constitué de nombreux lobules et chaque lobule est formé par un groupe d'acini mammaires. L'acinus est une cavité glandulaire constituée d'une couche interne de cellules épithéliales sécrétoire, et une couche externe de cellules myoépithéliales. Ce tissu contractile permet l'éjection du lait en réponse au stimulus de succion. L'ensemble est séparé du tissu conjonctif par une membrane basale (Figure 2.b et Figure 3) [63]. Ces éléments fonctionnels sont entourés par du tissu conjonctif et du tissu adipeux. Le tissu conjonctif est constitué de cellules appelées fibroblastes qui participent à l'élaboration de la matrice extracellulaire. Des ligaments de soutien assurent un bon attachement du sein au muscle pectoral. D'abondants vaisseaux sanguins et des canaux lymphatiques assurent la nutrition et le drainage du tissu. Les canaux lymphatiques sont reliés aux ganglions lymphatiques : ganglions axillaires, sus-claviculaires et mammaires internes.

B. **Développement au cours de la vie** [62]

Sous le contrôle des hormones tout au long de la vie, le développement de la glande mammaire commence dès la vie embryonnaire (**i**). Celui-ci se poursuit à la puberté (**ii**), et se finalise lors de la première grossesse (**iii**). La ménopause entraîne l'atrophie de la glande mammaire (**iv**).

i. *Au cours de la vie embryonnaire*

À partir de la 4ème semaine, l'embryon mesure 8 mm. Il y a apparition de la crête mammaire qui est un épaississement bilatéral et linéaire de l'ectoderme depuis l'aisselle jusqu'à l'aine. Deux bourgeons mammaires apparaissent le long de cette crête, ils sont symétriques et situés au niveau pectoral. A la 6ème semaine, la crête mammaire disparaît, les deux bourgeons mammaires persistent et forment l'aréole. Cette étape constitue la fin de la période embryonnaire. Au cours du 5ème mois, les bourgeons mammaires s'invaginent dans le mésoderme sous-jacent en 15 à 20 prolongements cylindriques pleins, lesquels se dilatent à leur extrémité. Au 7ème mois, une lumière se creuse dans ces prolongements, c'est l'ébauche des canaux galactophores. Au 8ème mois, ces canaux s'ouvrent au niveau d'une dépression épithéliale située à l'emplacement du futur mamelon. En profondeur, les canaux se différencient en unités glandulaires. En fin de période fœtale, le sein est représenté par un léger relief cutané où se situent les orifices des canaux galactophores. L'aréole correspond à la zone de l'épiderme qui entoure le mamelon. Elle contient de nombreux bourgeons de glandes sudoripares et sébacées apocrines.

ii. *A la puberté*

A la naissance, la structure de la glande mammaire est inachevée. La glande reste au repos jusqu'à la puberté. Chez le garçon, la glande mammaire reste à ce stade toute la vie. Chez la fille, la puberté génère des modifications morphologiques significatives : augmentation du volume mammaire par augmentation du tissu mammaire et du tissu graisseux périphérique, et pigmentation rosée de l'aréole. Les sécrétions hormonales liées aux premiers cycles ovulatoires stimulent la croissance et la multiplication des canaux sous l'action des œstrogènes (Figure 4.a)[64]. Le tissu glandulaire, les lobules et les alvéoles se développent sous l'action de la progestérone. Durant chaque cycle menstruel, les seins subissent des fluctuations selon les variations des concentrations plasmatiques d'œstrogènes et de progestérone. Ces variations restent minimes car la suite du développement mammaire reprendra et s'achèvera lors de la première grossesse avec élaboration des structures permettant la lactation.

iii. *Période de grossesse et de lactation*

Au cours de la grossesse, la différenciation terminale de la glande mammaire est déclenchée par les hormones stéroïdes placentaires (œstrogène durant le 1^{ier} trimestre, progestérone au 2nd

et 3ième trimestre). Elle se caractérise par une prolifération des canaux excréteurs et le développement des acini (Figure 4.b). Vers le sixième mois de grossesse, les cellules épithéliales des acini sont pleinement différentiées en cellules sécrétrices. Deux à trois jours après l'accouchement, la chute des hormones placentaires associées à un pic de prolactine stimulent les cellules sécrétrices des alvéoles (Figure 4.c). Ces cellules lactogènes élaborent les différents composants du lait. La succion des mamelons lors des tétées a une double conséquence réflexe :

- sécrétion de prolactine : l'entretien de la sécrétion lactée pendant la période d'allaitement est lié à un réflexe neuro-hormonal dont le point de départ est la succion du mamelon et le résultat une sécrétion de prolactine par l'adénohypophyse.
- sécrétion d'ocytocine : la succion du mamelon déclenche la sécrétion réflexe d'ocytocine par l'hypothalamus. L'ocytocine entraîne la contraction des cellules myoépithéliales entourant les cellules sécrétrices et donc l'éjection du lait lors des tétées.

Lors du sevrage, la suppression des tétées entraîne l'arrêt de la production réflexe de prolactine. L'engorgement par accumulation de lait diminue l'accessibilité des cellules myoépithéliales à l'ocytocine. Du fait de l'accumulation du lait, l'épithélium mammaire se disloque, et des enzymes protéolytiques activées dégradent la matrice extracellulaire. Les cellules épithéliales s'engagent dans un processus important d'apoptose. L'arrivée massive de macrophages termine la dégradation du tissu sécréteur. Après quelques jours, la glande mammaire a repris sa structure de repos, sans toutefois retrouver exactement son état antérieur, car beaucoup des tubulo-alvéoles formés pendant la grossesse ne disparaissent pas entièrement (Figure 4.d). Cette involution de la glande mammaire après chaque grossesse est un processus de régulation crucial, permettant d'éliminer les cellules potentiellement mutées et précancéreuses. Il est à l'origine du rôle protecteur de la grossesse dans le cancer du sein [65].

iv. *A la ménopause*

Il se produit une involution progressive du système canaliculaire et des tubulo-alvéoles restants. La glande mammaire s'atrophie mais le volume du sein ne diminue pas toujours, et peut être remplacé par l'augmentation des tissus adipeux.

C. **Les cellules souches mammaires**

L'identification des cellules souches qui sont à l'origine de chaque organe représente une contribution essentielle à la compréhension des mécanismes régulant l'homéostasie de celui-ci en termes de renouvellement et de différenciation. La glande mammaire représente un modèle de choix pour l'étude des cellules souches tissulaires de par son existence cyclique [66]. Lors de chaque grossesse, la glande mammaire se développe puis involue lors du sevrage. Le développement de la majorité des autres organes a lieu lors de la vie embryonnaire et ne connait pas de cycle. Cette particularité a permis des avancées majeures dans la découverte, l'identification et l'isolement des cellules souches tissulaires.

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de s'auto renouveler et de se différencier en d'autres types cellulaires. Les cellules souches sont issues soit de l'embryon, soit du fœtus, soit de tissus adultes. Il existe plusieurs types de cellules souches. Les cellules souches unipotentes ne peuvent donner qu'une seule sorte de cellules différenciées. Les cellules souches multipotentes sont capables de donner naissance à quelques types cellulaires, spécifiques d'un lignage donné. Les cellules souches pluripotentes, retrouvées uniquement chez l'embryon (cellules ES) sont capables de donner naissance à tous les types cellulaires de l'organisme sauf les annexes embryonnaires. Les cellules souches totipotentes sont issues des premières divisions de l'œuf fécondé, et sont capables de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme et d'aboutir au développement complet d'un individu [67].

Jusqu'à peu, il était admis que la glande mammaire contenait un type de cellules souches multipotentes donnant naissance aux deux types de cellules épithéliales du sein, les cellules luminales et les cellules myoépithéliales. Ces études reposaient sur un protocole expérimental de greffe cellulaire [68,69]. Les travaux récents du groupe de Cédric Blanpain fondés sur le traçage cellulaire [70] montrent que la glande mammaire contient en réalité deux types de cellules unipotentes, une pour la lignée luminale et une pour la lignée myoépithéliale. En améliorant la connaissance du potentiel régénératif des deux types de cellules souches présentes dans la glande mammaire, cette découverte permettra une meilleure compréhension des différents sous-types de cancer du sein.

D. **Anatomo-pathologie du sein [71]**

Les carcinomes, d'origine épithéliale, représentent la quasi-totalité des cancers du sein (98%). Les tumeurs non-épithéliales comprennent les lymphomes mammaires, les sarcomes et les métastases intra-mammaires d'un autre cancer primitif. Il existe deux principaux types de carcinomes mammaires, in situ et invasifs. Dans les carcinomes *in situ*, les cellules

cancéreuses restent confinées à l'intérieur de la membrane basale (**i**). Dans les carcinomes invasifs, les cellules cancéreuses sont en contact direct avec le mésenchyme sous-jacent (**ii**). Les formes plus rares sont décrites en (**iii**).

i. *Les carcinomes non-infiltrants ou in situ*

Les dysplasies sont des troubles acquis de la multiplication cellulaire, suite à des altérations génétiques. Elles ne sont décrites que dans les épithéliums, et sont des lésions précancéreuses. Les cellules dysplasiques peuvent, inconstamment et dans un délai très variable, se transformer en cellules cancéreuses et former un carcinome. L'état dysplasique peut être diagnostiqué par le pathologiste grâce à des critères morphologiques : mitoses en nombre augmenté, augmentation des rapports nucléo-cytoplasmiques, anisocytose (hétérogénéité de la taille des cellules), anisocaryose (hétérogénéité de la taille des noyaux des cellules), troubles de la polarité cellulaire, et désorganisation de l'épithélium.

L'évolution d'une dysplasie est le carcinome *in situ*. Le carcinome *in situ* est dit aussi « non-invasif ». Il correspond à une prolifération de cellules épithéliales cancéreuses, sans franchissement de la membrane basale. Tous les épithéliums reposent sur une membrane basale qui sépare les cellules épithéliales du tissu conjonctivo-vasculaire sous-jacent. La membrane basale est une spécialisation de la matrice extracellulaire. Si les cellules cancéreuses sont issues des canaux galactophoriques, les tumeurs sont qualifiées de carcinomes canalaires (Figure 5.a) [72]. Si les cellules cancéreuses sont issues des lobules, les tumeurs sont appelées carcinomes lobulaires (Figure 5.b).

ii. *Les carcinomes infiltrants ou invasifs*

Les carcinomes invasifs se distinguent des carcinomes *in situ* par la rupture de la membrane basale (Figure 6) [63]. Les cellules tumorales envahissent le tissu conjonctif selon un processus actif et complexe, lié à l'acquisition de nouvelles propriétés biologiques du clone tumoral [73]. Les carcinomes invasifs se caractérisent par la présence d'un tissu conjonctif modifié, alors appelé stroma tumoral. Les carcinomes canalaires sont les plus fréquents (75% des invasifs) (Figure 5.c) et les lobulaires (Figure 5.d) sont plus rares.

iii. *Les formes rares de carcinomes*

Les formes rares de carcinomes décrites ci-dessous sont en général de meilleur pronostic que les carcinomes canalaires infiltrants, et représentent chacun 1à 2% des carcinomes infiltrants.

Le *carcinome médullaire* est un carcinome bien limité, constitué de cellules peu différenciées dans un stroma peu abondant. Le carcinome *mucineux,* aussi appelé carcinome colloïde, est formé de cellules cancéreuses qui sécrètent du mucus. Le carcinome *tubuleux* porte ce nom en raison de l'aspect tubuleux des cellules au microscope. Généralement, il ne se propage pas aux ganglions lymphatiques. Le carcinome *papillaire* peut être infiltrant ou non. Son architecture infiltrante est surtout faite de structures papillaires.

III. LA BIOLOGIE DU CANCER

Le processus de tumorigenèse est complexe et fait intervenir de nombreux acteurs. Ici, nous nous attacherons à présenter brièvement deux aspects de la biologie du cancer. C'est un mécanisme progressif (**A**) résultant d'événements épigénétiques et génétiques visant des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (**B**).

A. L'histoire naturelle du cancer

La transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse n'est pas la conséquence d'un événement unique mais résulte au contraire de l'accumulation d'événements. Hanahan et Weinberg ont réalisé plusieurs synthèses de la littérature sur le cancer. En 2000 [74], six caractéristiques des cellules cancéreuses sont définies : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, la capacité à échapper à l'apoptose, la capacité de se répliquer indéfiniment, l'induction de l'angiogenèse et la capacité à former des métastases. En 2011 [73], quatre autres particularités des cellules cancéreuses viennent compléter ce schéma : la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire, la capacité à échapper à une destruction par le système immunitaire, l'induction de l'inflammation, et l'instabilité et les mutations du génome.

Le processus de cancérisation comprend plusieurs étapes (Figure 7) [75]. La première étape s'appelle la phase d'initiation : une cellule épithéliale normale se transforme de manière irréversible en une cellule cancéreuse. Durant la phase d'expansion clonale, la tumeur primitive croit sous le contrôle de l'environnement (Figure 7.a). Pour assurer son développement, le tissu cancéreux a besoin de nutriments et d'oxygène, et induit l'angiogenèse (Figure 7.b). Durant cette phase de progression, les cellules acquièrent des propriétés invasives et migratoires (Figure 7.c).

Dans le tissu normal, les cellules épithéliales sont soutenues par le stroma. Celui-ci est constitué d'une matrice extracellulaire (MEC) insoluble, de fibroblastes, d'adipocytes et de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Sa fonction est d'assurer l'homéostasie du tissu en

régulant la prolifération, la différenciation et la mort des cellules épithéliales. Les cellules cancéreuses amorcent un dialogue avec le stroma, dégradent les composants de la matrice et se frayent un passage vers la circulation vasculaire ou lymphatique par intravasation (Figure 7.d). Elles utilisent celle-ci pour se déplacer. Au contact de l'endothélium cible, elles traversent à nouveau la paroi vasculaire ou lymphatique par extravasation (Figure 7.e et f). La cellule cancéreuse instaure un nouveau dialogue avec les composants cellulaires du tissu d'accueil afin de réunir les conditions nécessaires à sa survie et former une métastase [75].

B. Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs

La prolifération cellulaire est très précisément contrôlée de façon tissu-dépendante. Certaines cellules comme les neurones ne nécessitent pas un renouvellement constant, tandis que d'autres comme les cellules sanguines sont perpétuellement en cours de multiplication. Un équilibre entre facteurs activateurs et facteurs inhibiteurs permet le contrôle de la multiplication cellulaire en conditions normales. Toute altération de ce système déséquilibre l'homéostasie cellulaire. Dans le cas d'un excès de facteurs inhibiteurs, la cellule meurt et disparaît. Dans le cas d'un excès de facteurs activateurs, la cellule se divise de façon incontrôlée et peut donner naissance à un cancer. Les proto-oncogènes (forme sauvage) sont des facteurs activateurs de la division cellulaire. Lors de leur activation en oncogène (forme altérée), la prolifération cellulaire devient anarchique. Le mode d'action des oncogènes est dominant (l'altération d'un seul allèle est nécessaire). L'expression anormale d'un oncogène suffit à induire des modifications de la prolifération mais ne permet pas la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont généralement des facteurs inhibiteurs de la division cellulaire ou inducteurs de la mort cellulaire. Lors de leur inactivation, les processus entraînant la mort des cellules anormales sont défectueux, empêchant l'élimination d'une tumeur naissante. Le mode d'action des gènes suppresseurs de tumeurs est récessif (l'altération des deux allèles est nécessaire) [76]. Si l'altération génétique est présente uniquement dans certaines cellules de l'organisme, elle est appelée somatique. Si l'altération génétique touche toutes les cellules de l'organisme, elle est qualifiée de constitutionnelle ou germinale et peut être transmise à la descendance *via* les gamètes. Cependant, les cancers héréditaires identifiés comme tels ne sont pas fréquents (10%). Un gène suppresseur de tumeurs peut posséder un allèle normal et un allèle inactivé. Le patient asymptomatique peut alors transmettre la mutation à la descendance, engendrant une prédisposition au cancer pour les générations futures (cf. I-A).

Trois grands types de modifications génétiques peuvent altérer l'expression des gènes : les mutations, les translocations et les amplifications/délétions géniques. Les mutations sont des évènements ponctuels modifiant l'une des bases de l'ADN du gène. Par exemple, le gène *Ras* est un oncogène muté dans presque tous les cancers au niveau des codons 12 et 13 [77]. Cette modification entraîne la synthèse d'une protéine altérée. Sous sa forme normale, cette protéine stimule la multiplication cellulaire uniquement lorsqu'elle reçoit un signal de prolifération (le GTP). Sous sa forme mutée, elle stimule la multiplication cellulaire indépendamment de tout signal [78]. Les amplifications/délétions géniques correspondent à l'augmentation/diminution du nombre de copies d'un gène. Dans 20% des cancers mammaires, une amplification du locus contenant le gène *HER2* est retrouvé (cf. IV-A-ii). Les translocations chromosomiques sont des remaniements importants des chromosomes. Souvent, les translocations sont réciproques ; un fragment d'un chromosome est transféré sur un autre chromosome et vice-versa. Dans les LMC (Leucémie Myéloïde Chronique), une translocation entre les chromosomes 9 et 22 (chromosome de Philadelphie) est observée dans plus de 90% des cas [79]. Cette translocation fusionne le gène *BCR* (breakpoint cluster region) situé sur le chromosome 22 avec le gène *abelson* (*ABL1*) situé sur le chromosome 9. Le gène de fusion *BCR-ABL1* code une protéine avec une activité tyrosine kinase entrainant une activation continuelle de la division [80].

IV. LES MARQUEURS BIOLOGIQUES

La prise en charge des patients atteints de cancer est en pleine évolution. Les traitements standards sont remplacés progressivement par des traitements de plus en plus adaptés au profil moléculaire et biologique des tumeurs. Grâce au développement de nouveaux outils d'analyse à haut-débit (séquençage, puces, bio-informatique…) plus sensibles, plus rapides et plus fiables, et à la connaissance précise du génome, la médecine personnalisée est en plein essor. A terme, les cliniciens disposeront du profil génomique de chaque tumeur et d'un traitement spécifique à chaque sous-groupe. Pour caractériser les cancers du sein, plusieurs marqueurs biologiques et des traitements correspondants sont disponibles. Cependant, certaines patientes sont en échec thérapeutique. Aujourd'hui, il existe un réel besoin de nouveaux marqueurs dans les cancers du sein pour affiner la classification des tumeurs et permettre le développement de thérapies ciblées. Un marqueur est une caractéristique biologique mesurée de façon précise et reproductible. Les marqueurs peuvent être utilisés à visée diagnostique, pronostique, prédictive d'une réponse à un traitement, ou dans le cadre d'un suivi [81].

La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale s'accompagne de nombreux changements. La cellule se modifie au niveau morphologique et métabolique. Certains gènes sont réprimés tandis que d'autres sont surexprimés. La nature des gènes altérés aura des conséquences sur les propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses [73]. La pratique la plus courante jusqu'à présent est de rechercher des marqueurs biologiques dans la tumeur initiale, permettant de décrire la tumeur et de choisir un traitement. Ces marqueurs sont dits « non-circulants » (**A**). Cette pratique est fort utile en situation pronostique. Aujourd'hui, la mise au point de marqueurs « circulants » se développe de plus en plus, et favorise le suivi (**B**). Les modifications du tissu cancéreux ont des conséquences sériques [82]. Des paramètres sanguins peuvent être modifiés, et être rattachés à certaines localisations cancéreuses [83]. Par exemple, une augmentation des enzymes hépatiques sériques peut orienter vers des métastases hépatiques. Les marqueurs « circulants » présentent de nombreux avantages. De cout moindre en général, ils peuvent être réalisés sur une simple prise de sang [84].

A. **Les marqueurs « non-circulants »**

Les marqueurs dits « non-circulants » sont testés sur échantillon tumoral. Une première analyse est réalisée sur micro ou macro-biopsie en attendant l'analyse définitive sur pièce opératoire. Actuellement, les récepteurs hormonaux (**i**), l'HER2 (**ii**), le Ki67 (**iii**), uPA et PAI-1 (**iv**) sont dosés en routine au CHU de Strasbourg. Il existe également deux signatures moléculaires dont l'emploi est relativement répandu : l'Oncotype DX™ de 21 gènes (**v**) et le MammaPrint® de 70 gènes (**vi**).

i. *Les récepteurs hormonaux*

Les deux récepteurs hormonaux principalement impliqués dans les cancers du sein sont le récepteur aux œstrogènes (RE) et le récepteur à la progestérone (RP). Tous deux sont des récepteurs nucléaires, facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes cibles [85]. Ces deux récepteurs possèdent un mécanisme d'action similaire. Lorsqu'ils ne sont pas liés au ligand, ils sont dans le cytoplasme de la cellule liés à des protéines HSP (Heat Shock Protein) [86]. Après liaison du ligand, les protéines HSP se dissocient du récepteur, et le complexe ligand/récepteur est transloqué dans le noyau où il se dimérise. Là, il peut agir sur la transcription des gènes en se fixant sur des segments spécifiques de l'ADN, appelés PREs (Progesterone Response Elements) ou EREs (Estrogen Response Elements).

Concernant le RE, il existe deux isoformes: α et β, codés par deux gènes distincts [87]. Dans le cancer du sein, l'implication du RE β est encore mal connue. En revanche, RE α joue un rôle majeur dans la croissance des cellules cancéreuses mammaires. C'est une protéine de 67 kDa codée en 6q25.

Concernant le RP, il existe également deux isoformes : RPA et RPB [88]. Ces deux isoformes sont transcrites à partir de deux promoteurs situés sur un même gène en 11q22. RPA possède deux domaines d'activation de la transcription (AF1 et AF2). RPB en possède trois (AF1, AF2, et AF3).

L'expression de RE et de RP est évaluée dans la tumeur primitive sur pièce opératoire et/ou biopsie en cas de carcinome invasif. Une immunohistochimie (IHC) sur tissus formolés et inclus en paraffine est réalisée. L'analyse des lames comprend deux paramètres : le pourcentage de cellules marqués et l'intensité de la coloration (coté de 1 à 3). La lecture s'effectue au niveau des cellules cancéreuses pour les deux récepteurs (Figure 8) [89–91]. Le calcul de scores permet de fixer un seuil de positivité et de prendre la décision thérapeutique. Le score H est calculé en multipliant le pourcentage de cellules marquées à la cote de l'intensité de la coloration. Par exemple, une tumeur présentant 10% de cellules marquées avec une intensité de 2 aura un score H de 10*2=20. Le score H varie de 0 à 300, la tumeur est considérée RE+ ou RP+ dès que le score H est supérieur à 10. Le score Allred est un score allant de 0 à 8 prenant en compte le pourcentage de cellules marquées (aucune cellule marquée = 0, <1% de cellules = 1, de 1 à 10% de cellules = 2, de 10 à 33% de cellules = 3, de 33 à 67% de cellules = 4 et de 67% à 100% de cellules= 5) et de l'intensité du signal (de 0 à 3). Au CHU de Strasbourg, c'est le score H qui est utilisé.

Le récepteur aux androgènes (RA) est un récepteur nucléaire. Il fonctionne comme le RP et le RE ; il existe sous deux isoformes RA-A et RA-B [92]. De nombreuses études mettent en évidence un rôle pronostique pour le RA. Sa présence semble associée à une moindre chance de réponse à la chimiothérapie [93–96]. Ce récepteur pourrait être particulièrement intéressant pour les patientes « triple-negatif ».

ii. *Le statut Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2)*

Le proto-oncogène *HER2* ou *c- erbB2* est situé en 17q12. Ce gène code pour une protéine de 185 kDa nommée HER2. Elle fait partie de la famille des récepteurs HER transmembranaire à activité tyrosine kinase qui comprend 4 membres : HER1, HER2, HER3, et HER4. Ils sont impliqués dans la régulation de la croissance, de la survie et de la migration cellulaire [97].

HER1, HER3 et HER4 sont activés par liaison à des facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) ; HER2 n'a pas de ligand. HER2 se comporte comme un corécepteur. Il est activé par homo ou hétero-dimérisation avec les autres récepteurs de la famille HER [98]. Dans 95% des cas, la surexpression de la protéine HER2 à la surface des cellules cancéreuses mammaires est le résultat d'une amplification génique celle du locus 17q12-21, nommé amplicon HER2 [99]. Elle peut aussi être la conséquence d'altérations transcriptionelles, ou de mutations du gène [100]. HER2 est surexprimé dans environ 20% des cancers du sein. Il existe un traitement spécifique pour les tumeurs HER2 positives, le trastuzumab (cf. VI-E).

Afin d'établir la stratégie thérapeutique, le statut HER2 est testé dans tous les cancers du sein invasifs, sans restrictions d'âge, de type histologique ou de taille de la tumeur [101]. Il est déterminé sur tissus formolés et inclus en paraffine. Le score est déterminé par IHC dans un premier temps (Figure 9) [102]. Cette technique mesure l'expression de HER2 de manière semi-quantitative en se basant sur deux critères : l'intensité du signal et le pourcentage de cellules positives (Tableau 1) [103].

Lorsque le score d'IHC est 0 ou +, la tumeur est considérée HER2 négative, et la patiente ne sera pas éligible à un traitement par trastuzumab. Lorsque le score d'IHC est +++, la tumeur est considérée HER2 positive et le traitement par trastuzumab est recommandé. Lorsque le score d'IHC est intermédiaire (++), il faut rechercher les signes d'amplification du gène en réalisant une ISH (In Situ Hybridisation). Une ISH est une hybridation de l'ADN du patient avec une sonde ADN reconnaissant le gène HER2 et une deuxième sonde ADN reconnaissant le centromère du chromosome 17. L'énumération des signaux émis par les 2 sondes (HER2 et centromère 17) s'effectue en examinant les noyaux de la tumeur au microscope et permet d'obtenir un ratio du nombre de copies du gène HER2 par rapport à celui du chromosome 17 (Tableau 2) [103]. Ce sont les tests double sonde. Il existe aussi des tests qui comportent la sonde HER2 seule, ce sont les tests monosonde. La sonde est visualisable grâce à un fluorochrome dans un FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) (Figure 10)[101] ou par un chromogène dans un CISH (Chromogenic In Situ Hybridization) ou un SISH (Silver In Situ Hybridization). L'ISH permet de déterminer si la surexpression de HER2 observée en IHC est le résultat de l'amplification du gène ou non. En effet, il a été montré que les patientes répondant le mieux au trastuzumab présentaient soit une forte surexpression de HER2 (score IHC +++), soit une amplification du gène (ISH positive), soit les deux [104]. Malgré cette analyse poussée du statut HER2, une partie des patientes HER2 positives ne sont pas sensibles au traitement par le trastuzumab soit d'emblée, soit après une période de bonne réponse.

HER2 est un récepteur transmembranaire de type I, la partie extra-cellulaire de l'HER2 appelée HER-ECD ou HER2 sérique se trouve sous forme libre dans la circulation et peut être dosée par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays). Ce dosage peut potentiellement rendre compte de l'évolution de la maladie. Le seuil pathologique fixé pour HER-ECD est de 15ng/ml [105] . Le niveau sérique de l'HER2-ECD semble corrélé au grade tumoral, et au statut ganglionnaire [106]. Au vu des résultats de la littérature, il est aujourd'hui difficile de conclure sur l'intérêt du dosage de l'ECD au moment de la décision thérapeutique. Certaines études retrouvent une corrélation entre la réponse au traitement à la chimiothérapie adjuvante [107,108] et/ou le trastuzumab [109] et les concentrations sériques de l'ECD et considère HER-ECD comme un marqueur de suivi thérapeutique. En revanche, une méta-analyse récente reposant 63 études [110] ne met pas évidence d'intérêt clinique du dosage de l'ECD et recommande de ne plus le doser.

iii. *Le Ki67*

L'antigène Ki-67 est un marqueur de prolifération [111]. Cet antigène est présent au niveau du noyau des cellules prolifératives, en phase G1, S, G2 et M et absent des cellules quiescentes, G0. Sa fonction précise n'est pas connue mais sa participation au maintien du pouvoir prolifératif ou au contrôle du cycle cellulaire est suggérée. L'antigène Ki-67 est détecté par l'anticorps anti-Ki-67 en IHC et immunofluorescence (IF). Le pourcentage de noyaux colorés par l'anticorps anti-Ki-67 donne l'index Ki-67. S'il est élevé, cela signifie que les cellules cancéreuses se divisent rapidement, et oriente la patiente vers une chimiothérapie adjuvante [112]. Une méta-analyse portant sur 12 155 patientes de 38 études a démontré qu'un Ki-67 élevé est associé à un risque de rechute élevé [113]. Actuellement, l'estimation du seuil pathologique de Ki67 fait débat. Les recommandations de Saint Gallen sont les suivantes [114]. Une tumeur présentant un Ki-67 > 30% doit recevoir une chimiothérapie. Une tumeur présentant un Ki-67 < 15% ne nécessite pas de chimiothérapie. Si la tumeur présente un Ki-67 entre 16 et 30%, la décision thérapeutique est prise en fonction d'autres critères.

iv. *UPA et PAI-1*

Pour disséminer dans la circulation sanguine ou lymphatique et former des métastases, les cellules cancéreuses doivent être capables de franchir la membrane basale et de dégrader la MEC (cf. III-A). Les protéines de la matrice sont dégradées par un ensemble d'enzymes

protéolytiques, les protéases. La plasmine joue un rôle central dans l'activation des proenzymes en protéases actives. La plasmine existe elle-même sous forme inactivée, le plasminogène. Celui-ci est produit par le foie et sécrété dans le système vasculaire [115,116]. uPA et PAI-1 sont deux protéines impliquées dans l'hémostase. Le système fibrinolytique activateur du plasminogène comprend cinq molécules majeures :

- uPA (urokinase Plasminogen Activator) protéase de 53 kDa, activateur du plasminogène en plasmine.
- uPAR (urokinase Plasminogen Activator Receptor) récepteur du plasminogène
- PAI-1(Plasminogen Activator Inhibitor 1) and PAI-2 (Plasminogen Activator Inhibitor 2) inhibiteurs spécifiques de uPA
- tPA (tissue Plasminoge Activator) activateur tissulaire du plasminogène

Sous l'action de protéases, pro-uPA est clivé en uPA, permettant la liaison au récepteur uPAR. Cette liaison induit une transformation conformationelle de l'uPA avec exposition du site catalytique. UPA clive à son tour le plasminogène, inactif, en plasmine, active (Figure 11)[115]. Dans le tissu tumoral, la plasmine va dégrader les composants de la matrice extracellulaire (MEC) comme la laminine, la fibronectine et la fibrine. Elle peut aussi activer des proenzymes comme les métalloprotéases (MMP) impliquées dans les processus de dégradation de la MEC [116]. PAI-1 est le principal inhibiteur d'uPA, mais de manière surprenante, il n'est pas anti-tumoral. Après fixation sur le système uPA-uPAR, il permet l'internalisation du complexe par un mécanisme d'endocytose. Une accélération du turnover de l'uPAR est déclenchée. Le récepteur, après internalisation, est recyclé à la surface cellulaire [117]. Ainsi, uPA et PAI-1 sont impliquées dans les interactions entre la tumeur et son microenvironnement, via le processus de lyse nécessaire à la dégradation de la matrice menant à l'invasion. Elles jouent également un rôle important dans la prolifération, l'adhésion, la migration cellulaire et la néoangiogénèse tumorale.

Aujourd'hui, ces deux marqueurs bénéficient d'un niveau de preuve fort (LOEI) qui justifie leur appréciation systématique dans la prise en charge des patients. Le dosage d'uPA et PAI-1 est réalisé par un immunodosage ELISA sur pièce opératoire. Les patientes avec un faible taux d'uPA (<3 ng/mg de protéines) et de PAI-1 (<14ng/mg de protéines) sont considérées à faible risque de rechute et peuvent être écartées des indications de chimiothérapie adjuvante [118,119]. A l'inverse, pour les patientes présentant un taux fort d'uPA et/ou de PAI-1, une chimiothérapie sera discutée selon les autres facteurs de gravité.

v. *Oncotype DX™*

Oncotype DX™ permet l'analyse simultanée par PCR de l'ARNm correspondant à l'expression de 21 gènes (16 gènes liés au cancer et 5 gènes de référence) à partir de tissu inclus en parrafine. Les analyses sont réalisées dans un laboratoire unique aux Etats-Unis. Ce test concerne les patientes sans atteinte ganglionnaire, RE+ et recevant du tamoxifène [120]. Cette signature a pour objectif de classer les patientes en 3 niveaux de risques (faible, moyen, fort). Les patientes à risque faible de rechute pourraient être écartées des indications de chimiothérapie adjuvante [81]. Suite aux essais cliniques menés [121–123], ce test présente un niveau de preuve moyen (LOEII). Un essai randomisé est en cours (TAILORx).

vi. *MammaPrint®*

MammaPrint® permet l'analyse simultanée par puce de l'expression de l'ARNm de 70 gènes à partir de tissu tumoral congelé [124]. Les analyses sont réalisées dans un laboratoire unique à Amsterdam. Il concerne les patientes naïves de tout traitement, sans atteinte ganglionnaire dont la taille de la tumeur est inférieure à 5cm et âgées de moins de 61 ans. Il permettrait d'identifier un groupe à faible risque métastatique qui ne nécessiterait pas de chimiothérapie adjuvante. Il serait un facteur pronostique [125–127] . Cependant, ce test présente un niveau de preuve bas (LOEIII). Un essai multicentrique randomisé en cours depuis 2006 (MINDACT) évalue le bénéfice de cette signature sur une large cohorte de patientes.

B. **Les marqueurs « circulants »**

La CA-15.3 est un marqueur dosé en routine (**i**). L'analyse des CTC (Cellules Tumorales Circulantes), non encore utilisé en clinique, est une approche prometteuse (**ii**).

i. *Le CA15.3*

Le CA 15-3 (Carbohydrate Antigen) est une glycoprotéine de type mucine, produit du gène MUC1 en 1q21-2 s'exprimant dans de nombreuses cellules épithéliales normales (sein, utérus, ovaire…). Dans le cancer du sein, il est exprimé sur toute la surface des cellules mammaires épithéliales cancéreuses et dans les cellules métastatiques. Une partie est libérée dans la circulation sanguine. Le CA 15.3 n'est pas recommandé pour le dépistage ou le diagnostic du cancer du sein. En revanche, il est utilisé pour le suivi des patientes. En effet, il a été prouvé que son niveau augmente dans le sérum lors de la phase métastatique chez 50 à 80% des patientes [128]. Une valeur initiale élevée d'emblée (>30U/ml) suggère un stade avancé, voire

une dissémination métastatique. Des dosages réguliers de CA15.3 permettent de suivre les traitements et d'anticiper la détection des métastases par les méthodes conventionnelle d'imagerie médicale [129].

ii. *Les cellules tumorales circulantes (CTC) ou disséminées (DTC)*

Le processus métastatique est complexe. Les cellules cancéreuses de la tumeur initiale vont subir de nombreuses modifications leur permettant de passer avec succès les étapes successives du processus de dissémination (cf. III-A). Les cellules tumorales ayant atteint la circulation générale sont appelées les CTC (Circulating Tumor Cells), et les cellules ayant atteint un organe cible sont appelées les DTC (Disseminated Tumor Cells) ou micrométastases. Depuis une dizaine d'années, grâce à l'évolution des techniques, l'étude des CTC dans le sang s'est développée [130–134]. Après une étape d'enrichissement, les CTC peuvent être détectées dans le sang par RT-PCR ou immunomarquage. La technique par RT-PCR recherche des transcrits présents dans les cellules mammaires transformées et absents des cellules sanguines, comme la cytokératine 19 ou la mucine 1 [135,136]. La technique par immunomarquage utilise des anticorps dirigés contre ces mêmes cibles [137].

Dans une étude portant sur 177 patients atteints d'un cancer du sein métastatique le taux de CTC a été mesuré juste avant le début d'une nouvelle ligne de traitement puis lors de la première visite de contrôle. Une corrélation a pu être établie entre les taux de CTC et la survie sans progression [138]. Une étude récemment parue dans le Lancet [139] portant sur 302 patientes durant 35 mois est particulièrement intéressante. La présence de CTC prédit un risque de récidive précoce et de survie globale diminuée chez les patientes naïves de chimiothérapie atteintes de cancer du sein non métastatique.

Les perspectives d'utilisation des CTC sont nombreuses dans le cancer du sein, mais aussi dans d'autres types de cancers. Cet examen non-invasif pourrait permettre le suivi en situation adjuvante et serait un outil pronostique précieux en situation diagnostique. Cependant, cette approche nécessite des techniques sensibles (pour limiter les faux négatifs) et spécifiques (pour éviter les faux positifs). En effet, une microbiopsie ou un geste opératoire peuvent entraîner la libération de CTC dans la circulation générale et générer des faux-positifs. Des progrès méthodologiques sont encore nécessaires avant de pouvoir utiliser cette technique en routine [140].

V. CLASSIFICATION DES TUMEURS DU SEIN

Le cancer du sein est une maladie hétérogène. L'objectif des classifications de tumeur est de constituer des groupes homogènes de patients, et d'attribuer à chaque groupe ainsi formé une stratégie thérapeutique. Par ailleurs, les classifications permettent un échange plus aisé des informations entre professionnels de santé. Les classifications doivent être simples d'utilisation, précises et avec le moins d'ambigüité possible. Dans les cancers du sein, trois types de classifications sont actuellement utilisées : clinique (**A**), histologique (**B**), moléculaire (**C**).

A. Classification clinique

La classification clinique TNM (Tumor, Node, Metastasis) prend en compte principalement les données de l'examen clinique, de l'analyse anatomo-pathologique et de l'imagerie (Tableau 3)[103]. On distingue le stade cTNM qui est le stade clinique pré-thérapeutique du stade pTNM qui est le stade anatomopathologique post-chirurgical [141,142] La classification TNM tient compte de la taille de la tumeur primitive (T), de l'envahissement ganglionnaire local (N) et des métastases (M). Au niveau clinique, les différentes combinaisons possibles des indices TNM sont regroupées en 5 stades (Tableau 4)[103]. Le stade 0 est le moins avancé et correspond à la maladie *in situ*. Le stade IV est le plus avancé et correspond à la maladie métastatique.

B. Classification histologique

La classification de Scarff, Bloom et Richardson permet la détermination d'un grade histo-pronostique, elle apprécie le degré de différenciation des tumeurs [143]. Moins la tumeur est différenciée, plus le grade est élevé. Ce grade s'applique à tous les carcinomes infiltrants, mais pas aux carcinomes in situ. Il est actuellement recommandé d'utiliser le grade SBR modifié par Elston et Ellis, de valeur pronostique équivalente, et de reproductibilité supérieure au système SBR initial [144]. Celui-ci comprend 3 critères histologiques, cotés chacun de 1 à 3 (Tableau 5)[103] :

- le premier critère décrit la proportion de tubes ou glandes dans la tumeur en pourcentage de surface tumorale. Plus la proportion de tubes ou glandes est faible, plus la tumeur est peu différenciée.

- le second critère concerne le pléomorphisme nucléaire. C'est la capacité des noyaux des cellules à présenter des formes et des tailles différentes. Plus les noyaux sont pléomorphes, plus la tumeur est peu différenciée.
- le troisième critère intéresse le nombre de mitoses. Plus elles sont nombreuses, plus la tumeur est peu différenciée.

Le grade MSBR (modified SBR) prend en compte seulement deux des trois critères du SBR : le pléomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses (Tableau 6) [103]. Il est calculé en faisant la somme des scores obtenus pour chacun de ces deux critères. Le grade MSBR, noté de 1 à 5, permet de détacher deux groupes. Les groupes 1, 2 et 3 sont de bas risque métastatique et les groupes 4 et 5 sont à haut risque métastatique. Le grade MSBR est particulièrement utile au sein du groupe de garde II SBR. Une patiente SBR II, MSBR 2 ou 3 est considérée à faible risque de rechute métastatique et ne recevra pas de chimiothérapie adjuvante. A l'inverse, une patiente grade SBR II, MSBR 4 ou 5 sera considérée à fort risque métastatique et bénéficiera d'une chimiothérapie adjuvante.

Par ailleurs, le pathologiste évalue également l'angioinvasion de la pièce opératoire. La présence de structures carcinomateuses dans la lumière des vaisseaux lymphatiques ou sanguins peritumoraux (appelés emboles peritumoraux) est un critère pronostique important [145,146].

C. Classification moléculaire

Le cancer du sein est une maladie hétérogène au niveau moléculaire. Dans les années 2000 [125,147–151], les puces à ADN ont permis de mener des études génomiques à grande échelle et d'établir des classifications moléculaires des cancers du sein. Ces puces permettent l'analyse simultanée de l'expression de l'ensemble du génome. L'analyse des résultats par les méthodes de *clustering* permet de regrouper les tumeurs en fonction de leur profil d'expression génique. Les possibilités entrouvertes par les signatures moléculaires sont immenses. A terme, elles pourraient permettre une médecine sur mesure, avec un traitement adapté au profil moléculaire de chaque tumeur. Elles sont également des outils pronostiques. La première classification a été établie en 2000 [147]. Cinq types de carcinomes ont été identifiés par comparaison avec le tissu normal : RE+/luminal A et B, basal-like, HER2+ et normal-like. Plus récemment, des corrélations ont été établies vis-à-vis de l'origine des sous-types tumoraux. Chaque sous type moléculaire serait dérivé soit d'une cellule souche, soit d'un progéniteur, soit d'une cellule mature [150,152,153] (Figure 12)[149].

Récemment, des articles parus dans des revues prestigieuses mettent en évidence de nouveaux gènes impliqués dans les cancers du sein, et proposent de nouveaux sous-groupes pointant la diversité et la complexité moléculaire des cancers du sein. Une étude basée sur 997 tumeurs puis validée sur 995 tumeurs étudie les anomalies acquises (somatiques) du nombre de copies des gènes et identifie ainsi des sous-groupes pronostiques [154]. Une mutation du facteur de transcription CBFP serait récurrente dans les cancers du sein [155]. Une autre étude basée sur l'étude 100 tumeurs met en évidence différentes combinaisons de mutations de gènes [156]. Une signature de 9 microARN permettrait le diagnostic différentiel des carcinomes canalaires *in situ* des invasif [157].

Ces analyses génomiques ne sont pas pratiquées en routine. En pratique clinique, seul un nombre restreint de gènes sont étudiés par IHC. Ici, nous nous attacherons à décrire la classification utilisée actuellement selon la conférence de consensus de Saint-Gallen [114]. Elle comporte 4 groupes : luminal-like (**i**), HER2+ (**ii**), triple-négatif (**iii**) et cas particuliers (**iv**) (tableau 7) [114].

i. *Luminal-like*

Ces tumeurs expriment le récepteur aux œstrogènes (RE) et/ou le récepteur à la progestérone (RP) et représentent 60% des patientes. Elles possèdent un profil moléculaire proche de celui des cellules luminales différenciées des canaux mammaires et expriment des marqueurs luminaux comme les cytokétatines 8/18 et 19 (Figure 12). Il existe trois sous-types :

- *luminal A* : ce groupe RE+/RP+/HER2-, de statut prolifératif faible (Ki67 faible), est traité par hormonothérapie exclusive sauf si facteur de risques associés.
- *luminal B/HER2-* : ce groupe RE+ et/ou RP+, HER2-, de statut prolifératif fort (Ki67 fort), est traité par hormonothérapie +/- chimiothérapie.
- *Luminal B/HER2+ :* ce groupe RE+ et/ou RP+, HER2+, de statut prolifératif indifférent, est traité par hormonothérapie, chimiothérapie et trastuzumab.

ii. *HER2+*

Ces tumeurs surexpriment le récepteur HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor type II) et seraient issues d'un progéniteur luminal tardif (Figure 12) [158]. Elles concernent environ 20% des patientes. Initialement de très mauvais pronostic, elles bénéficient aujourd'hui d'une thérapie ciblée par l'herceptin (Trastuzumab ®). Cependant, la réponse au traitement est très variable selon les patientes. Il existe deux sous-types :

- *Luminal B/HER2* : ce groupe RE+ et/ou RP+, HER2+, est traité par hormonothérapie, chimiothérapie et trastuzumab.
- *HER2+ non luminal* : ce groupe RE-/RP-/HER2+ est traité par chimiothérapie et trastuzumab.

iii. *Triple-négatif*

Ces tumeurs n'expriment ni RE, ni RP, ni HER2, d'où leur nom de triple négatif. Elles expriment au moins un des marqueurs des cellules basales (ou myoépithéliales) comme les cytokératines 5 et 6, la vimentine. Elles représentent 10% des patientes. De prise en charge difficile, ces tumeurs de mauvais pronostic sont traitées par chimiothérapie. Il existe deux sous-types :

- *basal-like* : ces tumeurs seraient issues de progéniteurs luminaux, et non basaux [150] (Figure 12). Elles représentent certainement un sous-groupe moléculaire hétérogène de tumeurs.
- *claudin-low* : ces tumeurs seraient issues des cellules souches mammaires (Figure 12). Elles ont une expression faible des claudines, et de l'E-cadhérine, caractéristique de la transition épithélio-mésenchymateuse.
- *Normal-like* : de pronostic intermédiaire, ces tumeurs présentent un profil moléculaire proche du tissu mammaire normal. Aujourd'hui, ce sous-groupe est remis en question. Il serait issu d'échantillons de tumeurs contenant une grande proportion de cellules épithéliales normales [159–161].

iv. *Cas particuliers*

Ce groupe est constitué de tumeurs hormonosensibles (cribiformes, tubuleux et mucineux) traitées par hormonothérapie et de tumeurs non-hormonosensibles (apocrine, médullaire, adénoide kystique et métaplasique) traitées par chimiothérapie.

VI. LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES

A. La chirurgie

Chirurgie tumorale

La chirurgie conservatrice repose sur l'exérèse complète de la lésion cancéreuse, avec obtention de berges saines et d'un résultat esthétique acceptable. Elle n'est possible que si la tumeur est unique ou assez petite ou dans le cas de deux foyers proches et si la patiente est d'accord. La chirurgie non conservatrice consiste en une mastectomie totale. Il s'agit de retirer la totalité de la glande mammaire entre le revêtement cutané et le muscle pectoral, y compris l'aréole et le mamelon. La patiente peut choisir une mastectomie d'emblée. Une chirurgie reconstructrice est systématiquement proposée. Le cancer du sein inflammatoire constitue une contre-indication à une chirurgie initiale. Les complications liées à la chirurgie sont des troubles de la cicatrisation, des séquelles esthétiques, des douleurs locales. Ces complications restent assez rares. En revanche, les traumatismes psychiques sont plus fréquents. Une opération du sein peut être vécue comme une véritable mutilation. La patiente est atteinte au cœur de son intimité et de sa féminité. Après l'opération, la patiente peut ressentir un réel mal-être avec une perte de désir sexuel, une altération de l'image de soi, des angoisses. Un soutien psychologique est parfois nécessaire.

Chirurgie axillaire

En cas de carcinome invasif, la chirurgie mammaire s'accompagne d'un geste chirurgical axillaire homolatéral, appelé « technique du ganglion sentinelle » (Figure 13) [103]. Il s'agit de repérer le premier ganglion recevant le drainage lymphatique axillaire du sein et de le retirer. En théorie, en cas de métastases ganglionnaires, c'est le premier ganglion envahi [162]. La double détection isotopique et colorimétrique du ganglion sentinelle constitue la technique de référence [163]. La détection colorimétrique est réalisée par injection au niveau péri-aréolaire de bleu de méthylène en début d'intervention. La détection isotopique est réalisée par injection au niveau péri-aréolaire d'un colloïde marqué avec du technétium la veille ou le matin de l'intervention. En tant que corps étranger, ce produit radioactif est capté par les macrophages au niveau du premier ganglion de la chaine axillaire. Lors de l'intervention, le chirurgien détecte le ganglion radioactif à l'aide d'une sonde. Suivant le niveau de radioactivité, la sonde émet un signal plus au moins fort [164].

Après analyse du ganglion par le pathologiste, un curage axillaire sera indiqué uniquement si le premier ganglion est envahi. Outre sa valeur pronostique majeure, il existe un risque de dissémination des atteintes ganglionnaires. Le curage axillaire consiste en l'exérèse d'au moins 10 ganglions. La technique du ganglion sentinelle permet d'éviter de nombreux curages axillaires [142], et de réduire la morbidité [165]. Une gamma caméra opératoire destinée à l'examen scintigraphique des aires ganglionnaires a également été développée [166,167]. Après prélèvement des ganglions sentinelles, la gamma caméra permet de mettre en évidence la présence d'éventuels ganglions non détectés. Des troubles sensitifs, des douleurs, un lymphœdème peuvent apparaître à la suite d'un curage axillaire.

B. La radiothérapie

La radiothérapie complète la chirurgie. Elle a pour objectif d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles du lit tumoral. Elle peut être localisée au niveau de la glande mammaire, de la paroi thoracique ou des aires ganglionnaires selon les facteurs de risques. [142]. Une méta-analyse récente montre que chez des patientes traitées par tumorectomie, la radiothérapie réduit le risque de récidive à 10 ans de 15% et de décès par cancer du sein [168].

La radiothérapie est un traitement par émissions de rayons X à haute énergie émis en faisceau. Les rayons traversent la peau pour atteindre les tissus tumoraux et détruire les cellules cancéreuses. Les cellules saines sont beaucoup moins sensibles aux irradiations car elles possèdent des mécanismes de réparation de l'ADN, et peuvent se régénérer entre deux séances. Malheureusement, les cellules souches cancéreuses sont également résistantes à la radiothérapie [169].

La radiothérapie peut engendrer un érythème cutané, un œdème du sein, des douleurs et de la fatigue. Plus tardivement, des fibroses, des télangiectasies (dilatations de petits vaisseaux en forme d'étoile) peuvent apparaître. Des cas de pneumopathie et de toxicité cardiaque ont été rapportés.

C. La chimiothérapie

Les cytotoxiques sont des molécules inhibant la prolifération et entraînant la mort de toutes les cellules. Les cytotoxiques touchent les cellules cancéreuses et les cellules saines (à l'origine des effets secondaires). Cependant, les cellules cancéreuses se répliquent plus rapidement que les cellules saines ; elles sont donc plus sensibles à ces thérapies. Les cellules souches cancéreuses sont généralement chimio-résistantes [169]. Les cellules hématopoïétiques se multiplient rapidement et sont en partie détruites lors des cures. Le temps de repos entre

deux cures permet la régénération des cellules souches saines. Une neutropénie (augmentant le risque d'infections), une anémie et une thrombopénie (augmentant le risque hémorragique) peuvent se manifester.

Administrer une chimiothérapie adjuvante (après l'opération) ou non est souvent un choix thérapeutique difficile pour les cliniciens [161]. Dans certains cas intermédiaires, la balance bénéfice/risque est difficile à équilibrer. D'une part, ces traitements lourds d'effets indésirables et pouvant être la cause de cancers chimio-induits, amoindrissent la qualité de vie des patientes. D'autre part, ils diminuent le risque de dissémination à distance. Différents paramètres sont pris en compte : âge, état général, comorbidités, taille de la tumeur, grade histologique, envahissement ganglionnaire, statut des récepteurs RE, RP, HER2, index Ki67, et uPA/PAI-1 [170]. Le logiciel internet « Adjuvant ! on line » aide à évaluer le risque métastatique et la nécessité d'une chimiothérapie adjuvante [171–173]. Cependant, ce logiciel construit à partir d'une base de données américaine ne prend en compte ni le statut HER2, ni le statut RP, ni le statut proliferatif [174]. Lors des RCP (Réunion de Concertation Pluridisciplinaire), chaque dossier est examiné par les différents acteurs de la prise en charge de la patiente afin de décider de la meilleure stratégie thérapeutique (cf. VII-C).

Les traitements actuels associent plusieurs drogues de manière répétée selon des cycles courts. Les protocoles comportent en général 4 à 8 cures, espacées de 21 jours [142]. Les schémas thérapeutiques les plus souvent utilisés sont énoncés ci-dessous. Les caractéristiques principales sont présentées dans le tableau 8 [175].

- 6 FEC 100: 5-fluoro-uracile (5FU) + epirubicine + cyclophosphamide
- 3 FEC 100 puis 3 TXT : TXT = Taxotère® = docétaxel
- 4 AC : Adryamicine® (= doxorubicine) + cyclophosphamide
- 4 AC puis 4 TXT
- 6 TAC : Taxotère® = docétaxel + Adryamicine® (= doxorubicine) + cyclophosphamide

L'administration d'une chimiothérapie avant l'opération constitue un cas particulier. On parle de chimiothérapie néo-adjuvante. Elle est indiquée en cas de cancer inflammatoire ou lorsque la patiente est désireuse d'un geste conservateur alors qu'il est impossible d'emblée. Dans tous les cas, elle doit être mise en route rapidement.

D. L'hormonothérapie

Le sein est soumis de manière physiologique à l'influence des hormones stéroïdiennes, les œstrogènes et la progestérone. Dans deux-tiers des cancers du sein, la présence du récepteur RE suggère que le développement de la tumeur est sous le contrôle de ces hormones. Afin de

contrecarrer l'effet mitogène des stéroïdes, il existe deux types de stratégies : soit inhiber la synthèse de l'hormone, soit bloquer les récepteurs. Dans tous les cas, une hormonothérapie ne peut être prescrite qu'en cas de tumeurs hormonosensibles (RE et/ou RP+). Elle dure le plus souvent 5 ans.

La progestérone n'est pas la cible de l'hormonothérapie. Cependant, l'expression du récepteur à la progestérone reflète la fonctionnalité du récepteur aux œstrogènes. Le récepteur à la progestérone a une valeur pronostique. Les tumeurs RE-/RP+, assez rares, répondent au tamoxifène [176].

Avant la ménopause, les anti-oestrogènes sont indiqués. Ils agissent comme des antagonistes du récepteur RE, ils inhibent de façon compétitive la liaison de l'œstradiol à ses récepteurs. Le tamoxifène (Nolvadex®) est indiqué en 1ière intention.

Après la ménopause, les anti-aromatases sont indiqués. Ils inhibent l'aromatase, bloquant la conversion des androgènes en œstrogènes. L'exemestane (Aromasine®) est un inhibiteur stéroïdien, il agit comme un analogue des androgènes (faux substrat). L'anastrozole (Arimidex®) et le létrozole (Femara®) sont des inhibiteurs non stéroïdiens, qui se lient à l'enzyme de manière non compétitive.

La castration chirurgicale irréversible par ovariectomie ou la castration chimique réversible par des agonistes de la LH-RH (leuproréline/Enantone®, goséréline/Zoladex®) peut être discutée dans certains cas.

E. **Thérapie ciblée**

Les thérapies ciblées anti-HER2 ont amélioré la prise en charge des tumeurs HER2+ de mauvais pronostic. Le trastuzumab (Herceptin®) est un anticorps monoclonal humanisé qui cible la partie extra cellulaire du récepteur HER2. Il est indiqué dans le traitement du cancer du sein métastatique et précoce. En traitement adjuvant après chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie, il diminue par deux le risque de rechute et par trois le risque de décès [177]. La durée de traitement est de 1 an. En raison de sa toxicité cardiaque, une surveillance de la fraction ventriculaire gauche (FEV) est nécessaire avant, pendant et après l'arrêt du traitement [178].

Le lapatinib (Tyverb®) est un inhibiteur de tyrosine kinase qui inactive le récepteur HER2 [179]. Il est indiqué dans les cancers du sein métastasiques [180], le trastuzumab ne pouvant franchir la barrière hémato-encéphalique.

Un nouvel agent thérapeutique, dérivé du trastuzumab est actuellement à l'essai. Le T-DM1 est composé d'un anticorps trastuzumab relié à la cytotoxine mertansine (DM1). Cette

thérapie permet de cibler les cellules HER2+ par l'activité anti-HER2 du trastuzumab et de les détruire par l'activité cytotoxique du DM1. Récemment, les résultats de l'essai EMILIA, une étude internationale randomisée de phase III, ont été dévoilés et sont encourageants [181]. Le T-DM1 augmente significativement la survie sans progression des patientes souffrant d'un cancer HER2+ localement avancé ou métastatique, et qui ont préalablement été traitées par une taxane et le trastuzumab.

VII. LE PARCOURS D'UNE PATIENTE

A. La découverte de la maladie

A ce jour, le dépistage est le seul moyen de déceler un cancer du sein naissant. Un diagnostic précoce permet de limiter les traitements lourds, améliore les chances de guérison et le pronostic vital. Le Bas-Rhin est un département pilote dans ce domaine. Dès 1989, l'ADEMAS (Association pour le Dépistage des Maladies du Sein) a organisé dans le Bas-Rhin le premier programme de dépistage de cancer du sein. Depuis 2004, ce programme a été étendu à tous les départements français. Un dépistage du cancer du sein est proposé tous les deux ans, par courrier personnalisé, à toutes les femmes de 50 à 74 ans inclus. Il comprend un examen clinique systématique, une mammographie avec deux clichés par sein et des clichés supplémentaires si nécessaires. Les clichés bénéficient d'une double lecture. Des examens complémentaires immédiats sont réalisés en cas d'images anormales. Pour les femmes à risque, des mammographies peuvent être prescrites avant 50 ans. Néanmoins, 50% des cancers du sein sont découverts par la patiente elle-même.

La maladie peut également être découverte grâce à des éléments cliniques évocateurs comme la palpation d'une grosseur mammaire, la présence d'un écoulement mamelonnaire, une rétraction cutanée ou la présence d'adénopathies axillaires (figure 14).

B. Le bilan initial et d'extension

Devant une suspicion de cancer du sein, un bilan comprenant l'anamnèse (histoire de la maladie), l'interrogatoire de la patiente et l'examen clinique est réalisé. L'interrogatoire recherche les facteurs de risques comme les antécédents personnels et familiaux de cancer. L'examen clinique est constitué d'une observation détaillée des seins et des aires ganglionnaires et sus-claviculaires, et d'une description de la tumeur (taille, mobilité, évolutivité, topographie). Les signes d'appels pouvant évoquer une maladie métastatique comme des douleurs osseuses ou une hépatomégalie sont recherchés. La mammographie, de

face et de profil, constitue l'examen d'imagerie de référence des lésions du sein. En cas de suspicion diagnostique, clinique ou mammographique, elle est complétée par une échographie mammaire bilatérale comprenant les aires axillaires. La classification ACR (American College of Radiology) apporte la conclusion du bilan d'imagerie (Tableau 9) [103].

Devant une suspicion de malignité, une confirmation anatomopathologique est nécessaire. Le radiologue réalise une micro ou macrobiopsie. Il s'agit d'un prélèvement à l'aide d'une aiguille sous anesthésie locale. On parle de microbiopsie si l'aiguille mesure de 3 à 5 mm, de macrobiopsie, si elle mesure de 5 à 10 mm. Le radiologue est guidé par imagerie, mammographie ou échographie pour prélever au niveau de la lésion. A la fin de la biopsie, une agrafe métallique (clip) est généralement posée au niveau du prélèvement pour repérer le site suspect. L'examen anatomopathologique du prélèvement donne le diagnostic de malignité et le type histologique. Il permet d'apprécier des éléments pronostiques et de réponse au traitement : grade SBR, statut RE, RP, HER2, caractère invasif.

Le bilan d'extension est réalisé en cas de signes d'appel clinique de métastases, de carcinome infiltrant ou de carcinome inflammatoire. Il comprend généralement une radiographie thoracique, une scannographie thoracique et abdominale ou une échographie abdomino-pelvienne, et une scintigraphie osseuse. Si le clinicien a besoin d'informations supplémentaires (anomalie clinique sans traduction mammographique ou échographique par exemple), une IRM peut être réalisée.

C. La Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP)

Les RCP réunissent différents professionnels de santé, impliqués dans la prise en charge des patients cancéreux : cancérologue, radiologue, pathologiste, radiothérapeute, pharmacien. Le médecin traitant peut aussi y participer. Tous les patients atteints de cancer sont présentés en RCP. Ces réunions ont lieu 1 à 4 fois par mois selon l'activité du service. Lors de ces réunions de travail, les dossiers des patients sont discutés afin d'établir la meilleure stratégie thérapeutique possible pour chacun. Les professionnels évaluent les bénéfices et les risques de chaque traitement pour chaque patient.

D. La prise en charge thérapeutique de la maladie non métastatique

Cancers *in situ*

Le premier traitement est la chirurgie conservatrice ou non conservatrice. Un geste axillaire peut être indiqué en cas de lésion palpable ou de suspicion de micro-invasion. La chirurgie est

suivie d'une radiothérapie de la glande mammaire. L'irradiation de la paroi thoracique et des aires ganglionnaires ne sont pas indiquées à priori en cas de carcinome *in situ*. En général, un traitement adjuvant n'est pas nécessaire.

Cancers invasifs

Si la tumeur est supérieure à 3cm, un traitement néo-adjuvant préalable est parfois nécessaire pour diminuer la taille de la tumeur avant la chirurgie. Celle-ci est conservatrice ou non conservatrice, et accompagnée d'un geste axillaire homolatéral. La chirurgie est contre indiquée en cas de cancer du sein inflammatoire. En cas de chirurgie conservatrice, la radiothérapie de la glande mammaire est systématique. En cas de mammectomie, elle a certaines indications. Selon les facteurs pronostiques associés, elle comprend la paroi thoracique et/ou les aires ganglionnaires [142].

Après examen anatomopathologique des pièces opératoires, quatre situations sont possibles :

- récepteurs HER2- / RH- : traitement par chimiothérapie
- récepteurs HER2-/RH+ : traitement par hormonothérapie (5 ans) +/- chimiothérapie selon facteurs de risques
- récepteurs HER2+/ RH-, traitement par chimiothérapie + trastuzumab (1an)
- récepteurs HER2+/RH+ : traitement par chimiothérapie + trastuzumab (1 an) + hormonothérapie (5 ans)

E. La prise en charge thérapeutique de la maladie métastatique

Le traitement de la maladie métastatique doit être le moins toxique possible et privilégier la qualité de vie ; il n'est pas curatif. La chirurgie n'est pas indiquée. Un traitement loco-régional par radiothérapie peut être envisagé. En cas de métastases cérébrales, osseuses, hépatiques ou pulmonaires, un traitement par radiothérapie peut être une option à discuter en RCP. Après examen anatomopathologique de la tumeur primitive (si celui-ci est possible), quatre situations sont possibles :

- Tumeurs triples négatives (récepteurs HER2-/RH-) : traitement par chimiothérapie
- Tumeurs luminales (récepteurs HER2-/RH+) : traitement par hormonothérapie + chimiothérapie si évolution rapide (sans chimiothérapie si évolution lente)
- Tumeurs HER2 non luminales (récepteurs HER2+/ RH-) : traitement en 1^{ière} ligne par taxanes +trastuzumab, ou anthracycline + taxane ; en 2ième ligne capecitabine + lapatinib
- Tumeurs HER2 luminales (récepteurs HER2+/RH+) : traitement par chimiothérapie + trastuzumab ou hormonothérapie + trastuzumab

F. La surveillance

Elle a lieu 2 fois par an les 5 premières années, puis tous les ans. Elle comprend un interrogatoire, un examen clinique, une mammographie +/- echographie +/- IRM .

VIII. LES CAS PARTICULIERS

A. Cancer du sein chez l'homme

Le cancer du sein chez l'homme est très rare ; il représente moins de 1% des cas de cancer du sein [182]. Les facteurs de risques sont les antécédents familiaux, les antécédents d'irradiation et les mutations des gènes *BRCA1* et surtout *BRCA2* [183]. Les cancers du sein chez l'homme sont diagnostiqués 5 ans plus tard en moyenne que chez la femme et à un stade plus avancé [184,185]. Le sous type le plus fréquent chez l'homme est le sous-type luminal, particulièrement le B [186,187]. Dans ce cas, le traitement de référence, après la mastectomie, est le tamoxifène [188]. Les cancers HER2+ sont très peu fréquents.

B. Cancers du sein associés à la grossesse

Les cancers du sein associés à la grossesse sont assez rares. Cependant, leur incidence augmente chaque année. Les raisons ne sont pas claires mais l'âge tardif des grossesses est évoqué [189]. Les cancers du sein associés à la grossesse comprennent les cancers diagnostiqués pendant la grossesse, ainsi que ceux diagnostiqués dans l'année suivant l'accouchement [190]. Pour certains auteurs, cette définition est un peu large car les cancers diagnostiqués dans l'année après la naissance n'ont pas nécessairement été initiés pendant la grossesse [189]. Les cancers associés à la grossesse ont le plus souvent un phénotype agressif. Ces cancers expriment peu les récepteurs hormonaux, cependant leur croissance semble sous l'empire des hormones stéroïdes [191–193]. Actuellement, les interruptions thérapeutiques de grossesses sont rares et il n'est pas nécessaire d'attendre l'accouchement pour traiter la patiente. La chirurgie est envisageable tout le long de la grossesse, la radiothérapie doit être évitée du fait des malformations fœtales qu'elle peut entraîner et la chimiothérapie doit être discutée au cas par cas selon le stade de la maladie, l'avancement de la grossesse, et les souhaits de la patiente [194].

CHAPITRE 2. LES PROTEINES EN TREFLE

Au début des années 80, l'équipe de Pierre Chambon a effectué un criblage d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) provenant de cellules épithéliales de la lignée cancéreuse MCF7. Cette lignée issue d'une métastase pleurale de cancer primaire du sein humain représente le modèle cellulaire de cancer de type luminal que l'on qualifie aussi de RE+. Ce criblage a permis la découverte de la protéine nommée pS2 [195], isolée par d'autres sous le nom de pNR2 ou BCEI (Breast Cancer Estrogene Induced protein) et qui a été rebaptisée plus tard, TreFoil Factor 1 ou TFF1 [196]. Le gène *TFF1* code une protéine de 84 acides aminés sous sa forme native [197], exprimée et sécrétée par la muqueuse de l'estomac humain sain [198]. A la même époque, deux autres protéines de structure similaire sont découvertes. Premièrement, TFF2 ou SP (Spasmolytic Protein) est isolée à partir de pancréas de porc [199]. Le gène *TFF2* code une protéine de 106 acides aminés, remarquablement résistante aux protéases grâce à sa structure tertiaire riche en ponts disulfures [199,200]. Cette protéine est également présente dans l'estomac murin et humain sain. Deuxièmement, TFF3 ou ITF (Intestinal Trefoil Factor), protéine de 81 acides aminés, est isolée à partir d'intestin de rat [201]. Chez l'homme, il est particulièrement exprimé dans l'intestin humain sain [202].

Nous nous intéresserons aux gènes TFF (**I**) et à la structure des protéines codées par ces gènes (**II**). Puis, nous nous pencherons sur la localisation (**III**) et la fonction (**IV**) des protéines TFF dans les tissus normaux, et puis dans les tissus cancéreux (**V**).

I. LES GENES TFF

A. Structure des gènes

Les gènes codant pour ces trois protéines sont localisés sur le bras long du chromosome 21 en 21q22.3, de manière contigüe formant ainsi un cluster sur une région d'environ 50kb [203–205]. Du télomère au centromère, les gènes sont dans l'ordre suivant : hTFF1, hTFF2, hTFF3 (h pour humain). Des similitudes dans la structure de ces trois gènes suggèrent qu'il sont issus d'un ancêtre commun ayant subi des duplications [206]. Ils possèdent un exon codant la partie N-terminale, un exon (deux pour TFF2) codant le domaine conservé dit domaine P ou domaine en trèfle (TFF), et un exon codant la partie C-terminale [207]. Cependant, même s'ils sont exprimés dans les mêmes organes ou dans des organes proches en conditions physiologiques, leur transcription est sous le contrôle de trois promoteurs différents [206]. Les mécanismes de régulation de l'expression de cette famille de gènes sont nombreux et complexes [208].

B. **Régulation des gènes *TFF***

L'expression des gènes *TFF* est régulée par la présence d'éléments de réponse à des facteurs de transcription dans les régions promotrices et par des mécanismes épigénétiques. Les mécanismes épigénétiques représentent un processus dynamique qui régule l'expression des gènes sans altérer les séquences nucléotidiques.

Le promoteur du gène *TFF1* possède un ERE (Estrogen Response Element). C'est une séquence palindromique imparfaite [209]. Certains auteurs retrouvent deux ERE dans le promoteur du gène *TFF3* [208,210]. Néanmoins, des études menées sur l'ensemble du génome ne retrouvent pas de ERE dans le promoteur du gène *TFF3* alors que toutes citent la présence d'un ERE dans le promoteur de *TFF1* [211–215]. En revanche, l'expression des protéines TFF1 et de TFF3 est stimulée par les œstrogènes dans des lignées humaines de cancer du sein luminales (RE+) [216,217]. Il existe certainement un mécanisme de régulation du gène *TFF3* par les estrogènes, mais celui-ci pourrait être indirect, par l'intermédiaire d'un autre facteur de transcription contrôlé par le RE ou par activation de la chromatine. Bien que des RE soient exprimés dans l'estomac humain [218] et le colon [219], *TFF1* et *TFF3* ne semblent pas être régulés par les œstrogènes dans ce tissu.

Le facteur de transcription GATA-6, qui joue un rôle important dans le développement de plusieurs organes du tractus digestif, active l'expression de *TFF1* et de *TFF2*, dans l'estomac, mais pas celle de *TFF3*, exprimé principalement dans l'intestin [220]. L'expression de *TFF1*, *TFF2* et *TFF3* est réprimée par NFκB et C/EBPβ [221,222]. Le promoteur du gène *TFF1* possède des éléments de réponse au TPA (Tumour Promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-Acetate), à l'EGF (Epidermal Growth Factor), aux oncoprotéines c-Ha-ras et c-jun [223]. L'expression de *TFF2* est stimulée par les facteurs de transcription STAT-6, USF (Upstream Stimulating Factor) et PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) [224,225]. Le promoteur du gène *TFF3* contient un élément de réponse à HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1) [226]

Les mécanismes de régulation épigénétique des gènes *TFF* sont multiples. Les promoteurs des gènes TFF sont peu ou pas méthylés dans les tissus ou ils sont normalement exprimés tandis qu'ils le sont dans les organes n'exprimant pas les TFF [227]. Une forte méthylation au niveau des résidus cytosines des « ilots CpG » (une cytosine et une guanine séparés par un phosphate) rend l'ADN inaccessible aux facteurs de transcription tandis qu'une faible méthylation favorise la transcription [228]. Dans les cancers gastriques, *TFF1* est réprimé par méthylation du promoteur [229]. *TFF3* est surexprimé dans les cancers du foie [230] ou du pancréas [231] par démethylation du promoteur du gène. De manière générale, au niveau de la chromatine, la méthylation de la partie amino-terminale des histones inhibe tandis que l'acétylation favorise la transcription des gènes. On parle de code des histones [232]. Des cancers gastriques induits chez la souris par du MNU (N-methyl-N-nitrosourea) sont associés à la méthylation

et la déacétylation de l'histone H3 dans la région promotrice du gène *TFF1*, et donc à la répression de son expression [233].

Il est difficile d'avoir une vision globale des mécanismes de régulation de l'expression des *TFFs*, tant ceux-ci sont divers et complexes. Il est important de retenir que les gènes *TFF1* et *TFF3* sont régulés par les œstrogènes dans des lignées cellulaires de cancer du sein, mais qu'ils sont aussi potentiellement régulés par d'autres facteurs.

II. LES PROTEINES TFF

A. Structure protéique

La structure primaire des TFFs est fortement conservée au cours de l'évolution. On retrouve une homologie de séquence entre les différentes espèces, particulièrement pour le domaine en trèfle [234]. TFF1 et TFF3 en possèdent un, et TFF2 en possède deux. Cette structure commune de 42 ou 43 acides aminés inclue six cystéines, engagées dans trois ponts disulfures intramoléculaires établissant la forme de trèfle [235,236] (Figure 15) [236]. Elles sont toujours appariées de la même manière : n°1 avec n° 5, n°2 avec n°4, n°3 avec n°6. Cette structure offre une grande stabilité à cette famille de protéines résistantes à la chaleur, à la dégradation par les protéases et à l'acidité [235]. TFF1, TFF2 et TFF3 possèdent toutes un peptide signal de 21 à 27 acides aminés en N-terminal, permettant l'adressage des protéines au réticulum endoplasmique. Le peptide signal de la forme native est clivé dans celui-ci, donnant naissance à la forme mature qui sera sécrétée. L'extrémité C-terminale est conservée et se caractérise par un environnement riche en acides aminés acides et la présence d'une septième cysteine [207]. Celle-ci permet d'établir des liaisons intra (TFF2) ou intermoléculaires (TFF1 et TFF3), à l'origine d'homo ou d'hétérodimères [234]. Les structures secondaires et tertiaires des TFFs ont été résolues grâce à des techniques de cristallographie, d'analyse aux rayons X et de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Par ailleurs, dans la partie en trèfle, deux feuillets β anti-parallèles sont présents (position 33 à 35, et 43 à 45) et sont séparés par une hélice α (position 23 à 31) [234]

B. Interactions protéiques

De nombreuses études suggèrent que les effets des TFF sont médiés par des interactions de type ligand-récepteur. L'identité du ou des récepteurs aux TFFs reste aujourd'hui sujette à débat. Il existe toutefois des arguments en faveur de l'existence de tel récepteurs et certains candidats on été proposés. Il s'agit ici de citer quelques exemples. La protéine TFF2 radiomarquée à l'iode125 a été administrée à des rats en intra veineux ; il a été observé une fixation spécifique de TFF2 sur les cellules à mucus, les

cellules pariétales et les glandes pyloriques de l'estomac, ainsi que sur les glandes de Brunner et les cellules de Paneth de l'intestin grêle [237]. La fixation de TFF3 au niveau basolatéral a été montrée par autoradiographie sur des sections congelées de tissu gastrointestinal de rat [238]. Plus récemment, il a été reporté que TFF2 induit l'activation de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) via l'activation du récepteur CXCR4 dans des lignées cancéreuses d'intestin et de pancréas [239].

Une étude a identifié par MS (Mass Spectrometry) deux protéines liant potentiellement TFF2 isolées d'une membrane muqueuse d'estomac de porc : la sous-unité β du récepteur à la fibronectine et un récepteur membranaire CRP-Ductin [240]. Une interaction entre TFF1 et les mucines MUC2 et MUC5A a été mise en évidence par une étude de double hybride chez la levure [241]. Cette interaction a lieu au niveau de la partie C-terminale des mucines, contenant deux domaines vWFC (von Willebrand Factor C) riches en cystéines. D'autre études biochimiques ont confirmé l'interaction entre les TFF et les mucines [242–244]. Un hétérodimère de 25 kDa, représentant la forme majoritaire de TFF1 dans l'estomac, comprenant TFF1 et TFIZ1 (Trefoil Interacting factor Z1) a été caractérisé à partir de la muqueuse gastrique [245]. TFIZ1, aussi appelé GKN2 (Gastrokine 2), est une protéine de 18.3 kDa riche en cystéines ; elle interagit avec TFF1, mais pas avec TFF2 ou TFF3, via un pont disulfure.

III. EXPRESSION DES TFF DANS LES TISSUS NORMAUX

Les TFF sont principalement retrouvés dans le tractus gastro-intestinal. Ils sont exprimés puis sécrétés par les cellules à mucus des épithelias. (Figure 16, panel de gauche [246]). TFF1 (**A**) et TFF2 (**B**) sont principalement retrouvés dans l'estomac et TFF3 (**C**) dans l'intestin. Au niveau intracellulaire, ils sont retrouvés dans l'espace péri-nucléaire ou associés au réticulum endoplasmique. TFF1 est détecté dans le suc gastrique [198], dans la circulation générale et les urines chez l'individu sain [247].

A. Localisation de TFF1

TFF1 est retrouvé en de très nombreuses localisations. Il est sécrété par les cellules à mucus de surface. Sa localisation principale est la muqueuse fundique et antropylorique de l'estomac, et en moindre quantité l'intestin [198,248]. TFF1 est exprimé dans les glandes salivaires sublinguales et sumandibulaires, et la vésicule biliaire [248–250]. Dans le système respiratoire, TFF1 est retrouvé au niveau de la muqueuse nasale et de l'arbre trachéobronchique [251]. TFF1 est retrouvé en faible quantité au niveau de la glande mammaire et de l'utérus [252,253]. TFF1 est présent dans la glande lacrymale, le canal nasolasolacrymal et la conjonctive [254,255]

B. **Localisation de TFF2**

Comme TFF1, TFF2 est exprimé au niveau de la muqueuse fundique et antropylorique de l'estomac [200,248]. Il est synthétisé et secrété par les cellules à mucus du collet [256]. Il est également sécrété par les glandes de Brunner au niveau du duodénum [257]. Il est présent au niveau de la vésicule biliaire, l'utérus [253] et du canal lacrymal [255]. TFF2 est retrouvé en faible quantité au niveau de l'œsophage et dans les muscles squelettiques [248]. TFF2 n'est pas retrouvé dans le tissu mammaire [252].

C. **Localisation de TFF3**

TFF3 est principalement synthétisé au niveau des cellules caliciformes de l'intestin grêle et du colon [201,248], mais aussi de la muqueuse nasale [251] et de l'arbre trachéo bronchique [258], des glandes lacrymales [255] et salivaires. TFF3 est exprimé dans la glande mammaire normale [252].

IV. **FONCTION DES TFF**

Les TFF possèdent de nombreuses fonctions. Ils permettent la protection (**A**) et la réparation (**B**) de la muqueuse gastrique. Leur effet anti-apoptotique (**C**) et angiogénique (**D**) est reconnu, ainsi qu'un rôle dans l'immunité et l'inflammation (**E**).

A. **Protection de l'intégrité de la muqueuse gastrique**

Les TFF sécrétées interagissent avec les mucines (Figure 17-a)[246] via une région conservée riche en cystéine avec le facteur de Von Willebrand [241]. Dans le tractus gastro-intestinal, TFF1 colocalise avec MUC5AC, TFF2 avec MUC6 et TFF3 avec MUC2 [259]. Les TFF participent à l'intégrité et la stabilité du mucus en favorisant sa polymérisation [234,260]. Cette coopération entre mucines et TFF assure probablement la protection de la muqueuse gastro-intestinale d'agressions endogènes et exogènes (aliments, agents pathogènes, allergènes…) [234]. Des études de perte de fonction menées chez la souris mettent en évidence le rôle des TFF dans la protection et la réparation de la muqueuse gastrique. Des souris déficientes en TFF1 développent des tumeurs dans la région antro-pylorique de l'estomac, et des anomalies de production de mucus [261]. Des souris déficientes en TFF2 présentent une muqueuse gastrique érodée [262]. Des souris déficientes en TFF3 souffrent de défaillances dans la réparation de la muqueuse gastrique suite à une blessure [263]. Par ailleurs, les rats ayant reçu la protéine recombinante TFF3 [264] ou les souris transgéniques surexprimant TFF1 [265] montrent des facilités de cicatrisation de la muqueuse gastrique suite à une blessure. L'administration des protéines recombinantes TFF1, TFF2 , et TFF3 protège les rats des ulcères gastriques provoqués par l'indométacine [266,267]. L'ensemble des données de la littérature s'accordent pour dire que les TFF associés aux mucines constituent une solide

barrière à la surface de la muqueuse gastrique et intestinale et favorisent le processus de réparation de celle-ci [268].

B. Réparation de la muqueuse gastrique lésée

A la suite d'une blessure de la muqueuse gastrique, les cellules épithéliales se détachent de la membrane basale. Les éléments sous-jacents se retrouvent exposés à la digestion par les acides et les protéases de la lumière. Afin de restaurer la continuité épithéliale, deux processus sont activés, la migration et la prolifération cellulaire.

Le rôle stimulant des TFF sur la migration cellulaire a été rapporté par plusieurs équipes. Certaines études sont en faveur d'un rôle des TFFs stimulant la migration [266,269,270]. La surexpression de TFF1 dans des lignées mammaires humaines cancéreuses (MDA-MB-231, MCF-7, T-47D) et normales (MCF-10A) favorise la migration cellulaire [271,272]. La protéine recombinante TFF1 induit la migration des lignées MCF-7 et MDA-MB-231 [273]. TFF2 stimule la migration et l'invasion des lignées mammaires humaines cancéreuses MDA-MB-231 et MCF-7 [274]. La transfection de TFF3 dans une lignée cellulaire de cancer colorectal de rat accroit ses propriétés migratoires et invasives [275]. D'autres études menées sur des fibroblastes de rat [276], une lignée de cancer humain colorectal [277], des lignées normales et transformées bronchiques [278] ou des kératinocytes [279] vont dans le même sens.

En revanche, l'effet des TFF sur la prolifération cellulaire est encore sujet à controverse. Certains auteurs ont montré que la surexpression de TFF3 dans les ilots pancréatiques de rats [280] et des lignées mammaires de cancer du sein [281] ou la surexpression de TFF1 dans des lignées mammaires de cancer du sein MCF-7 et TD-47D [271] induit une accélération de la prolifération cellulaire. A *contrario*, une étude de notre laboratoire montre que la surexpression de TFF1 dans des lignées cellulaires mammaires humaines cancéreuse (MCF-7 et MDA-MB-231) et normales (MCF-10A) ne modifie pas la prolifération cellulaire [272]. La surexpression de TFF1 dans des lignées humaines de cancer gastrique BGC823, SGC7901 et GES-1 [282] ou AGS [283] ralentit la prolifération. La protéine recombinante TFF1 ralentit la prolifération dans les lignées humaines de cancer du colon HTC116 et de cancer gastrique AGS [283,284]. De manière intéressante, la surexpression de TFF3 est associée à un arrêt de la prolifération de cellules cancéreuses humaines de colon [285]. Un traitement par TFF2 n'a d'effet ni sur la prolifération de cellules humaines de cancer du colon HT-29 [266], ni sur la prolifération de cellules humaines cancéreuses mammaires MCF7 et T47D, ou de cellules humaines cancéreuses ovariennes OVC432 ou OAW42 [286]. Bien que de nombreuses études aient été menées, il est aujourd'hui difficile de conclure sur le rôle de TFFs dans la prolifération cellulaire.

C. **Effet anti-apoptotique**

Lors d'une blessure de la muqueuse gastrique, les cellules épithéliales se détachent de la membrane basale et le processus de mort par apoptose est activé. Les TFF seraient capables d'inhiber ce processus. L'expression de TFF1 protège de l'apoptose une lignée normale d'intestin grêle de rat (IEC18), une lignée humaine de cancer du colon (HCT116), et une lignée humaine de cancer de l'estomac (AGS) [284]. Un traitement par TFF2 diminue de 30% les corps apoptotiques dans la lignée MCF-7 [286]. TFF3 est nécessaire à l'inhibition de l'apoptose dans une lignée humaine de cancer du colon (HT-29) [287]. TFF3 inhibe l'apoptose dans une lignée humaine de cancer du colon (HCT116) et une lignée normale d'intestin grêle de rat (IEC18) [288].

D. **Effet angiogénique**

L'hypoxie est un signal important dans le développement et la croissance tumorale, elle va déclencher la formation de néovaisseaux. Le promoteur du gène TFF3 possède un élément de réponse à HIF1α (Hypoxia Inducible Factor 1α) [226]. HIF1α, stabilisé en l'absence d'oxygène, se fixe sur la séquence HRE (Hypoxia Responsive Element) de TFF3 et active sa transcription. Le signal angiogénique est transmis *via* la sécrétion de facteurs de croissance, comme le VEGF (Vascular Endothélial Growth Factor), de survie, et de migration. Les effets pro-angiogénique des TFF ont été démontrés sur la membrane chorio-allantoide d'embryons de poulet [289]. La voie de l'EGF et la voie des cyclooxygénase (COX) seraient également impliquées.

E. **Rôle dans la réponse immunitaire et l'inflammation**

Un rôle dans l'immunité et l'inflammation des protéines en trèfle est suggéré. Les TFF sont induits ou surexprimés dans certaines maladies inflammatoires intestinales (ulcères, maladie de Crohn, gastrites…), les pancréatites ou l'asthme [290–295]. La comparaison du transcriptome du tractus gastro-intestinal de souris contrôle et de souris déficiente en TFF2 a permis l'identification de 128 gènes exprimés différemment entre les deux lignées de souris, dont la plupart sont impliquées dans l'immunité [208]. Une étude provoquant l'inflammation de l'intestin par ingestion d'acide acétique chez le rat montre une augmentation de l'expression de TFF1 en phase aigüe et une augmentation de l'expression de TFF3 en phase de régénération [296]. TFF2 et TFF3 stimulent directement la mobilité des monocytes [297]. TFF3 induit l'expression du facteur DAF (Decay Acceleration Factor) dans des cellules épithéliales intestinales humaines et murines. Ce facteur est impliqué dans le blocage de l'activation du système complément [298]. Chez la souris, lors d'une infection intestinale par un ankylostome, TFF2 est nécessaire au déclenchement de la réponse immunitaire de type II [299].

V. LES TFF DANS LES TISSUS TUMORAUX

L'expression des TFFs est altérée dans des lésions cancéreuses touchant de multiples organes (Figure 16, panel de droite). Récemment, il a été montré que TFF3 pourrait être un marqueur sérique dans les cancers dans lesquels les TFFs sont dérégulés [300]. Les principales lésions touchent le tractus gastro-intestinal (**A**) et la glande mammaire (**B**). L'ensemble des études sur le rôle des TFF dans la genèse et l'évolution des tumeurs restent complexes et sujettes à débat (**C**).

A. Tractus gastro-intestinal

Alors que chez l'adulte sain, l'estomac est le siège principal de l'expression de TFF1 et de TFF2, leur expression est diminuée dans les cancers gastriques [283,301–306]. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la diminution de l'expression de la protéine TFF1 dans les cancers gastriques. Pour certains auteurs, des mécanismes épigénétiques sont en cause [229,307]. Pour d'autres, ce sont des mutations somatiques non-sens affectant la structure en trèfle qui sont impliquées [308,309]. Par ailleurs, les souris invalidées pour TFF1 présentent des adénomes antro-pyloriques [261] ; l'absence de TFF1 suffit à provoquer une prolifération anormale de l'épithelium antropylorique. En revanche, une expression ectopique de TFF1 est retrouvé dans les cancers colo-rectaux, oesophagiens [310] et du pancréas [311]. Cette expression pourrait être liée à une différenciation gastrique de ces tumeurs. Par ailleurs, il a été reporté que la surexpression de TFF1 est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers gastriques [236,312].

TFF2 est retrouvé dans les cancers du pancréas [313], de l'œsophage [310] et de l'estomac [305]. La surexpression de TFF2 protègerait la muqueuse de l'estomac à l'infection par Helicobacter Pilori [314]. Par ailleurs, TFF2 est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers gastriques [315].

Alors qu'il est normalement peu présent dans l'estomac, TFF3 est retrouvé dans 50% des cancers gastriques [304,306]. Inversement, alors qu'il est normalement exprimé dans l'intestin, TFF3 est sous-exprimé dans les lésions précancéreuses, et les cancers invasifs dans cet organe; son expression varie en fonction de la différenciation intestinale [316]. TFF3 est également présent dans les cancers de l'œsophage [310] et du pancréas [270]. Le dosage des taux circulants de TFF3 pourrait aider au diagnostic des cancers gastriques [317,318]. Par ailleurs, allant dans le même sens que pour TFF1 et TFF2, une étude sur 111 patients atteints de cancer gastrique a montré que TFF3 est corrélé à l'apparition de métastases, particulièrement chez les femmes [319].

B. Glande mammaire

Dans la glande mammaire normale, TFF1 et TFF3 sont exprimés faiblement. En revanche, ils sont exprimés dans de nombreux cancers du sein. Les données de la littérature concernant l'expression de

TFF1 et de TFF3 dans les cancers du sein sont nombreuses. Ces études commencées à la fin des années 80 diffèrent par la méthodologie. Les techniques et leurs principes sont présentés et comparées dans le tableau 10. Les études pionnières ont utilisé le Northern Blot (NB) pour détecter l'ARNm et l'IHC pour détecter la protéine [216]. Depuis, de nombreuses techniques différentes ont été utilisées selon les études : recherche de l'ARNm par RT-PCR ou ISH, recherche de la protéine par test ELSA. En plus des études visant à rechercher directement l'expression des TFFs dans les cancers, de nombreuses études de profilage moléculaires des cancers du sein ont été publiées depuis une dizaine d'années [320–326]. Ces études rapportent à l'échelle du génome les profils moléculaires et ont permis leur classification (cf. Ch.1-V-C). De manière opportune, ces études déposent les résultats de leur analyse dans des banques de données. Celles-ci peuvent être interrogées grâce à des suites de logiciels dédiés. La base de données Oncomine a été consultée pour compléter les données d'expression des TFFs dans les cancers du sein. Les données de la littérature et d'exploitation des bases de données de transcriptome sont résumées dans le tableau 11 pour TFF1 et le tableau 12 pour TFF3. Ces tableaux classent les études selon l'ordre chronologique. Ils montrent qu'il existe une importante disparité selon les auteurs concernant la fréquence de surexpression des TFFs dans les cancers du sein. Dans le tableau 13, les fréquences de positivité trouvées pour TFF1 et TFF3 ont été re-classées par méthodologie. Concernant l'expression de TFF2, les données sont rares et contradictoires. Une étude portant sur 57 cas n'a retrouvé l'ARNm de TFF2 (ISH) ni dans des échantillons humains de tumeur mammaire, ni dans des échantillons humains de tissu mammaire normal [252]. Pour d'autres, l'ARNm de TFF2 est détectable par PCR dans les tumeurs mammaires humaines (9 cas positifs sur 10) [274].

Dans l'ensemble des études, une bonne corrélation existe entre l'expression des TFFs (1 et 3) et celle des récepteurs hormonaux RE et RP dans les tumeurs mammaires [216,327–343]. L'expression de TFF1 est un témoin de la fonctionnalité du RE. Cela est lié à la présence d'un ERE dans le promoteur du gène *TFF1*. En conséquence, l'expression de TFF1 par les tumeurs mammaires RE+ est un facteur prédictif de bonne réponse au traitement par l'hormonothérapie [207,216,329,337,339,341].

Néanmoins, deux articles portant sur des populations particulières ne retrouvent pas l'association entre l'expression du RE et de TFF1. Dans une étude réalisée chez des femmes enceintes atteintes de cancer du sein, la proportion de tumeurs RE+ est plus faible que dans la population générale. De manière intéressante, la proportion de tumeurs TFF1+ est semblable à celle de la population générale et de nombreuses patientes sont RE-/TFF1+ [236]. Par ailleurs, une étude a analysé l'expression des TFFs chez des patientes ayant eu un cancer du sein dit « de l'intervalle » [344]. Ces patientes sont atteintes d'un cancer devenu symptomatique alors que la dernière mammographie de dépistage organisé était normale. L'expression des TFFs a été analysée dans les tumeurs de ces patientes et comparée avec celles des tumeurs diagnostiquées lors d'une mammographie du dépistage organisé. Alors que

l'expression du RE est diminuée dans ce type de cancer, l'expression de TFF1 est accrue. Dans ce sous-groupe, l'expression de TFF1 n'est pas corrélée à celle du RE. Une autre étude portant sur 145 cas retrouve 30% de tumeurs RE-/TFF1+ [334]. Il a également été démontré qu'en plus de son caractère prédictif de réponse à l'hormonothérapie, la surexpression de TFF1 par les tumeurs mammaires constitue un facteur de bon pronostic [327,338,341,345,346]. En effet, certains auteurs suggèrent que TFF1 est négativement corrélé au grade SBR [332–334,337,339–341,343,345]. Néanmoins, d'autres n'ont pas retrouvé cette association [327,338].

TFF3 est globalement considéré comme un facteur de bon pronostic ; il est associé aux tumeurs de bas grade bien différenciées [347]. TFF3 apparait corrélé à l'expression du RE [342,347–349] et du RP [342,347]. Paradoxalement, il serait associé à une mauvaise réponse à l'hormonothérapie [281,347]. Par ailleurs, TFF1 et TFF3 sont des marqueurs prédictifs d'apparition de métastases osseuses dans le cancer du sein [329,350].

Un article récent a étudié l'intérêt des marqueurs TFF1 et TFF3 associés au statut RE pour prédire la réponse à la chimiothérapie. Pour ce faire, la taille des tumeurs a été comparée avant et après chimiothérapie néo-adjuvante. Il a été montré que les patients dont les tumeurs ne sont pas de type luminal (RE-/RP-/GATA3-/TFF1-/TFF3-) répondaient mieux à la chimiothérapie paclitaxel/carboplatine [342]. En effet, la majorité des patients chimio-résistants de l'étude avaient des tumeurs de type luminal (RE+/RP+/GATA3+/TFF1+/TFF3+). Certaines tumeurs RE+ (cf. V-C-i) nécessitent un traitement par chimiothérapie, décidée selon les facteurs de risques (cf. VI-C). La détermination de l'expression de GATA, TFF1, et TFF3 pourraient constituer un outil supplémentaire pour la décision thérapeutique.

Une étude a corrélé le dosage urinaire de TFF1 à la pathologie mammaire [351]. La présence d'une tumeur mammaire maligne s'accompagne de taux urinaires de TFF1 dépassant le seuil pathologique. De plus, en cas de tumeurs hormono-dépendante, ces taux sont corrélés à la réponse au traitement anti-ostrogénique. Cependant, les étiologies de variations urinaires de TFF1 sont nombreuses (maladies inflammatoires intestinales), rendant l'interprétation des dosages urinaires délicats.

C. Rôle des protéines en trèfle dans la genèse des tumeurs

Le rôle exact des protéines en trèfle dans le développement des cancers n'est pas encore totalement élucidé. Les données dont nous disposons actuellement sont complexes. D'une part, les TFF semblent plutôt protéger les tissus dans lesquels ils sont normalement fortement exprimés. L'exemple le plus frappant est l'effet suppresseur de tumeurs de TFF1 dans les cancers gastriques [261]. D'autre part, les TFF semblent promouvoir le développement des tumeurs dans les tissus ou ils ne sont normalement pas ou peu exprimés, TFF3 dans les cancers de l'estomac [304] ou TFF1 dans le cancer du pancréas et de

la prostate [352–354]. Un article récent documente également la difficulté d'interprétation des résultats d'expression de TFF3 dans les cancers du sein en termes pronostiques [347]. TFF3 est exprimé faiblement dans des échantillons de sein normal. Dans le sein normal, la protéine TFF3 est secrétée par les cellules épithéliales de manière polarisée, du coté de la lumière. Dans les tumeurs encore bien différenciées, la sécrétion de TFF3 du coté de la lumière est conservée. En revanche, dans les cellules cancéreuses peu différenciées, la polarité de l'épithélium est perdue et la protéine TFF3 est libérée dans le stroma. Ces auteurs émettent l'hypothèse qu'une inversion de la sécrétion polarisée de TFF3 par les cellules tumorales aurait des conséquences délétères. Ainsi selon ce raisonnement, ce n'est pas la quantité d'expression de TFF3 qui est importante mais la localisation de sa sécrétion. Lorsque les cellules épithéliales sont polarisées (épithelium normal, tumeur très différenciée), TFF3 est secrétée du côté de la lumière. Par analogie avec ses fonctions dans le tractus gastro-intestinal, sa fonction serait de protéger la surface épithéliale des canaux. En revanche, dans les cellules tumorales peu différenciées la polarisation épithéliale est perdue et TFF3 est sécrété dans le stroma où ses propriétés motogènes, et angiogéniques favoriseraient la progression tumorale. En effet, les auteurs ont observé une association entre l'expression de TFF3 dans la tumeur primitive et la présence d'emboles vasculaires péritumoraux, l'envahissement ganglionnaire, et l'apparition de métastases à distance.

En conclusion, les TFFs sont considérés par certains auteurs comme des protéines bénéfiques dont la perte d'expression favorise le développement des cancers et par d'autres auteurs, comme des protéines néfastes dont le gain d'expression favorise un phénotype agressif des tumeurs. Le modèle de l'équipe de Félicity May [347]permet de reconsidérer les résultats de la littérature sous un autre angle en évoquant l'hypothèse selon laquelle l'impact des TFFs est différent selon le type de sécrétion (côté lumière vs côté stroma), selon d'identité des cellules cibles des facteurs (épithéliales, stromales, tumorales) et selon le tissu d'accueil (tractus gastrointestinal, mésenchyme mammaire).

CHAPITRE 3. RATIONNEL DE L'ETUDE CLINIQUE

Comme évoqué dans les parties précédentes, les relations entre les TFFs et les cancers du sein ont fait l'objet de nombreuses études depuis la fin des années 80. Cependant, la fréquence d'expression de ces facteurs est très variable en fonction des études et leur rôle reste incompris, notamment à l'échelle moléculaire et mécanistique. Les données publiées à ce jour sont sujettes à diverses interprétations. Néanmoins, elles s'accordent pour dire que ces facteurs n'ont pas de propriétés oncogéniques *per se* mais que leur présence dans un contexte cellulaire précis confère des propriétés migratoires et donc de progression tumorale.

En 1997, une équipe a analysé l'expression des protéines TFF1 et TFF3 sur un panel de tumeurs correspondant à 49 patientes atteintes de cancer du sein [252]. Cette étude rétrospective a analysé l'expression des ARNm de TFF1 et de TFF3 par ISH et celle de la protéine TFF1 seulement par IHC sur des tissus formolés inclus en paraffine. De manière intéressante, les conclusions de cet article indiquent que les profils d'expression pour TFF1 et TFF3 sont similaires sur ce panel, ce qui signifie que TFF1 et TFF3 sont co-exprimés dans les tumeurs mammaires. Une étude prospective plus récente va dans le même sens [342]. Sur un même panel de tumeurs correspondant à 55 patientes, l'expression des protéines TFF1 et TFF3 a été recherchée par IHC. Une forte corrélation a pu être établie entre l'expression des deux protéines.

Pour mieux comprendre le rôle de TFF1 et de TFF3 dans les cancers du sein, nous avons réalisé une étude prospective par immunoblot sur extraits protéiques issus d'échantillons tumoraux congelés. Ce document présente l'analyse des résultats des 123 premiers patients, et les inclusions sont toujours en cours.

L'hormonodépendance des cancers du sein est le rationnel de la thérapie endocrine. Deux tiers des cancers du sein sur-expriment RE et/ou RP. Malheureusement, 30 à 40% des patients ne répondent pas au traitement antihormonal d'emblée. De plus, 40 à 50 % des patientes qui répondaient initialement au traitement vont acquérir progressivement une résistance [355]. Quelques mécanismes de résistance peuvent être évoqués. Les patientes exprimant le variant d'épissage ERα36 répondent moins bien au tamoxifène [356]. Le variant d'épissage ERα46 est sous-exprimé dans les lignées cellulaires de cancer mammaire résistantes au traitement par le tamoxifène par comparaison avec les lignées cellulaires de cancer mammaire sensibles au traitement par le tamoxifène [357]. Des modifications épigénétiques peuvent diminuer l'expression du ERα , transformant la maladie en cancer non hormono-dépendant [358–360]. L'activation de facteurs de transcription comme NFκB impliqués dans la régulation de l'expression du REα sont associés à une résistance au tamoxifène [361]. Les résistances à

l'hormonothérapie des tumeurs RE+ suggèrent que la présence d'une surexpression du récepteur ne suffit pas à prouver la fonctionnalité de la voie RE.

De plus, deux études particulières réalisées chez des femmes enceintes atteintes d'un cancer du sein pour l'une [236], et chez des femmes atteintes d'un cancer du sein « de l'intervalle » pour l'autre [344], pointent l'existence de tumeurs RE-/TFF1+. La transcription de *TFF1* étant sous le contrôle des estrogènes, ces articles suggèrent que la voie du RE pourrait être fonctionnelle sans que le RE soit détectable dans la tumeur.

En conclusion, il semblerait que la voie du RE puisse ne peut pas être fonctionnelle alors que le RE est surexprimé dans la tumeur, et à l'inverse, que la voie du RE puisse être fonctionnelle alors que le RE n'est pas surexprimé dans la tumeur. L'ensemble des données de la littérature converge vers un contrôle des gènes TFF1 et TFF3 par les œstrogènes dans le sein. Nous émettons l'hypothèse que l'étude conjointe de TFF1 et de TFF3 permettrait d'affiner la sélection des patients éligibles à l'hormonothérapie et de permettre une prise en charge plus personnalisée.

CHAPITRE 4. MATERIELS ET METHODES

I. DESCRIPTIF DE L'ETUDE

Il s'agit d'une étude prospective réalisée entre le 14 octobre 2011 et le 02 juillet 2012. Le principe de l'étude est résumé dans la figure 18. Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le service de sénologie du Pr. Mathelin, le service de pathologie du Pr. Bellocq du CHU de Hautepierre, et le laboratoire de Biochimie du Pr. Lessinger du NHC. Les analyses sont réalisées au laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire des cancers du sein du Dr. Rio et du Dr. Tomasetto de l'IGBMC. Les inclusions sont toujours en cours à ce jour. Ce document présente les données des 123 premiers patients. Nous avons eu l'opportunité d'utiliser des échantillons d'extraits protéiques réalisés sur pièce opératoire de tumeurs mammaires dans le cadre du protocole uPA/PAI-1. Un aliquot de 100 µl est systématiquement préparé et stocké à -80°C pour le laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire des cancers du sein de l'IGBMC.

II. SELECTION DES PATIENTS

Nos critères d'inclusion sont les mêmes que ceux du protocole de dosage d'uPA/PAI-1. Les hommes ont été exclus de l'étude, ainsi que les patientes ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante. Ce traitement permettant de diminuer la taille de la tumeur avant l'opération peut entraîner des modifications de l'expression des protéines par les cellules cancéreuses. Une biopsie datant de moins de 15 jours représente également un critère d'exclusion. Ce geste entraîne une blessure locale, et la libération de facteurs de l'inflammation, qui pourraient biaiser nos résultats. Les tumeurs < 1cm (pT1a et pT1b) sont exclues ainsi que les cas de récidive. Un consentement éclairé préalable de la patiente est nécessaire et a été obtenu pour l'utilisation pour des échantillons à fin de recherche.

III. PREPARATION DE L'ECHANTILLON TUMORAL

Lors de chaque opération de tumorectomie ou de mastectomie au bloc du CHU de Hautepierre, le chirurgien confie la pièce opératoire au laboratoire de pathologie du même bâtiment pour un examen histologique. C'est le pathologiste qui donne le diagnostic de certitude. Si le patient présente les critères d'inclusion du protocole, le pathologiste découpe au cœur de la tumeur un échantillon qu'il plonge immédiatement dans l'azote liquide à -196°C. Le temps entre le prélèvement et la congélation n'excède jamais 15 min afin d'assurer une bonne qualité des tissus. L'échantillon est ensuite placé dans un cryotube marqué avec un code permettant l'anonymisation de l'identité des patients et rangé à -80°C. La section du coté de la pièce tumorale est formolée puis incluse en paraffine afin de pouvoir

fournir l'histologie en regard du prélèvement congelé. Les échantillons sont ensuite acheminés par coursier au laboratoire de biochimie du NHC.

IV. EXTRACTION DES PROTEINES

L'extraction des protéines des pièces tumorales détaillée ci-dessous est réalisée par le laboratoire de biochimie du NHC. Le protocole détaillé ci dessous a été optimisé par le laboratoire de transfert d'oncologie biologique de l'AP-HM (Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille).

Pulvérisation des tissus

La pulvérisation à sec (MicroDismembrator®) offre plus d'avantages que le broyage en milieu liquide (Polytron™). Dans une expérience pilote comparant l'extraction d'une dizaine de tumeurs du sein, nous avons remarqué que les tissus sont difficiles à broyer totalement à froid avec le Polytron™ tandis qu'il est facile d'obtenir rapidement une poudre homogène avec le Dismembrator®. De plus, avec ce dernier, la pulvérisation a lieu en vase clos, permettant d'éviter les micro-projections de tissu tumoral. Dans notre série, la pulvérisation des tissus a été réalisée par une agitation de 30 sec à 2000 rpm, à sec, et à froid (-80°C) (Sartorius MicroDismembrator®, Figure 18). Si la taille et/ou la consistance des fragments le nécessite, l'agitation peut être prolongée.

Extraction tissulaire

La poudre obtenue est mise en suspension dans du tampon TBS contenant 1% de Triton X-100 (pH 8,5). Ce tampon permet de lyser les cellules et d'obtenir un extrait protéique. Après agitation à +4°C durant une nuit, la suspension est centrifugée 1 h à +4°C à 105 000 g. Les débris cellulaires sont présents dans le culot, les protéines dans le surnageant. Ce dernier est retenu.

Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Pierce ou méthode BCA (BiCinchonic acid Assay). C'est une méthode de dosage colorimétrique des protéines. Les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu2+ en Cu1+ en milieu alcalin. L'acide bicinchonique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu1+. Il forme un complexe pourpre absorbant à 562nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines. Une gamme de BSA (Bovin Albumin Serum) de concentration croissante et connue permet d'établir une courbe standard. Les taux de protéines des échantillons sont exprimés en mg/ml. La méthode de Pierce est plus linéaire que la méthode de Bradford, basée sur le bleu de Coomassie. De plus, les réactifs de la méthode Pierce n'interagissent pas avec les détergents (Triton X-100) contenus dans les tampons de lyse, contrairement à ceux de la

méthode de Bradford. Après dosage, les extraits cellulaires sont répartis en deux tubes : le premier permet le dosage d'uPA/PAI-1 par ELISA au laboratoire de biochimie du NHC, le second est utilisé à des fins de recherche moléculaire au laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire ces cancers du sein de l'IGBMC.

V. WESTERN BLOT

Nous acheminons au laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire des cancers du sein de l'IGBMC un aliquot de chaque extrait à la fin de la semaine, dans de la carboglace.

Préparation des extraits protéiques :

Les échantillons sont dilués et normalisés à une concentration protéique totale de 1mg/ml. Des aliquots de 40µl d'extrait protéique tumoral sont ajoutés à 20 µl de tampon de charge [Bleu/SDS (0,05M Tris.HCl pH 6.8 ; 10% glycérol ; Bleu de Bromophénol ; 2% SDS ; 1,4M β-mercaptoéthanol)]. Le bleu de bromophenol permet de visualiser le front de migration. Le SDS, détergent anionique, charge toutes les protéines négativement, permettant leur migration en fonction de la taille. Le β-mercaptoéthanol, par réduction des ponts disulfures, et un chauffage à 95°C pendant 3 min permettent la dénaturation des protéines. Les échantillons (5µl) sont ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE.

Gel SDS-PAGE

Le gel de polyacrylamide SDS-PAGE se compose de deux parties : un *gel de concentration* (4,8% acrylamide/bisacrylamide 40/1 ; 0,375M Tris.HCl pH 6.8 ; 0,1% SDS ; 0,005% APS ; TEMED) permettant de concentrer l'échantillon protéique, et un *gel de séparation* des protéines (gradient 10%/20% acrylamide/ bisacrylamide 40/1 ; 0,375M Tris.HCl pH 8.8 ; 0,1% SDS ; 0,005% APS ; TEMED) permettant de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Il est possible d'adapter la réticulation du gel en faisant varier la concentration finale en acrylamide/bisacrylamide pour optimiser la séparation des protéines d'intérêt. Après dépôt des échantillons protéiques, l'électrophorèse s'effectue dans un tampon de migration Tris/SDS/Glycine (0,02M Tris.Base ; 0,2M glycine ; 0,1% SDS) durant 2h à 100V.

Immunoblot

Après électrophorèse, les protéines séparées dans le gel SDS sont électrotransférées (1h à 100V) sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schuell) dans du tampon de transfert (0,02M Tris.Base ; 0,1M glycine ; 20% éthanol). L'efficacité de transfert est vérifiée par une coloration de l'ensemble des protéines présentes sur la membrane au Rouge Ponceau (0.1% de Ponceau S dans 5% acide acétique)

(Sigma Chimie). La saturation des sites libres de la membrane est réalisée par une incubation d'1h à température ambiante dans une solution de PBS-Tween 0,1% contenant 3% de lait écrémé. La membrane est mise en présence de l'anticorps primaire dans du PBS-Tween 0,1% à 4C° sous agitation pendant une nuit. Après 2 lavages de 10min dans du PBS-Tween 0,1%, la membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase pendant 1h à température ambiante. Les complexes anticorps/protéine sont visualisés par un système de chimio-luminescence par ECL® (Amerscham Pharmacia Biotech). La peroxydase marquant l'anticorps secondaire oxyde le luminol en présence de peroxyde d'hydrogène. Le luminol excité revient à son état initial en émettant une lumière à 428 nm détectée par l'ImageQuant LAS-4000. La quantification des pixels des images obtenues est réalisée grâce au logiciel ImageJ®. Excel® est utilisé pour traiter les données et Prism® pour réaliser les graphiques.

VI. RECUEIL DES DONNES CLINIQUES

Les éléments repris dans les dossiers pour chaque patient sont: l'âge, l'âge de la ménopause, l'âge de la ménarche, le nombre d'accouchements, le nombre de mois d'allaitement des enfants, un éventuel traitement au THS, les antécédents familiaux de cancers du sein, la taille tumorale, le grade SBR, le grade SBRM, le type tumoral, l'envahissement ganglionnaire, le statut (intensité du marquage, pourcentage de cellules marquées) des récepteurs hormonaux (RE, RP), le statut HER2, le pourcentage de cellules positives pour le Ki67, les taux circulants de CA-15.3, le statut uPA/PAI-1 et les données histologiques d'angioinvasion. L'ensemble des données récoltées sont anonymisées.

VII. CULTURE CELLULAIRE

Culture cellulaire

Les lignées HeLa et UACC-812 ont été obtenues à l'ATCC (American Type Culture Collection) et sont maintenues au service de culture cellulaire de l'IGBMC. La lignée HeLa, cellules adénocarcinomateuses de l'utérus, est cultivée en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 1g/L de glucose, 5% FCS (Fœtal Calf Serum), 40 µg/mL de gentamicine. La lignée UACC-812, cellules cancéreuse mammaires humaines, est cultivée en milieu Leibovitz-L15 contenant 10% de FCS, 1% de fungizone, 40 µg/mL de gentamicine. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C avec 5% de CO2 et à humidité saturante jusqu'à 70-80% de confluence.

Préparation des extraits protéiques cellulaires :

Après 2 lavages par du Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X (1,7mM KH_2PO_4 ; 2,6mM KCL ; 137mM NaCl ; 10mM Na_2HPO_4), les cellules sont lysées avec du tampon RIPA (PBS 1X ; 0,1% SDS ; 0,5% NP40 ; 0,5% déoxycholate de sodium). Après 5min d'agitation sur de la glace, le lysat cellulaire est ensuite transféré en falcon à l'aide d'un grattoir. Après une étape de fragmentation des acides nucléiques (3 x 2 sec à 25% d'amplitude), les extraits sont centrifugés 10min à 10 000 rpm. Le surnageant est récupéré et contient les protéines cellulaires.

VIII. ANALYSE STATISTIQUE

La stratégie de choix des tests statistiques réalisés est présentée dans la figure 19. Dans un premier temps, la normalité de la distribution de chaque critère dans la population a été testée. Le test d'Agostino et Pearson a été choisi car il est adapté aux variables comprenant de nombreux ex-æquo. Lorsque le test d'Agostino-Pearson était significatif, les tests suivants étaient des tests non-paramétriques ou « distribution-free ». En cas de comparaison de plusieurs groupes, après un test d'analyse de la variance non paramétrique par le test de Kruskal-Wallis, des tests de comparaison multiples par la méthode de Dunn ont été réalisés. En cas de comparaison de deux groupes, un test de Mann-Withney a été utilisé. En cas de calcul du coefficient de corrélation, le coefficient de Spearman a été choisi. Lorsque le test d'Agostino-Pearson était non-significatif, les tests suivants étaient des tests paramétriques. En cas de comparaison de plusieurs groupes, après un test d'analyse de la variance paramétrique (ANOVA), des tests de Tuckey ont été réalisés. En cas de comparaison de deux groupes, un test de Student non apparié a été utilisé. En cas de calcul du coefficient de corrélation, le coefficient de Pearson a été choisi. Lors de l'estimation de l'association entre deux variables, l'évaluation du coefficient de corrélation a été choisie plutôt que le test de la pente à zéro car les variables étaient symétriques, sans cause à effet, et non manipulées par l'expérimentateur dans toutes les situations. Pour représenter les barres d'erreur, l'écart type (SD) a été représenté graphiquement et non l'erreur standard de la moyenne (SEM). En effet, la répartition des variables est la conséquence des variations biologiques ; les variables ne sont pas manipulées par l'expérimentateur. L'ensemble des tests statistiques et des graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad PRISM®. Les tests ont été réalisés au risque α 5%.

CHAPITRE 5. MISE AU POINT DU DOSAGE

I. CHOIX DES OUTILS

La technique de dosage.

Nous avons choisi de mesurer l'expression des protéines d'intérêt par WB au cours d'au moins 3 expériences indépendantes. Cette méthode présente des avantages d'ordre technique, économique et scientifique.

*Au niveau technique***,** les échantillons tumoraux dont nous bénéficions sont des extraits protéiques. La méthode de traitement des tissus mammaires tumoraux mise au point pour uPA/PAI-1 est parfaitement compatible avec une analyse protéique par Western Blot. Notre laboratoire étudie TFF1 et TFF3 depuis plusieurs décennies. En conséquence, nous possédons plusieurs anticorps primaires performants et validés pour chaque protéine. Cette technique de biologie moléculaire est utilisée quotidiennement dans notre laboratoire. Une cuve d'électrophorèse et une cuve de transfert permettant l'analyse simultanée de 192 (2 x 96) échantillons est disponible.

*Au niveau économique***,** les anticorps primaires et le matériel étaient déjà disponibles au laboratoire avant de démarrer l'étude. Les gels et les tampons sont « fait-maison ». Le département a récemment fait l'achat d'un ImageQuant LAS 4000 permettant l'acquisition « en rafale » des images et la numérisation simultanée de celles-ci. Cet appareil permet un gain de temps et une économie non négligeable de films photographiques. En conséquent, cette technique est peu couteuse.

*Au niveau scientifique***,** l'ADN est transcrit en ARN dans le noyau puis traduit en protéine dans le cytoplasme des cellules. La méthode du WB permet une analyse au niveau protéique, donc au niveau de la dernière étape de l'expression des gènes (Figure 20).

Le témoin de charge

Avant dépôt, la concentration en protéine totale des échantillons protéiques tumoraux est normalisée à 1 mg/ml. Néanmoins, pour s'affranchir des variations de concentration en protéine totale entre échantillons, un témoin de charge est nécessaire. C'est une protéine dont la quantité ne varie pas en fonction des conditions expérimentales. Les ratios [protéine d'intérêt] / [témoin de charge] sont comparables entre eux et permettent d'établir une quantification relative de la protéine d'intérêt.

Nous avons testé plusieurs protéines, potentiellement stables dans les tumeurs, sur un panel de 30 patientes (Figure 21). L'actine (42k Da) et la tubuline (52k Da) sont deux protéines ubiquitaires, la première constitue les microfilaments et la seconde, les microtubules du cytosquelette. EIF4AIII (46

kDa) est une protéine étudiée au laboratoire, impliquée dans la régulation de la transcription et habituellement stable. Elle fait partie du cœur de l'EJC (Exon Junction Complex) [362,363]. De manière intéressante et tout à fait inattendue, eIF4AIII s'exprime de façon différentielle dans notre panel d'échantillons tumoraux mammaires. Cette protéine fait actuellement l'objet d'une étude approfondie sur un plus grand nombre de patientes dans notre équipe.
Sur ce panel, l'actine est un témoin de charge plus stable que la tubuline ; nous l'avons sélectionnée pour la suite des expériences.

Le gel SDS-PAGE

Les gels de polyacrylamide sont obtenus par polymérisation du monomère acrylamide en présence d'un monomère bifonctionnel, le bisacrylamide. La réaction a lieu en présence d'APS (Ammonium PerSulfate) et de TEMED (N,N,N',N'-TEtraMEthylèneDiamine). Le TEMED catalyse la formation de radicaux libres à partir du persulfate, initiant la polymérisation. Le pourcentage de monomère peut aller de 2.5% (limite de la solidité) à 30%. Lorsque la proportion totale en monomère est élevée, les mailles du gel sont très serrées. Ce type de gel est adapté pour séparer les protéines de faible poids moléculaire, comme TFF1 et TFF3 (6.5 et 7 kDa). Par ailleurs, les gels avec gradient de concentration en acrylamide ont des résolutions plus élevées. Nous avons donc un choisi un gradient de concentration de 20% (en bas du gel) vers 10% (en haut du gel).

Les anticorps secondaires

Nous utilisons habituellement des anticorps secondaires (anti-lapin et anti-souris) produits chez la chèvre, couplés à la peroxydase, de chez Jackson ImmunoResearch Laboratories, modèle « AffiniPure ». Le bruit de fond étant important, un autre modèle est actuellement utilisé « AffiniPure minimal cross-reaction to Human Mouse and Rat Proteins » du même laboratoire. Ces anticorps ont une cross-réactivité diminuée avec l'espèce humaine, diminuant le nombre de bandes aspécifiques.

Le révélateur

Nous utilisons habituellement le révélateur Amserham™ ECL™ Western Blotting Detection (GE Healthcare®). Afin d'améliorer le signal, nous en avons testé trois autres : le RevelBlOt Intense (Ozyme®), l'Immobilon Western Chimiluminescent Substrate (Millipore®) et le SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (ThermoFischer®). Le révélateur de chez Ozyme® est le plus approprié pour ce type d'expérience, il permet d'obtenir un signal net. Par ailleurs, c'est le moins cher des quatre.

II. PRINCIPE DU CALIBRATEUR

A. Le calibrateur

Le Western Blot est une technique de dosage semi quantitative. Elle ne permet pas de déterminer la quantité absolue de la protéine d'intérêt présente dans l'échantillon. Par contre, elle permet de déterminer une quantité relative de protéine et de comparer des échantillons entre eux. Le calibrateur est une méthode de quantification relative.

i. *Confection de la gamme*

Pour préparer le calibrateur, deux lignées cellulaires sont utilisées (Figure 22.a). La lignée cellulaire HeLa, cellules cancéreuses humaines du col utérin, n'expriment ni TFF1 ni TFF3 [364,365]. La lignée UACC812, cellules cancéreuses humaines mammaires, expriment très fortement TFF1 et TFF3 [365]. Les protéines cellulaires extraites sont dosées par la méthode de Pierce, puis normalisés à 1mg/mL. La gamme de calibration est constituée d'une quantité croissante d'extraits cellulaires exprimant TFF1/TFF3 (UACC812) et d'une quantité décroissante d'extraits cellulaires n'exprimant pas TFF1/TFF3 (HeLa). Elle comprend 4 points : 0 : pas d'expression, + : expression faible, ++ : expression moyenne, +++ : expression forte. Un Western Blot est réalisé pour contrôler l'expression des protéines d'intérêt (Figure 22.b). La quantité de protéine d'intérêt augmente dans la gamme (ligne TFF1, ligne TFF3) alors que la quantité de protéines totale reste constante (ligne actine). Une quantification des pixels est réalisée sur ImageJ®, et les rapports [protéine d'intérêt] / [témoin de charge] sont calculés sur Excel®. De ces calculs, nous avons dérivé l'immunoscore qui sera utilisé dans l'étude. Des graphes visualisent les résultats (Figure 22.c et d). Il est intéressant de remarquer que la courbe représentant l'actine reste stable tandis que celle représentant la protéine d'intérêt croit de manière linéaire.

ii. *Intérêt du calibrateur*

Chaque point de la gamme du calibrateur est déposé deux fois à chaque gel, une fois pour évaluer l'expression de TFF1, et une fois pour évaluer l'expression de TFF3. Chaque point de la gamme a été préparé en grande quantité et aliquoté afin de disposer d'une quantité suffisante d'extraits pour toutes les expériences de la série. A chaque immunoblot, les expressions de la protéine d'intérêt et de l'actine sont quantifiées pour chaque point de la gamme. Un rapport TFF/actine est calculé pour normaliser l'expression de la protéine d'intérêt. Par exemple, point 0 : rapport très proche de 0, point + : rapport égal à 0.3, point ++ : rapport égal à 0.6 et point +++ : rapport égal à 0.9. Avec le même procédé, les

expressions de la protéine d'intérêt et de l'actine sont quantifiées pour chaque échantillon tumoral et un rapport TFF/actine est calculé. Selon leur rapport TFFs/actine, les échantillons tumoraux se voient attribuer un score 0, +, ++ ou +++. Par exemple, avec les rapports obtenus ci-dessus pour la gamme, rapport inférieur à 0.15 : score 0, rapport entre 0.15 et 0.45 : score +, rapport entre 0.45 et 0.75 : score ++, rapport supérieur à 0.75 : score +++. Il est important de souligner que les rapports obtenus pour la gamme ne sont valables que pour les échantillons déposés sur le même gel et transférés sur la même membrane. Le calibrateur permet de situer la zone de linéarité de la quantification. Lorsque la quantité de protéines déposée est trop importante, l'image est saturée et la courbe atteint un plateau. Si la bande d'intérêt d'un échantillon tumoral a une intensité plus forte que le point +++ de la gamme, il faut diluer cet échantillon et le redéposer.

Par ailleurs, le point 0 de la gamme constitue un témoin négatif et le point +++ un contrôle positif de l'anticorps primaire. Le contrôle positif permet de repérer, en complément du marqueur de taille moléculaire, la position de la bande d'intérêt sur la membrane.

B. **Définition d'un score clinique**

Un score permet de guider le clinicien dans l'établissement du diagnostic, l'estimation du pronostic ou dans une décision thérapeutique. Il permet de quantifier la contribution individuelle d'un paramètre. En standardisant l'évaluation de celui-ci, un score facilite l'application des recommandations et la communication entre professionnels de santé. Les scores modernes sont établis par analyse statistique. Il s'agit de déterminer la force de la corrélation entre une variable quantifiable (un biomarqueur) et un critère clinique (la réponse au traitement par exemple).

Il est important de noter qu'ici les scores 0, +, ++, +++ n'ont aucune signification clinique. Ils ont été établis de façon empirique. Plusieurs gammes ont été constituées, selon la méthode décrite ci-dessus, avec une « fourchette » d'expression des protéines d'intérêt plus ou moins ample. Deux critères principaux ont permis de sélectionner le calibrateur qui a été utilisé lors de cette étude. D'une part, la « fourchette » d'expression des protéines d'intérêt ne doit pas être trop ample afin que l'ensemble de la gamme se situe dans la zone de linéarité de la mesure ; le point le plus haut ne doit pas avoir atteint le plateau. D'autre part, la « fourchette » d'expression des protéines d'intérêt doit être suffisamment ample afin de refléter les variations observées dans les tumeurs. Pour avoir un aperçu de l'amplitude de la variation d'expression des TFFs dans les tumeurs, nous avons réalisé une étude pilote sur 30 cas.

CHAPITRE 6. RESULTATS DE L'ETUDE CLINIQUE ET DISCUSSION

I. DESCRIPTION DE LA POPULATION ETUDIEE

Au cours de la période concernée, du 14 octobre 2011 au 02 juillet 2012, nous avons obtenu les échantillons de 121 patients. 25 d'entre eux ont été exclus selon les critères établis au préalable : 2 sont des hommes, 4 ont reçu une chimiothérapie néo-adjuvante, 3 sont des cas de récidive, 6 échantillons protéiques n'étaient pas assez concentrés (<1mg/ml), et 10 patients n'avait pas donné leur consentement. Parmi les 96 patientes restantes, une d'entre elles a été opérée des deux seins. Ce document présente donc l'analyse de 97 échantillons.

Dans notre population, l'âge moyen du diagnostic était de 61 ans et 8 mois (tableau 14). La patiente la plus jeune était âgée de 35 ans et la patiente la plus âgée de 90 ans. Plus de 80% des patientes avait plus de 50 ans et étaient ménopausées au moment de l'analyse. Il est intéressant de noter que la proportion de femmes ménopausées dans la sous-population HER2+ est beaucoup plus faible (50%) que dans la population générale. Plus de 80% des patientes n'ont jamais été traitées par THS. Par ailleurs, 40% des patientes de notre panel ont eu une ménarche tardive, après 13 ans. 45% des patientes avaient un ou plusieurs antécédents de cancer du sein dans leur famille. En revanche, aucune d'entre elles n'était porteuse de la mutation *BRCA1*/*BRCA2*. Près de 80% des patientes étaient indemnes de toute suspicion métastatique au moment du diagnostic.

Selon les critères moléculaires, les tumeurs luminales ou hormono-dépendantes représentaient la grande majorité des tumeurs notre panel (n=83, soit 86%) (tableau 15). Parmi celles-ci, 22% étaient RE+/RP- et 78% étaient RE+/RP+. Selon la littérature, les tumeurs RE-/RP+ sont très rares. Dans notre panel, il n'y en avait aucune. La proportion de tumeurs HER2 de notre panel était plutôt faible (n=8, soit 8%). Parmi celles-ci, trois étaient RE-/RP-, deux étaient RE+/RP+ et trois étaient RE+/RP-. La proportion de tumeurs triple-négatives était habituelle (n=11, soit 11%). Dix d'entre elles étaient de mauvais pronostic avec un grade SBR de 3, et un grade SBRM de 4 ou 5 ; la proportion de patientes avec envahissement ganglionnaire dans ce groupe était particulièrement importante (9 patientes sur 11). Il est intéressant de noter que toutes les tumeurs HER2 et triple négatives, classiquement de mauvais pronostic, présentaient un Ki67 > 15%. Selon les critères morphologiques, plus de 80% des tumeurs de notre panel étaient des carcinomes canalaires infiltrants. Concernant les marqueurs biologiques, 82% des patientes présentaient un taux de CA-15.3 physiologiques soit inférieur au seuil de <30UI/ml (tableau 16).

Globalement, les caractéristiques cliniques, morphologiques et moléculaires des tumeurs étudiées dans cette série correspondent à celles trouvées dans la littérature et nous pouvons considérer cette série

comme représentative de la maladie cancéreuse mammaire. Néanmoins, il convient de garder à l'esprit que toutes les patientes ne sont pas inclues notamment, le patientes dont les tumeurs étaient de petite taille. En conséquence, les observations faites sur cette série ne sont valables que pour les tumeurs primitives de >1 cm touchant des femmes.

II. ANALYSE DES RESULTATS ET DISCUSSION

Parmi les trois protéines de la famille des facteurs en trèfles (TFF), seul TFF2 n'est jamais retrouvé dans les tumeurs mammaires.

Les extraits protéiques tumoraux ont été analysés par WB et la présence de TFF1, de TFF2 et de TFF3 a été recherchée à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines humaines. Ce travail a été répété par au moins 3 expériences indépendantes. Les résultats étaient reproductibles d'une manipulation à une autre. Dans notre panel, la protéine TFF1 a pu être détectée dans 35 échantillons sur 97, soit 36% de la population globale et 42% des tumeurs luminales RE+ (figure 23-a, tableau 12). L'expression de la protéine TFF2 n'a été détectée dans aucun échantillon (données non montrées). L'expression de TFF3 a pu être détectée dans 16 échantillons sur 97, soit 16.5% de la population globale, et 19% des tumeurs luminales RE+ (figure 23-b, tableau 13). Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que l'expression de TFF3, comme celle de TFF1, varie énormément d'un échantillon de tumeur à l'autre (figure 23-a et b). En conclusion, dans la série de 97 tumeurs, TFF1 et TFF3 sont retrouvées surexprimés dans un certain nombre de tumeurs de type luminal. En revanche TFF2 n'est pas exprimé dans les tumeurs mammaires.

TFF1 et TFF3 ne sont pas nécessairement co-exprimés dans les tumeurs de notre panel.

Peu d'études ont étudié conjointement l'expression de TFF1 et de TFF3 dans des tumeurs mammaires humaines [252,342]. Dans notre panel, 59% de tumeurs sont TFF1/TFF3 double négatives, 15% de tumeurs sont TFF1/TFF3 double positives, et 26% de tumeurs sont TFF1 ou TFF3 simple positives (figure 23-c). Par exemple, la tumeur de la patiente N°58 est fortement positive pour TFF1 et négative pour TFF3, alors que celle de la patiente N°89 est fortement positive pour TFF3 et négative pour TFF1 (figure 23-a et b). L'association entre l'expression des deux facteurs a été testée par le coefficient de corrélation de Spearman (figure 23-d et e). Lorsque l'ensemble de la population est considérée (n=97), une corrélation significative est observée entre l'expression de TFF1 et celle de TFF3 (r=0.42) (figure 23-d). Cette corrélation pourrait en partie s'expliquer par le grand nombre (n=59) de tumeurs TFF1 /TFF3 double négatives dans la population. En effet, lorsque celles-ci sont retirées de l'analyse (n=39), le coefficient de corrélation entre l'expression de TFF1 et l'expression de TFF3 chute

considérablement (r=0.06) (figure 23-e). En conclusion, dans notre panel de tumeurs, l'expression de la protéine TFF1 et celle de la protéine TFF3 ne semblent pas systématiquement liées.

L'expression de TFF1, mais pas celle de TFF3, est associée à l'expression du RE.

L'ensemble des données de la littérature s'accordent pour dire que l'expression de TFF1 est fortement corrélée à celle des récepteurs hormonaux (RE et RP) [216,327,329,330,332,336–339,341,342]. L'association entre l'expression des récepteurs hormonaux et les TFFs a été testée par le coefficient de corrélation non-paramétrique de Spearman. En accord avec les études précédentes, dans la série décrite ici, un lien significatif a pu être mis en évidence entre l'expression de TFF1 et l'expression du RE (r=0.30). Une tendance à l'association est également observée entre l'expression de TFF1 et l'expression du RP (r=0.18) (figure 24-a et c). Dans la littérature, les données concernant l'association entre l'expression de TFF3 et l'expression des récepteurs hormonaux sont plus rares. Récemment, deux études ont mis en évidence une corrélation entre l'expression de TFF3 et l'expression des récepteurs hormonaux [342,347]. Dans notre série, quoique toutes les tumeurs positives pour TFF3 soient de type luminal (RE+), l'association entre l'expression de TFF3 et l'expression des récepteurs hormonaux par le coefficient de corrélation de Spearman n'est pas significative (figure 24-b et d). Etant donné que la présence de TFF3 est assez rare dans notre série, il est possible que le nombre de cas étudiés soit insuffisant pour atteindre la signification statistique. Par ailleurs, en considérant l'expression relative de TFF1 et de TFF3 déterminée par immunoscore, des associations significatives ont pu être mises en évidence par une analyse non paramétrique de la variance de Kruskal-Wallis entre les groupes RE-/RP-, RE+/RP-, et RE+/RP+ (aucune patiente RE-/RP+ dans notre panel). Des tests de comparaison multiples de Dunn ont montré que l'expression de TFF1, mais pas celle de TFF3, est plus forte dans les groupes exprimant au moins un des deux récepteurs hormonaux (figure 24-e et f).

Pour conclure, TFF1 et TFF3 sont exprimés par certaines tumeurs luminales. Nous avons trouvé une association entre l'expression de TFF1 et l'expression du RE. Certains de nos résultats ne sont pas tout à fait en accord avec la littérature. Néanmoins, il est important de noter que ces résultats sont préliminaires, certains coefficients de corrélation sont à la limite de la significativité. Avant de conclure, il est nécessaire de poursuivre les inclusions afin de disposer d'un plus grand nombre d'échantillons.

L'expression conjointe de TFF1 et de TFF3 dans une même tumeur est associée à des critères histologiques de mauvais pronostic.

Nous avons recherché une association éventuelle entre l'expression de TFF1 et de TFF3 et différents critères histologiques comme la taille moyenne des tumeurs, le grade SBR moyen et le grade SBRM

moyen. En tenant compte du niveau d'expression de TFF1 et de TFF3 par immunoscore, les groupes de tumeurs TFF1-, TFF1+, TFF1++ et TFF1+++ et les groupes de tumeurs TFF3-,TFF3+, TFF3++ et TFF3+++ ont été comparés par une analyse de la variance non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Aucune association significative n'a été mise en évidence entre l'expression individuelle des TFFs et les marqueurs histologiques (figure 25, a et b, d et e, g et h). En revanche, une analyse non paramétrique de la variance de Kruskal-Wallis entre les groupes TFF1/TFF3 double négatives, TFF1 ou TTF3 simple positives, et TFF1/TFF3 doubles positives a permis de mettre en évidence des associations significatives (figure 25-c, f et i). Des tests de comparaison multiple de Dunn ont permis de montrer que les tumeurs TFF1/TFF3 doubles positives sont significativement de plus grande taille que les tumeurs TFF1 simple positives ou les tumeurs TFF1/TFF3 doubles négatives.
De plus, les tumeurs TFF1/TFF3 doubles positives sont de grade plus élevé (SBR et SBRM) que les tumeurs TFF1 simples positives. Ces associations révèlent pour la première fois que les tumeurs TFF1/TFF3 doubles positives sont potentiellement de pronostic plus sombre que les tumeurs TFF1 simple positives.

Association entre l'expression des TFFs et des marqueurs tumoraux : CA-15.3, uPA/PAI-1 et Ki-67.

A notre connaissance, aucune étude n'a recherché à ce jour d'association entre l'expression des TFFs et les marqueurs tumoraux tels que les concentrations sériques de CA-15.3, et intra-tumorales d'uPA/PAI-1. Les concentrations moyennes de CA-15.3, d'uPA/PAI-1 et le Ki67 sont systématiquement déterminés et renseignés dans les dossiers des patientes. Comme précédemment, les groupes de tumeurs TFF1-, TFF1+, TFF1++ et TFF1+++ et les groupes de tumeurs TFF3-,TFF3+, TFF3++ et TFF3+++ ont été comparés par une analyse de la variance non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Concernant CA-15.3 et uPA/PAI-1, aucune association significative n'a été mise en évidence (figure 26, a et b, g et h, j et k). Une tendance à la diminution du pourcentage de Ki67 quand l'expression de TFF1 ou de TFF3 augmente est néanmoins observée, sans atteindre la significativité statistique (figure 26, d et e). Ce résultat est en accord avec une étude récente montrant une corrélation négative entre l'expression de TFF3 et le pourcentage de cellules cancéreuses positives pour Ki67 [347].
Une analyse non paramétrique de la variance de Kruskal-Wallis des concentrations de Ki67, de CA-15.3 et d'uPA entre les groupes TFF1/TFF3 double négatives, TFF1 ou TFF3 simple positives, et TFF1/TFF3 doubles positives n'a mis en évidence aucune association significative. En revanche, les tests de comparaison multiple de Dunn des concentrations de PAI-1montrent que les tumeurs TFF1/TFF3 doubles positives expriment des concentrations plus faibles de PAI-1 que les tumeurs TFF1/TFF3 doubles négatives ou les tumeurs TFF1 simples positives. Cependant, les concentrations

intra-tumorales des marqueurs uPA et PAI-1 doivent être interprétées de concert. Il a été montré que doser l'un ou l'autre des marqueurs est moins informatif en terme de pronostic que le dosage combiné des deux marqueurs [366]. En effet, une analyse non paramétrique de la variance de Kruskal-Wallis de l'expression moyenne des TFFs entre les groupes uPA/PAI-1 double négatifs, uPA ou PAI-1 simple positif et uPA/PAI-1 double positif n'a pas mis en évidence d'association (données non montrées).
En conclusion, l'expression conjointe de TFF1 et de TFF3 au sein d'une même tumeur n'a pas pu être associée de manière significative aux marqueurs CA-15.3, au duo uPA/PAI-1 et au pourcentage de cellules positives pour le Ki67.

L'expression conjointe de TFF1 et de TFF3 dans une même tumeur est associée à certains marqueurs de progression tumorale précoce.

La présence d'emboles vasculaires et/ou lymphatiques à proximité de la tumeur est un critère pronostique important. Le pathologiste précise le degré d'angioinvasion dans le compte rendu d'anatomopathologie : présence d'aucun, de rares, ou de nombreux emboles vasculaires. Afin de déterminer l'association potentielle entre l'expression des TFFs et l'angioinvasion, un score de 0 a été attribué au commentaire « aucun embole », un score de 1 a été attribué au commentaire « rares emboles », et un score de 2 a été attribué au commentaire « nombreux emboles ». A notre connaissance, l'association entre l'expression de TFF1 et l'angioinvasion n'a jamais été explorée. En revanche, une équipe a récemment étudié l'association entre l'expression de TFF3 et l'angioinvasion. Il a été montré que les cellules cancéreuses présentes dans les vaisseaux vasculaires ou lymphatiques des régions péri-tumorales exprimaient fortement TFF3 [347]. Cet article est allé plus loin en indiquant que les tumeurs exprimant fortement TFF3 présentaient plus de vaisseaux lymphatiques ou vasculaires envahis par des cellules cancéreuses que les tumeurs n'exprimant pas TFF3. Les scores moyens d'angioinvasion ont été comparés entre les groupes de tumeurs TFF1-, TFF1+, TFF1++ et TFF1+++ et entre les groupes de tumeurs TFF3-,TFF3+, TFF3++ et TFF3+++ par une analyse de la variance non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Aucune association significative n'a été mise en évidence concernant l'expression de TFF1 (figure 27-a). Concernant TFF3, les tests de comparaison multiples de Dunn montrent que le groupe TFF3+++ est plus sujet à l'angioinvasion que le groupe TFF3- (figure 27-b). De plus et de manière intéressante, une analyse non paramétrique de la variance de Kruskal-Wallis entre les groupes TFF1/TFF3 double négatives, TFF1 ou TTF3 simple positives, et TFF1/TFF3 doubles positives a permis de mettre en évidence des associations significatives. Les tests de comparaison multiples de Dunn montrent que les tumeurs doubles positives pour TFF1/TFF3 étaient plus sujettes à l'angioinvasion que les tumeurs simples positives pour TFF1 dans notre panel (figure 27-c).

Il est important de souligner ici que le promoteur du gène TFF3 possède un élément de réponse à HIF1α (Hypoxia Inducible Factor 1α) [226] (cf. Ch.2-IV-D). HIF1α participe à la formation de nouveaux vaisseaux. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la présence de TFF3 dans des cellules cancéreuses à proximité des vaisseaux. TFF3 joue effectivement un rôle dans le processus angiogénique et favorise la formation de vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Alternativement, la présence de TFF3 dans ces cellules tumorales est le reflet de l'action de HIF1α. L'hypoxie est un signal important dans le développement et la croissance tumorale, elle va déclencher la formation de néovaisseaux. HIF1α, stabilisé en l'absence d'oxygène, se fixe sur la séquence HRE (Hypoxia Responsive Element) de TFF3 et active sa transcription. Le signal angiogénique est transmis *via* la sécrétion de facteurs de croissance, comme le VEGF (Vascular Endothélial Growth Factor), de survie, et de migration.

En conclusion, l'expression conjointe de TFF1 et de TFF3 ainsi que l'expression forte de TFF3 sont associées à la présence de plus nombreux emboles vasculaires. Cette donnée renforce la notion selon laquelle les tumeurs doubles positives TFF1/TFF3 sont associées à certains critères de mauvais pronostic.

Les expressions de TFF1 et de TFF3 ne sont pas associées à l'envahissement ganglionnaire.

L'ensemble des données de la littérature s'accordent pour dire que les TFFs jouent un rôle positif dans le processus de migration cellulaire [266,269,271–279]. De plus, TFF1 et TFF3 sont des marqueurs prédictifs d'apparition de métastases osseuses dans le cancer du sein [350]. L'envahissement ganglionnaire par des cellules cancéreuses est un élément pronostique majeur de la prise en charge des cancers du sein. En cas de carcinome invasif, un ou plusieurs ganglions sont retirés lors de la chirurgie axillaire et analysés (cf. Ch.1-VI-A). Le compte rendu du pathologiste figure dans les dossiers des patientes. Dans la littérature, TFF1 a été considéré tantôt comme non associé à l'envahissement ganglionnaire [327,336,339], tantôt comme associé [332]. TFF3 a été associé à l'envahissement ganglionnaire dans une étude récente [347].

Afin d'étudier l'association éventuelle entre l'expression des TFFs et l'envahissement ganglionnaire, nous avons choisi de considérer à part les ganglions présentant des microlésions. En effet, un score de 0 a été attribué lorsqu'aucun ganglion n'était envahi, un score de 1 lorsqu'un ganglion présentait des microlésions, un score de 2 lorsqu'un ganglion ou plus était envahi. Les scores moyens d'envahissement ganglionnaire ont été comparés entre les groupes de tumeurs TFF1-, TFF1+, TFF1++ et TFF1+++ et entre les groupes de tumeurs TFF3-,TFF3+, TFF3++ et TFF3+++ par une analyse de la variance non-paramétrique de Kruskal-Wallis (figure 27-d et e). Les scores moyens du nombre de ganglions envahis ont été également comparés entre ces mêmes groupes par une analyse de la variance

non-paramétrique de Kruskal-Wallis (données non montrées). Aucune des deux approches n'a mis en évidence d'association significative. La comparaison des groupes TFF1/TFF3 double négatives, TFF1 ou TTF3 simple positives, TFF1/TFF3 doubles positives n'a pas révélé de d'association non plus (figure 27-f).

Par ailleurs, une étude a exploré l'expression de TFF3 dans les tumeurs primitives, les ganglions envahis et les métastases [347]. L'expression de TFF3 était plus forte dans les métastases que dans les cellules cancéreuses des ganglions. De même, l'expression de TFF3 était plus forte dans les ganglions envahis que dans les tumeurs primitives. Une autre étude a analysé l'expression de TFF1 et de TFF3 dans des ganglions axillaires. L'expression des TTFs était plus forte dans les ganglions métastasés par un cancer du sein que dans les ganglions sains (n=20) [367]. Pour l'une des patientes de notre panel, nous avons pu récupérer un échantillon d'un ganglion envahi. Alors que la tumeur primitive était TFF1++/TFF3–, de manière remarquable, le ganglion envahi était TFF1++/TFF3+ (figure 27-g).

L'expression de TFF1 et de TFF3 a été corrélée à l'apparition de métastases osseuses [350] et musculaire pour TFF3 [347]. Dans notre panel de patientes, nous ne pouvons pas conclure sur ce point car la cohorte est constituée de patientes non métastatiques. En effet, une seule présentait un diagnostic de certitude de métastases osseuses. En conclusion, sur notre série il n'y a pas d'association entre la présence de TFF1 et/ou TFF3 et l'envahissement ganglionnaire.

L'expression de TFF1 est plus fréquente dans les tumeurs de patientes ayant eue une ménarche précoce et plus rare dans les tumeurs des patientes ménopausées.

TFF1 et TFF3 étant exprimés dans les cancers hormonodépendants, nous nous sommes intéressés aux paramètres reflétant l'exposition à la fenêtre œstrogènique comme la ménarche, la ménopause et la prise de substituts hormonaux.

Pour la première fois à notre connaissance, l'association potentielle entre l'expression des TFFs et l'âge de la ménarche, le nombre d'accouchements et le nombre de mois d'allaitement ont été étudiés. L'âge moyen de la ménarche a été comparé entre les groupes TFF1 négatifs et TFF1 positifs, et entre les groupes TFF3 négatifs et TFF3 positifs par un test de Student. Seule une association positive entre TFF1 et l'âge de la ménarche a été trouvée (figure 28-a). Les patientes dont les tumeurs expriment TFF1 ont eu leurs premières règles plus tôt en moyenne que celles n'exprimant pas TFF1 (figure 28-a). Le nombre moyen d'accouchements et le nombre moyen de mois d'allaitement ont été comparés entre les groupes TFF1 négatifs et TFF1 positifs, et entre les groupes TFF3 négatifs et TFF3 positifs par un test de Mann-Withney. Aucune association significative n'a été retrouvée entre l'expression des TFFs et le nombre d'accouchements ou le nombre de mois d'allaitement des enfants (figure 28-c et d). En

revanche, une tendance est observée : les patientes dont les tumeurs expriment TFF1 ou TFF3 ont allaité en moyenne plus longtemps que celles n'exprimant pas les TFFs (figure 28-e et f).

Par ailleurs, l'expression moyenne de TFF1 et de TFF3 a été comparée entre le groupe des femmes ménopausées et le groupe des femmes non ménopausées par un test de Mann-Withney (figure 29-e et f). Les tumeurs des femmes ménopausées expriment plus faiblement TFF1 que les tumeurs des femmes non ménopausées. Ce résultat est en accord avec la littérature [327,332,333,336,341]. Concernant TFF3, il n'existe pas de données publiées, et nous n'avons pas trouvé d'association significative. Cependant, une tendance à une diminution de l'expression de TFF3 est observée dans les tumeurs touchant des femmes ménopausées. Afin de s'assurer de la validité de notre analyse, nous avons étudié l'association entre l'expression du RE et le statut ovarien des patientes de notre série. Pour cela, le score H moyen du RE des tumeurs (cf.Ch.1-IV-A-i) a été comparé entre le groupe des femmes ménopausées et le groupe des femmes non ménopausées par un test de Mann-Withney (figure 29-d). En accord avec la littérature, les tumeurs des femmes non ménopausées expriment plus volontiers le RE que les tumeurs des femmes ménopausées.

Enfin, l'association entre la présence de TFF1 et/ou de TFF3 et l'exposition aux hormones stéroïdes exogènes a été étudiée. Le nombre moyen d'années de traitement par un THS a été comparé entre les groupes TFF1 négatifs et TFF1 positifs, et entre les groupes TFF3 négatifs et TFF3 positifs par un test de Mann-Withney (figure 29-g et h). Aucune association significative n'a été mise en évidence entre les groupes. Cependant, une tendance se dégage de cette analyse, il semblerait que les patientes n'ayant pas ou peu été traitées par THS ont eu des tumeurs qui expriment plus volontiers TFF1.

En conclusion, l'expression de TFF1 par les tumeurs du sein est potentiellement liée à l'exposition de la patiente aux hormones ovariennes. En effet, les patientes ayant eu leurs premières règles plus tôt (exposées plus jeunes aux hormones ovariennes, donc potentiellement plus longtemps) présentent des tumeurs exprimant plus volontiers TFF1. De même, les patientes non ménopausées, donc encore exposées aux hormones d'origine ovarienne, expriment plus fortement TFF1. Ces résultats sont préliminaires et ils seront ré-analysés sur une cohorte plus large.

L'expression de TFF1 et/ou de TFF3 n'est pas associée à l'âge.

L'âge moyen des patientes a été comparé entre les groupes de tumeurs TFF1-, TFF1+, TFF1++ et TFF1+++ et entre les groupes de tumeurs TFF3-,TFF3+, TFF3++ et TFF3+++ par une analyse de la variance non-paramétrique de Kruskal-Wallis (figure 29-a et b). En accord avec la littérature, aucune association significative n'a été mise en évidence entre les groupes [336,339].

CHAPITRE 7. CCONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La connaissance de la biologie moléculaire des cancers du sein a beaucoup progressé ces dernières années. Les avancées dans ce domaine ont mis en évidence des cibles moléculaires, ce qui a permis le développement de thérapies ciblées. Nous sommes particulièrement intéressés par les tumeurs de type luminal. En pratique clinique, elles sont déterminées grâce à la présence des récepteurs aux hormones stéroïdes, œstradiol (RE) et/ou progestérone (RP). Ces patientes sont éligibles à une thérapie antihormonale.

Le traitement adjuvant des patientes par chimiothérapie constitue une question d'actualité dans le cancer du sein. En effet, à la suite de l'opération, deux groupes de patientes se dessinent. Chez les patientes à risque de rechute et de métastase à distance, une chimiothérapie adjuvante est bénéfique et prolonge la survie sans progression. En revanche, chez les patientes à faible risque de rechute et de métastases à distance, une chimiothérapie adjuvante est génératrice de morbidité, voire de mortalité sans amélioration significative du pronostic de la patiente. Une batterie de critères (histologiques, biologiques, moléculaires, familiaux…) est à la disposition des cliniciens pour orienter une patiente vers l'un ou l'autre des groupes (voir Ch1.VI.C). Cependant, pour certaines patientes en situation intermédiaire et particulièrement celles sans atteinte ganglionnaire, le choix de la stratégie thérapeutique reste difficile. C'est pourquoi il est aujourd'hui nécessaire de développer de nouveaux outils fiables d'aide à la décision. Dans ce contexte, les protéines TFF1 et TFF3, étudiées depuis longtemps au laboratoire, représentent des biomarqueurs prédictifs potentiels pour le groupe des tumeurs mammaires de type luminal.

Nous avons déterminé l'expression de TFF1 et de TFF3 dans une cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein. Notre travail se distingue des autres études publiées pour plusieurs raisons. Premièrement, cette cohorte est prospective. Deuxièmement, l'expression de TFF1 et TFF3 a été déterminée par immunoblot, une méthode simple et peu couteuse. Troisièmement, et surtout, les deux protéines ont été étudiées conjointement et non séparément. Nos résultats montrent que l'étude conjointe de ces deux protéines met en évidence des informations originales, que n'apporte pas l'étude isolée de chacune d'entre elles, ouvrant ainsi des perspectives intéressantes.

La recherche de l'expression de TFF1et de TFF3 dans les cancers du sein a fait l'objet de nombreuses études. La compilation des données des principales publications, ainsi que l'analyse des données des puces à ADN (cf. Tableaux 11 et 12) montrent que les pourcentages de positivité sont extrêmement différents selon les études. En effet, la proportion de tumeurs positives varie entre 16 et 78% pour TFF1 et entre 15 à 89% pour TFF3. Il n'est pas vraisemblable que de telles différences reflètent une

réalité biologique. Différentes causes peuvent être à l'origine d'une telle disparité comme la méthodologie de dosage employée et le recrutement des cohortes de patientes.

Premièrement, des raisons méthodologiques peuvent être évoquées pour expliquer ces écarts. Selon les auteurs, l'expression des TFFs a été recherchée soit à l'échelle du transcrit (ARNm), soit à l'échelle de la protéine. De manière générale, les niveaux de transcrits reflètent ceux des protéines synthétisées. Cependant, des mécanismes de régulation post-transcriptionnels peuvent expliquer des différences entre le niveau d'expression des transcrits et la quantité de protéines correspondantes. Dans le cas des TFFs, cette explication n'est pas recevable. Comme l'indiquent les tableaux 11 et 12, les écarts de positivité sont tout aussi importants dans les études ayant détecté les transcrits (16 à 73 % pour TFF1 et 15 à 89 % pour TFF3) que dans celles ayant détecté les protéines (27 à 78% pour TFF1, une seule étude pour TFF3). De plus, un article montre que dans les cancers du sein, il existe une corrélation linéaire entre l'expression du transcrit et celle de la protéine TFF1 (Rio et al., 1987). Nous proposons une origine principalement méthodologique aux écarts observés. D'une part, différentes technologies ont été utilisés pour détecter soit les transcrits (NB, ISH, RT-PCR et puce à ADN), soit les protéines (ELSA et IHC). Chaque technologie possède sa propre sensibilité. Celles-ci diffèrent entre les techniques et peuvent expliquer en partie les écarts observés dans la littérature. D'autre part, et de manière plus importante encore, même lorsque la même technique a été employée, les seuils de positivité retenus par les auteurs diffèrent entre deux études. C'est pourquoi la comparaison entre les études est difficile. Considérés ensemble, ces éléments expliquent la grande disparité des résultats rapportés dans la littérature.

Deuxièmement, des problèmes lors du recrutement des cohortes de patientes peuvent être évoqués. En effet, il est connu que les TFFs s'expriment majoritairement dans les tumeurs luminales, qui représentent 60% de la population générale des cancers du sein. Contrairement aux TFFs, il existe un protocole standardisé d'évaluation de l'expression du RE dans les tissus tumoraux. Néanmoins il existe des écarts de positivité importants (38 à 83%) du RE entre les études. Ces écarts signifient que certaines sous-populations tumorales peuvent être sur- ou sous-représentées selon les études et ainsi introduire un biais dans l'exploitation des résultats.

Néanmoins, en éliminant les études portant sur des populations particulières (femmes enceintes, cancers de l'intervalle...) et utilisant une technique unique (ISH) et en analysant les données de la littérature sous l'angle méthodologique, nous avons remarqué que certaines études sont consistantes entre elles. Comme l'indique le tableau 13, il existe un écart important dans la proportion de tumeurs exprimant les TFFs selon la technique utilisée. Toutefois, les techniques IHC et ELSA offrent des résultats similaires avec des proportions élevées, environ 50% de positivité pour TFF1 et TFF3. En revanche, les techniques de puces à ADN trouvent des proportions plus faibles, 30% de positivité pour

TFF1 et TFF3. De manière intéressante, ces dernières sont proches de celles trouvées par immunoblot dans notre série. Cette analyse soulève plusieurs interrogations concernant notre méthodologie et ouvre des perspectives. Ces interrogations concernent les notions de sensibilité et de spécificité. Concernant la sensibilité, les techniques proposant les fréquences de positivité les plus élevées, IHC et tests ELSA, sont extrêmement sensibles. En revanche, les techniques proposant des fréquences de positivité plus faibles, les puces à ADN et la technique d'immunoblot telle que nous l'avons employée, sont moins sensibles. Concernant la spécificité, les techniques proposant les fréquences de positivité élevée comme l'IHC sont moins spécifiques que les techniques proposant les fréquences de positivité plus faibles comme les puces à ADN ou notre technique d'immunoblot. Les écarts de positivité relevés entre les différentes études et la nôtre sont probablement le reflet de la différence de sensibilité et de spécificité des méthodes employées. Nous avons choisi d'établir un immunoscore discriminant les cas TFF1 et/ou TFF3 franchement positifs afin de privilégier la spécificité à la sensibilité. Certains auteurs ayant montré que TFF1 et TFF3 sont exprimés faiblement dans le sein normal [252,347,368], il est légitime de s'interroger sur la signification biologique et l'intérêt de détecter les niveaux faible d'expression de TFF1 et TFF3.

La détermination du seuil de positivité pour un biomarqueur est difficile et sujette à débat. Elle repose sur un ensemble d'études cliniques indépendantes s'appuyant sur des méthodes statistiques spécifiques [369,370] Notre étude est préliminaire et dans un premier temps, il est nécessaire de valider, et éventuellement de modifier, l'immunoscore que nous avons utilisé. Dans un second temps, il s'agira de continuer les inclusions, de réaliser les dosages et d'analyser les résultats sur une cohorte plus importante.

En première perspective à ce travail et dans l'objectif de valider notre immunoscore, nous projetons de compléter les résultats obtenus par l'emploi d'une autre méthode de détection des TFFs sur les mêmes échantillons. En collaboration avec les cliniciens et pathologistes de l'hôpital, nous souhaitons étudier l'expression de TFF1 et TFF3 par IHC en double marquage. En effet, l'IHC apporte des informations cruciales sur la complexité de l'échantillon en termes cellulaires. Cette étude nous permettra de quantifier l'expression des TFFs dans les cellules tumorales, les cellules stromales et inflammatoires de la tumeur, et de manière importante, dans les cellules épithéliales et conjonctives normales présentes à distance de la tumeur (berges saines). De cette manière, il sera possible d'établir un histoscore à l'instar du score H utilisé pour la détermination de l'expression des récepteurs hormonaux. Afin de fixer le seuil de positivité, nous corrélerons les résultats obtenus par IHC (histoscore) aux résultats obtenus par WB (immunoscore).

De plus, une étude par IHC permettra de déterminer si TFF1 et TFF3 sont exprimés par les mêmes cellules dans les cas détectés double-positifs par WB. En effet, il a été montré que TFF1 et TFF3

peuvent former des homo- et des hétéro-dimères [234]. L'exploration de cette possibilité constitue la seconde perspective de travail. Les conséquences fonctionnelles de la présence d'hétérodimères TFF1-TFF3 dans les tumeurs n'ont pas été rapportées dans la littérature. Cependant, les résultats in vitro indiquent que sous forme de dimères, les TFFs ont des activités motogènes plus importantes que sous forme de monomères [234]. Une co-localisation de TFF1 et de TFF3 dans les mêmes cellules serait en faveur de la formation d'hétérodimères, suggérant que ces cellules auraient potentiellement des propriétés de migration accrue. Cette notion est particulièrement importante sachant que les études ayant analysé l'expression de TFF1 seul plaident en faveur d'un rôle de bon pronostic pour cette protéine [332, 337, 339, 341]. Une étude clinique indique que TFF1 et TFF3 font partie des 5 gènes les plus exprimés dans les tumeurs de patientes ayant été atteintes de métastases osseuse dans les 5 ans [350]. De manière intéressante, par rapport aux tumeurs simples positives, nous avons constaté que la co-expression de TFF1 et de TFF3 était associée à certains paramètres de mauvais pronostic et de progression tumorale. Les tumeurs TFF1/TFF3 double-positives ont été associées à une taille et à un grade SBR et SBRM plus élevés, ainsi qu'à la présence d'emboles vasculaires péritumoraux. Afin d'explorer l'hypothèse selon laquelle TFF1 et TFF3 sont présents sous formes d'hétérodimères au sein des cellules cancéreuses des tumeurs double-positives, nous utiliserons la technique de PLA (Proximity Ligation Assay) [371] Cette méthode permet de détecter les interactions protéines-protéine à l'échelle de la molécule unique sur des coupes ou sur des cellules fixées. Cette expérience sera réalisée sur la lignée cellulaire de cancers du sein modèle de la co-expression TFF1/TFF3 (UACC822) et sur une sélection de certaines tumeurs fixées en paraffine.

Le traitement personnalisé du cancer nécessite une connaissance et une compréhension profonde de la biologie des cancers. Les avancées dans la compréhension de la biologie du cancer et plus spécifiquement des voies de signalisation cellulaire permettent d'identifier plusieurs cibles moléculaires potentielles, puis de développer de nouveaux agents dirigés contre ces cibles. L'utilisation judicieuse des biomarqueurs permet de sélectionner avec soin les patients les plus susceptibles de bénéficier d'une thérapie ciblée et/ou d'une chimiothérapie adjuvante. Des biomarqueurs supplémentaires permettant d'orienter ce choix de manière fiable sont aujourd'hui nécessaires pour aider à la prise en charge des malades. Dans ce cadre, nos résultats préliminaires suggèrent que les protéines TFFs représentent des biomarqueurs potentiels permettant de discriminer des sous-types de tumeurs luminales. L'objectif à moyen terme est de confirmer l'intérêt du dosage de ces facteurs en montrant leur association avec des paramètres de progression tumorale sur une plus grande cohorte de patientes. A long terme, l'objectif est d'établir la valeur pronostique de ces facteurs, en termes de survie sans récidive et globale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Guérin, S., Doyon, F. & Hill, C. [The frequency of cancer in France in 2006, mortality trends since 1950, incidence trends since 1980 and analysis of the discrepancies between these trends]. *Bull Cancer* **96**, 51–57 (2009).
2. Youlden, D. R. *et al.* The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol* **36**, 237–248 (2012).
3. Benson, J. R. & Jatoi, I. The global breast cancer burden. *Future Oncol* **8**, 697–702 (2012).
4. InCA et InVS Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011. (2011).
5. Belot, A. *et al.* Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* **56**, 159–175 (2008).
6. Curado, M. P. Breast cancer in the world: Incidence and mortality. *Salud Pública de México* **53**, 372–384 (2011).
7. InVS Epidémiologie du cancer du sein. (2012).at <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-fiches-de-synthese/1-types-cancer/9-cancer-sein/1-epidemiologie-du-cancer-du-sein-en-france-metropolitaine-incidence-et-mortalite.html>
8. Saad, E. D., Katz, A. & Buyse, M. Overall survival and post-progression survival in advanced breast cancer: a review of recent randomized clinical trials. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1958–1962 (2010).
9. Bevier, M., Sundquist, K. & Hemminki, K. Risk of breast cancer in families of multiple affected women and men. *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 723–728 (2012).
10. Gage, M., Wattendorf, D. & Henry, L. R. Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes. *J Surg Oncol* **105**, 444–451 (2012).
11. Shannon, K. M. & Chittenden, A. Genetic testing by cancer site: breast. *Cancer J* **18**, 310–319 (2012).
12. Antoniou, A. C. & Easton, D. F. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* **25**, 5898–5905 (2006).
13. Narod, S. A. & Foulkes, W. D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 665–676 (2004).
14. Zhang, J. & Powell, S. N. The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Res.* **3**, 531–539 (2005).
15. Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 68–78 (2012).
16. Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O. M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G. M. & Mazoyer, S. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2805–2814 (2002).
17. Trainer, A. H. *et al.* The role of BRCA mutation testing in determining breast cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 708–717 (2010).
18. Foulkes, W. D. *et al.* Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 1482–1485 (2003).
19. Turner, N. C. *et al.* BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* **26**, 2126–2132 (2007).
20. Young, S. R. *et al.* The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* **9**, 86 (2009).
21. Bane, A. L. *et al.* BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays. *Am. J. Surg. Pathol.* **31**, 121–128 (2007).
22. InCA Chirurgie prophylactique des cancers du sein avec prédispositions génétiques. *Traitements, soins et innovations, recommandations professionnelles* (2009).
23. Aleskandarany, M. A. *et al.* Clinicopathologic and molecular significance of phospho-Akt expression in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **127**, 407–416 (2011).
24. Plo, I. *et al.* AKT1 inhibits homologous recombination by inducing cytoplasmic retention of BRCA1 and RAD51. *Cancer Res.* **68**, 9404–9412 (2008).
25. Gilbert, P. M. *et al.* HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype. *J. Clin. Invest.* **120**, 1535–1550 (2010).
26. de Jong, M. M. *et al.* Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J. Med. Genet.* **39**, 225–242 (2002).
27. Kast, K. *et al.* Late onset Li-Fraumeni syndrome with bilateral breast cancer and other malignancies: case report and review of the literature. *BMC Cancer* **12**, 217 (2012).
28. Miller, C. *et al.* Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* **319**, 783–784 (1986).
29. Levine, A. J., Momand, J. & Finlay, C. A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**, 453–456 (1991).
30. Yonish-Rouach, E., Choisy, C., Deguin, V., Breugnot, C. & May, E. The role of p53 as a transcription factor in the induction of apoptosis. *Behring Inst. Mitt.* 60–71 (1996).
31. Joerger, A. C. & Fersht, A. R. Structural biology of the tumor suppressor p53 and cancer-associated mutants. *Adv. Cancer Res.* **97**, 1–23 (2007).
32. Myers, M. P. *et al.* P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *PNAS* **94**, 9052–9057 (1997).
33. Maehama, T. & Dixon, J. E. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* **9**, 125–128 (1999).
34. MacMahon, B. Epidemiology and the causes of breast cancer. *Int. J. Cancer* **118**, 2373–2378 (2006).
35. Dogan, L. *et al.* Relationships between epidemiological features and tumor characteristics of breast cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **12**, 3375–3380 (2011).
36. Bukowski, R. *et al.* Birth weight, breast cancer and the potential mediating hormonal environment. *PLoS ONE* **7**, e40199 (2012).
37. Smith-Bindman, R. Environmental Causes of Breast Cancer and Radiation From Medical Imaging Findings From the Institute of Medicine Report Environmental Causes of Breast Cancer and Radiation From Medical Imaging. *Archives of Internal Medicine* **172**, 1023 (2012).
38. Reeves, G. K., Beral, V., Green, J., Gathani, T. & Bull, D. Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. *Lancet Oncol.* **7**, 910–918 (2006).
39. Bonneterre & Dieras *Cancéroguide Sein*. (Paris, 2007).
40. Iatrakis, G. *et al.* The role of oral contraception use in the occurrence of breast cancer. A retrospective study of 405 patients. *Clin Exp Obstet Gynecol* **38**, 225–227 (2011).
41. Brind, J., Chinchilli, V. M., Severs, W. B. & Summy-Long, J. Induced abortion as an independent risk factor for breast cancer: a comprehensive review and meta-analysis. *J Epidemiol Community Health* **50**, 481–496 (1996).
42. Caroll The Breast Cancer Epidemic: Modeling and Forecasts Based on Abortion and Other Risk Factors. *Journal of American Physicians and Surgeons* **12**, (2007).

43. Ozmen, V. *et al.* Breast cancer risk factors in Turkish women – a University Hospital based nested case control study. *World Journal of Surgical Oncology* **7**, 37 (2009).
44. Kitchen, A. J., Trivedi, P., Ng, D. & Mokbel, K. Is there a link between breast cancer and abortion: a review of the literature. *Int J Fertil Womens Med* **50**, 267–271 (2005).
45. Reeves, G. K. *et al.* Breast cancer risk in relation to abortion: Results from the EPIC study. *Int. J. Cancer* **119**, 1741–1745 (2006).
46. ACOG Committee Opinion No. 434: induced abortion and breast cancer risk. *Obstet Gynecol* **113**, 1417–1418 (2009).
47. Impicciatore, G. G. & Tiboni, G. M. Ovulation inducing agents and cancer risk: review of literature. *Curr Drug Saf* **6**, 250–258 (2011).
48. Brinton, L. A., Sahasrabuddhe, V. V. & Scoccia, B. Fertility drugs and the risk of breast and gynecologic cancers. *Semin. Reprod. Med.* **30**, 131–145 (2012).
49. Stewart, L. M. *et al.* In vitro fertilization and breast cancer: is there cause for concern? *Fertil. Steril.* **98**, 334–340 (2012).
50. de Mascarel, MacGrogan G & Brouste V Marqueurs histologiques de risque de cancer du sein. Classification actuelle des lésions précancéreuses et leurs risques d'évolution. (2008).
51. Coyle, Y. M. Lifestyle, genes, and cancer. *Methods Mol. Biol.* **472**, 25–56 (2009).
52. Carmichael, A., Sami, A. S. & Dixon, J. M. Breast cancer risk among the survivors of atomic bomb and patients exposed to therapeutic ionising radiation. *Eur J Surg Oncol* **29**, 475–479 (2003).
53. Berrington de González, A. *et al.* Projected cancer risks from computed tomographic scans performed in the United States in 2007. *Arch. Intern. Med.* **169**, 2071–2077 (2009).
54. Bonde, J. P. *et al.* Work at night and breast cancer - report on evidence-based options for preventive actions. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* (2012).doi:10.5271/sjweh.3282
55. Menegaux, F. *et al.* Night work and breast cancer: A population-based case-control study in France (the CECILE study). *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* (2012).doi:10.1002/ijc.27669
56. Leonardi, G. C. *et al.* Correlation of the risk of breast cancer and disruption of the circadian rhythm (Review). *Oncol. Rep.* **28**, 418–428 (2012).
57. Thompson, C. L. & Li, L. Association of sleep duration and breast cancer OncotypeDX recurrence score. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 1291–1295 (2012).
58. Engel, P. *et al.* Serum 25(OH) vitamin D and risk of breast cancer: a nested case-control study from the French E3N cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **19**, 2341–2350 (2010).
59. Fedirko, V. *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: results of a large population-based case-control study in Mexican women. *Cancer Causes Control* **23**, 1149–1162 (2012).
60. Hong, Z., Tian, C. & Zhang, X. Dietary calcium intake, vitamin D levels, and breast cancer risk: a dose-response analysis of observational studies. *Breast Cancer Res. Treat.* **136**, 309–312 (2012).
61. Jacot, W. *et al.* Increased prevalence of vitamin D insufficiency in patients with breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 709–717 (2012).
62. Sherwood, L. *Physiologie humaine*. (De Boeck Supérieur: 2006).
63. Man, Y.-G. & Sang, Q.-X. A. The significance of focal myoepithelial cell layer disruptions in human breast tumor invasion: a paradigm shift from the 'protease-centered' hypothesis. *Experimental Cell Research* **301**, 103–118 (2004).
64. Jauzein mam-dev. at <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/sante/epidemiologie/cancersein/glandemammaire/mam-dev.jpg/view>
65. Mathelin, C., Youssef, C., Brettes, J.-P. & Rio, M.-C. [Paradoxical interactions between pregnancy and breast cancer]. *Gynecol Obstet Fertil* **35**, 449–456 (2007).
66. Petersen, O. W. & Polyak, K. Stem Cells in the Human Breast. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, (2010).
67. Furusawa, C. & Kaneko, K. A dynamical-systems view of stem cell biology. *Science* **338**, 215–217 (2012).
68. Deome, K. B., Faulkin, L. J., Jr, Bern, H. A. & Blair, P. B. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* **19**, 515–520 (1959).
69. Kordon, E. C. & Smith, G. H. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* **125**, 1921–1930 (1998).
70. Keymeulen, A. V. *et al.* Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* **479**, 189–193 (2011).
71. Brettes, J.-P. & Mathelin, C. *Cancer du sein*. (Elsevier Masson: 2007).
72. Ahmed R. Role of trefoil proteins in breast cancer. Thèse biologie moléculaire New Castle University (2010).
73. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
74. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
75. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
76. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–799 (2004).
77. Bos, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682–4689 (1989).
78. Shaw, R. J. & Cantley, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424–430 (2006).
79. Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290–293 (1973).
80. Quintás-Cardama, A. & Cortes, J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* **113**, 1619–1630 (2009).
81. InCA Rapport 2009 sur l'etat des connaissances relatives aux biomarqueurs tissulaires uPA-PAI1, OncotypeDX et Mammaprint dans la prise en charge du acncer du sein. (2009).
82. Mathelin, Koehl C & Rio MC Marqueurs protéiques circulants et cancer du sein. **34**, 638–646 (2006).
83. Namer, M., Héry, M., Spielmann, M. & Gligorov, J. *Cancer du sein en situation métastatique: Compte-rendu du 1er Cours supérieur francophone de cancérologie Saint-Paul de Vence-Nice, 07-09 Janvier 2010*. (Springer: 2011).
84. Pichon, M.-F., Eche, N., Basuyau, J.-P. & Riedinger, J.-M. Surveillance biologique en cancérologie : problèmes rencontrés avec les dosages de marqueurs tumoraux. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* **22**, 34–40 (2007).
85. Speirs, V. & Walker, R. A. New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast. *J. Pathol.* **211**, 499–506 (2007).
86. Pratt, W. B. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors

signaling via MAP kinase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 297–326 (1997).
87. Walter, P. *et al.* Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7889–7893 (1985).
88. Kastner, P. *et al.* Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* **9**, 1603–1614 (1990).
89. Mathieu Images en pathologie. *La lettre du sénologue* (2008).
90. Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Wolff, A. C., Mangu, P. B. & Temin, S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract* **6**, 195–197 (2010).
91. Nofech-Mozes, S. *et al.* Systematic review on hormone receptor testing in breast cancer. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **20**, 214–263 (2012).
92. Wilson, C. M. & McPhaul, M. J. A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* **120**, 51–57 (1996).
93. Lundin, K. B. *et al.* Androgen receptor genotypes predict response to endocrine treatment in breast cancer patients. *Br. J. Cancer* **105**, 1676–1683 (2011).
94. Garay, J. P. & Park, B. H. Androgen receptor as a targeted therapy for breast cancer. *Am J Cancer Res* **2**, 434–445 (2012).
95. Hickey, T. E., Robinson, J. L. L., Carroll, J. S. & Tilley, W. D. Minireview: The Androgen Receptor in Breast Tissues: Growth Inhibitor, Tumor Suppressor, Oncogene? *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* (2012).doi:10.1210/me.2012-1107
96. Kotsopoulos, J. & Narod, S. A. Androgens and breast cancer. *Steroids* **77**, 1–9 (2012).
97. Burstein, H. J. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1652–1654 (2005).
98. Earp, H. S., 3rd, Calvo, B. F. & Sartor, C. I. The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **114**, 315–333; discussion 333–334 (2003).
99. Mano, M. S., Rosa, D. D., De Azambuja, E., Ismael, G. F. V. & Durbecq, V. The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-IIα and their importance to the biology of solid tumours. *Cancer Treatment Reviews* **33**, 64–77 (2007).
100. Arteaga, C. L. *et al.* Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* **9**, 16–32 (2012).
101. Penault-Llorca, F. *et al.* [Update of the GEFPICS' recommendations for HER2 status determination in breast cancers in France]. *Ann Pathol* **30**, 357–373 (2010).
102. Sartelet, H. *et al.* Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER-2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma. *J Clin Pathol* **58**, 864–871 (2005).
103. HAS & InCA Guide ALD n°30 Cancer du sein.
104. Leyland-Jones, B. Trastuzumab: hopes and realities. *Lancet Oncol.* **3**, 137–144 (2002).
105. Lam, L. *et al.* Challenges in the clinical utility of the serum test for HER2 ECD. *Biochim. Biophys. Acta* **1826**, 199–208 (2012).
106. Lüftner, D., Lüke, C. & Possinger, K. Serum HER-2/neu in the management of breast cancer patients. *Clin. Biochem.* **36**, 233–240 (2003).
107. Mazouni, C. *et al.* Kinetics of serum HER-2/neu changes in patients with HER-2-positive primary breast cancer after initiation of primary chemotherapy. *Cancer* **109**, 496–501 (2007).
108. Köstler, W. J. *et al.* Monitoring of serum Her-2/neu predicts histopathological response to neoadjuvant trastuzumab-based therapy for breast cancer. *Anticancer Res.* **24**, 1127–1130 (2004).
109. Köstler, W. J. *et al.* Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1618–1624 (2004).
110. Leyland-Jones, B. & Smith, B. R. Serum HER2 testing in patients with HER2-positive breast cancer: the death knell tolls. *Lancet Oncol.* **12**, 286–295 (2011).
111. Oka, S., Uramoto, H., Shimokawa, H., Iwanami, T. & Tanaka, F. The expression of Ki-67, but not proliferating cell nuclear antigen, predicts poor disease free survival in patients with adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res.* **31**, 4277–4282 (2011).
112. Luporsi, E. *et al.* Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 895–915 (2012).
113. de Azambuja, E. *et al.* Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br. J. Cancer* **96**, 1504–1513 (2007).
114. Goldhirsch, A. *et al.* Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.* **22**, 1736–1747 (2011).
115. Lambert, V. Rôle des protéinases et de leurs inhibiteurs dans les formes associées à une néovascularisation anormale sous-rétinienne. Caractérisation par l'étude de modèles animaux transgéniques et développements thérapeutiques. (2005).
116. Martin, P.-M., Dussert, C., Romain, S. & Ouafik, L. H. Relations du système plasminogène-plasmine et cancer. *Oncologie* **12**, 322–340 (2010).
117. Lamy, P.-J., Romieu, G. & Jacot, W. [UPA/PAI-1: a tool for breast cancer treatment individualization. Biology, clinical implications and quantification assays]. *Bull Cancer* **97**, 341–348 (2010).
118. Jänicke, F. *et al.* Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 913–920 (2001).
119. Look, M. P. *et al.* Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 116–128 (2002).
120. Paik, S. *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2817–2826 (2004).
121. Gianni, L. *et al.* Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7265–7277 (2005).
122. Paik, S. *et al.* Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3726–3734 (2006).
123. Albain, K. S. *et al.* Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol.* **11**, 55–65 (2010).

124. van ’t Veer, L. J. *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530–536 (2002).
125. van de Vijver, M. J. *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1999–2009 (2002).
126. Bueno-de-Mesquita, J. M. *et al.* Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER). *Lancet Oncol.* **8**, 1079–1087 (2007).
127. Slodkowska, E. A. & Ross, J. S. MammaPrint 70-gene signature: another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **9**, 417–422 (2009).
128. Bensouda, Y. *et al.* [Prevalence of elevated serum CA 15-3 at time of metastatic relapse of breast cancer and correlation with hormone receptor status]. *Bull Cancer* **96**, 923–928 (2009).
129. Di Gioia, D. *et al.* Kinetics of CEA and CA15-3 correlate with treatment response in patients undergoing chemotherapy for metastatic breast cancer (MBC). *Tumour Biol.* **32**, 777–785 (2011).
130. Cristofanilli, M. & Mendelsohn, J. Circulating tumor cells in breast cancer: Advanced tools for ‘tailored’ therapy? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 17073–17074 (2006).
131. Braun, S. *et al.* Disseminated tumor cells: are they ready for clinical use? *Breast* **16 Suppl 2**, S51–54 (2007).
132. Nagrath, S. *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* **450**, 1235–1239 (2007).
133. de Albuquerque, A., Kaul, S., Breier, G., Krabisch, P. & Fersis, N. Multimarker Analysis of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Metastatic Breast Cancer Patients: A Step Forward in Personalized Medicine. *Breast Care (Basel, Switzerland)* **7**, 7–12 (2012).
134. Powell, A. A. *et al.* Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. *PLoS ONE* **7**, e33788 (2012).
135. Pierga, J.-Y., Bidard, F.-C., Denis, M. G. & de Cremoux, P. Prognostic value of peripheral blood double detection of CK19 and MUC1 mRNA positive cells detected by RT-quantitative PCR in 94 breast cancer patients with a follow up of 9 years. *Mol Oncol* **1**, 267–268 (2007).
136. Iakovlev, V. V., Goswami, R. S., Vecchiarelli, J., Arneson, N. C. R. & Done, S. J. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res. Treat.* **107**, 145–154 (2008).
137. Riethdorf, S. & Pantel, K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology* **75**, 140–148 (2008).
138. Cristofanilli, M. *et al.* Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 781–791 (2004).
139. Lucci, A. *et al.* Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *The Lancet Oncology* **13**, 688–695 (2012).
140. Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* **13**, 228 (2011).
141. Singletary, S. E. *et al.* Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**, 3628–3636 (2002).
142. HAS & InCA Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoîétique. Cancer du sein. (2010).
143. Bloom, H. J. & Richardson, W. W. Histological grading and prognosis in breast cance. *Br. J. Cancer* **11**, 359–377 (1957).
144. Elston, C. W. & Ellis, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**, 403–410 (1991).
145. Hasebe, T. *et al.* Grading system for lymph vessel tumor emboli for prediction of the outcome of invasive ductal carcinoma of the breast. *Hum. Pathol.* **39**, 427–436 (2008).
146. Rakha, E. A. *et al.* The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer* **118**, 3670–3680 (2012).
147. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
148. Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 10869–10874 (2001).
149. Prat, A. & Perou, C. M. Mammary development meets cancer genomics. *Nat. Med.* **15**, 842–844 (2009).
150. Molyneux, G. *et al.* BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 403–417 (2010).
151. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* **5**, 5–23 (2011).
152. Lim, E. *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine* **15**, 907–913 (2009).
153. Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. Cancer Cell of Origin: Spotlight on Luminal Progenitors. *Cell Stem Cell* **7**, 271–272 (2010).
154. Curtis, C. *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346–352 (2012).
155. Banerji, S. *et al.* Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* **486**, 405–409 (2012).
156. Stephens, P. J. *et al.* The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* **486**, 400–404 (2012).
157. Volinia, S. *et al.* Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3024–3029 (2012).
158. Lo, P.-K. *et al.* CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from luminal progenitors and maintained by the integrin-TGFβ signaling. *Oncogene* **31**, 2614–2626 (2012).
159. Weigelt, B., Baehner, F. L. & Reis-Filho, J. S. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J. Pathol.* **220**, 263–280 (2010).
160. Weigelt, B. *et al.* Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* **11**, 339–349 (2010).
161. Colombo, P.-E., Milanezi, F., Weigelt, B. & Reis-Filho, J. S. Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction. *Breast Cancer Res.* **13**, 212 (2011).
162. Giuliano, A. E., Kirgan, D. M., Guenther, J. M. & Morton, D. L. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann. Surg.* **220**, 391–398; discussion 398–401 (1994).
163. Mathelin, C. *et al.* Methylene blue dye, an accurate dye for sentinel lymph node identification in early breast cancer. *Anticancer Res.* **29**, 4119–4125 (2009).
164. Mathelin, C. *et al.* Improvement in intramammary sentinel lymph node removal using a novel prototype hand held probe

during breast conservative surgery. *Breast Cancer Res. Treat.* **89**, 305–308 (2005).
165. Guillo, E. *et al.* [Sentinel lymph node biopsy in invasive breast cancer in 2009]. *J Med Liban* **57**, 93–104 (2009).
166. Mathelin, C. *et al.* Optimization of sentinel lymph node biopsy in breast cancer using an operative gamma camera. *World J Surg Oncol* **5**, 132 (2007).
167. Mathelin, C. *et al.* A new intraoperative gamma camera for the sentinel lymph node procedure in breast cancer. *Anticancer Res.* **28**, 2859–2864 (2008).
168. Darby, S. *et al.* Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* **378**, 1707–1716 (2011).
169. Nicolini, A. *et al.* Stem cells: their role in breast cancer development and resistance to treatment. *Curr Pharm Biotechnol* **12**, 196–205 (2011).
170. Goldhirsch, A. *et al.* Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann. Oncol.* **20**, 1319–1329 (2009).
171. Mook, S. *et al.* Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! program: a hospital-based retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* **10**, 1070–1076 (2009).
172. Oakman, C., Santarpia, L. & Di Leo, A. Breast cancer assessment tools and optimizing adjuvant therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 725–732 (2010).
173. Hajage, D. *et al.* External validation of Adjuvant! Online breast cancer prognosis tool. Prioritising recommendations for improvement. *PLoS ONE* **6**, e27446 (2011).
174. InCA Cancer du sein infiltrant non . Question d'actualité. (2012).
175. Caulin *Vidal Reco 2012, Recommandations et Pratiques*. (2012).
176. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **365**, 1687–1717 (2005).
177. Tahover, E., Sonnenblick, A., Peretz, T. & Katz, D. [Update: adjuvant trastuzumab in HER2 positive breast cancer]. *Harefuah* **151**, 37–42, 61 (2012).
178. Jones, A. L. *et al.* Management of cardiac health in trastuzumab-treated patients with breast cancer: updated United Kingdom National Cancer Research Institute recommendations for monitoring. *Br. J. Cancer* **100**, 684–692 (2009).
179. Wong, A. L. A. & Lee, S.-C. Mechanisms of Resistance to Trastuzumab and Novel Therapeutic Strategies in HER2-Positive Breast Cancer. *Int J Breast Cancer* **2012**, 415170 (2012).
180. Konecny, G. E. *et al.* Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 1630–1639 (2006).
181. Hutchinson, L. From ASCO-breast cancer: EMILIA trial offers hope. *Nat Rev Clin Oncol* **9**, 430 (2012).
182. Miao, H. *et al.* Incidence and outcome of male breast cancer: an international population-based study. *J. Clin. Oncol.* **29**, 4381–4386 (2011).
183. Zygogianni, A. G. *et al.* Male breast carcinoma: epidemiology, risk factors and current therapeutic approaches. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **13**, 15–19 (2012).
184. Comet, B., Cutuli, B., Penault-Llorca, F., Bonneterre, J. & Belkacémi, Y. [Male breast cancer: a review]. *Bull Cancer* **96**, 181–189 (2009).
185. Eryilmaz, M. A., Igci, A., Muslumanoglu, M., Ozmen, V. & Koc, M. Male breast cancer: a retrospective study of 15 years. *J BUON* **17**, 51–56 (2012).
186. Kornegoor, R. *et al.* Molecular subtyping of male breast cancer by immunohistochemistry. *Mod. Pathol.* **25**, 398–404 (2012).
187. Sánchez-Muñoz, A. *et al.* Male breast cancer: immunohistochemical subtypes and clinical outcome characterization. *Oncology* **83**, 228–233 (2012).
188. Fogh, S. *et al.* Use of tamoxifen with postsurgical irradiation may improve survival in estrogen and progesterone receptor-positive male breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **11**, 39–45 (2011).
189. Eisenstein, M. Pregnancy: Delivery from breast cancer. *Nature* **485**, S54–S54 (2012).
190. Porta, R. P., Franco, C., Cosmi, E. V., Montruccoli, G. & Cavazzana, A. O. Pregnancy-associated breast cancer. *Breast J* **10**, 169 (2004).
191. Mathelin, C. *et al.* Pregnancy and post-partum breast cancer: a prospective study. *Anticancer Res.* **28**, 2447–2452 (2008).
192. Amant, F., Loibl, S., Neven, P. & Van Calsteren, K. Breast cancer in pregnancy. *Lancet* **379**, 570–579 (2012).
193. Azim, H. A., Jr *et al.* Prognosis of pregnancy-associated breast cancer: A meta-analysis of 30 studies. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 834–842 (2012).
194. Loibl, S. *et al.* Treatment of breast cancer during pregnancy: an observational study. *Lancet Oncol.* **13**, 887–896 (2012).
195. Masiakowski, P. *et al.* Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res.* **10**, 7895–7903 (1982).
196. Wright, N. A., Hoffmann, W., Otto, W. R., Rio, M. C. & Thim, L. Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett.* **408**, 121–123 (1997).
197. Jakowlew, S. B., Breathnach, R., Jeltsch, J. M., Masiakowski, P. & Chambon, P. Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res.* **12**, 2861–2878 (1984).
198. Rio, M. C. *et al.* Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science* **241**, 705–708 (1988).
199. Jørgensen, K. H., Thim, L. & Jacobsen, H. E. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul. Pept.* **3**, 207–219 (1982).
200. Tomasetto, C. *et al.* hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J.* **9**, 407–414 (1990).
201. Suemori, S., Lynch-Devaney, K. & Podolsky, D. K. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 11017–11021 (1991).
202. Podolsky, D. K. *et al.* Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J. Biol. Chem.* **268**, 6694–6702 (1993).
203. Tomasetto, C., Rockel, N., Mattei, M. G., Fujita, R. & Rio, M. C. The gene encoding the human spasmolytic protein (SML1/hSP) is in 21q 22.3, physically linked to the homologous breast cancer marker gene BCEI/pS2. *Genomics* **13**, 1328–1330 (1992).
204. Chinery, R., Bates, P. A., De, A. & Freemont, P. S. Characterisation of the single copy trefoil peptides intestinal

trefoil factor and pS2 and their ability to form covalent dimers. *FEBS Lett.* **357**, 50–54 (1995).
205. May, F. E. & Westley, B. R. Close physical linkage of the genes encoding the pNR-2/pS2 protein and human spasmolytic protein (hSP). *Hum. Genet.* **99**, 303–307 (1997).
206. Gött, P. *et al.* Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur. J. Hum. Genet.* **4**, 308–315 (1996).
207. Ribieras, S., Tomasetto, C. & Rio, M. C. The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim. Biophys. Acta* **1378**, F61–77 (1998).
208. Baus-Loncar, M. & Giraud, A. Trefoil factors. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**, 2921–2931 (2005).
209. Berry, M., Nunez, A. M. & Chambon, P. Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 1218–1222 (1989).
210. Borthwick, J. M. *et al.* Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 19–33 (2003).
211. O'Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K. & Hansen, U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* **18**, 1859–1875 (2004).
212. Carroll, J. S. *et al.* Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* **122**, 33–43 (2005).
213. Carroll, J. S. *et al.* Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat. Genet.* **38**, 1289–1297 (2006).
214. Kininis, M. *et al.* Genomic Analyses of Transcription Factor Binding, Histone Acetylation, and Gene Expression Reveal Mechanistically Distinct Classes of Estrogen-Regulated Promoters. *Mol Cell Biol* **27**, 5090–5104 (2007).
215. Putnik, M., Zhao, C., Gustafsson, J.-Å. & Dahlman-Wright, K. Global identification of genes regulated by estrogen signaling and demethylation in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **426**, 26–32 (2012).
216. Rio, M. C. *et al.* Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancers in comparison with expression of the estrogen and progesterone receptors and the oncogene ERBB2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 9243–9247 (1987).
217. May, F. E. & Westley, B. R. Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells. *J. Pathol.* **182**, 404–413 (1997).
218. Sica, V. *et al.* Estradiol and progesterone receptors in malignant gastrointestinal tumors. *Cancer Res.* **44**, 4670–4674 (1984).
219. Ryu, W.-S. *et al.* Expression of estrogen receptors in gastric cancer and their clinical significance. *Journal of surgical oncology* (2012).doi:10.1002/jso.23097
220. Al-azzeh, E. D., Fegert, P., Blin, N. & Gött, P. Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2. *Biochim. Biophys. Acta* **1490**, 324–332 (2000).
221. Dossinger, V., Kayademir, T., Blin, N. & Gött, P. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell. Physiol. Biochem.* **12**, 197–206 (2002).
222. Loncar, M. B. *et al.* Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. *Gut* **52**, 1297–1303 (2003).
223. Nunez, A. M., Berry, M., Imler, J. L. & Chambon, P. The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *EMBO J.* **8**, 823–829 (1989).
224. Al-azzeh, E. *et al.* Gastroprotective peptide trefoil factor family 2 gene is activated by upstream stimulating factor but not by c-Myc in gastrointestinal cancer cells. *Gut* **51**, 685–690 (2002).
225. Shimada, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) regulates trefoil factor family 2 (TFF2) expression in gastric epithelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 626–637 (2007).
226. Furuta, G. T. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J. Exp. Med.* **193**, 1027–1034 (2001).
227. Ribieras, S., Lefèbvre, O., Tomasetto, C. & Rio, M. C. Mouse Trefoil factor genes: genomic organization, sequences and methylation analyses. *Gene* **266**, 67–75 (2001).
228. Jaenisch, R. & Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33 Suppl**, 245–254 (2003).
229. Carvalho, R. *et al.* Loss of heterozygosity and promoter methylation, but not mutation, may underlie loss of TFF1 in gastric carcinoma. *Lab. Invest.* **82**, 1319–1326 (2002).
230. Okada, H. *et al.* Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Int. J. Oncol.* **26**, 369–377 (2005).
231. Sato, N. *et al.* Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* **63**, 4158–4166 (2003).
232. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074–1080 (2001).
233. Tomita, H. *et al.* Inhibition of gastric carcinogenesis by the hormone gastrin is mediated by suppression of TFF1 epigenetic silencing. *Gastroenterology* **140**, 879–891 (2011).
234. Thim, L. & May, F. E. B. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2956–2973 (2005).
235. Thim, L. Trefoil peptides: from structure to function. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 888–903 (1997).
236. Mathelin, C., Tomasetto, C. & Rio, M.-C. [Trefoil factor 1 (pS2/TFF1), a peptide with numerous functions]. *Bull Cancer* **92**, 773–781 (2005).
237. Poulsen, S. S., Thulesen, J., Nexø, E. & Thim, L. Distribution and metabolism of intravenously administered trefoil factor 2/porcine spasmolytic polypeptide in the rat. *Gut* **43**, 240–247 (1998).
238. Chinery, R. & Cox, H. M. Immunoprecipitation and characterization of a binding protein specific for the peptide, intestinal trefoil factor. *Peptides* **16**, 749–755 (1995).
239. Dubeykovskaya, Z., Dubeykovskiy, A., Solal-Cohen, J. & Wang, T. C. Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* **284**, 3650–3662 (2009).
240. Thim, L. & Mørtz, E. Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul. Pept.* **90**, 61–68 (2000).
241. Tomasetto, C. *et al.* pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology* **118**, 70–80 (2000).
242. Newton, J. L., Allen, A., Westley, B. R. & May, F. E. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* **46**, 312–320 (2000).
243. Gouyer, V. *et al.* Specific secretion of gel-forming mucins and TFF peptides in HT-29 cells of mucin-secreting phenotype. *Biochim. Biophys. Acta* **1539**, 71–84 (2001).

244. Ruchaud-Sparagano, M.-H., Westley, B. R. & May, F. E. B. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1946–1954 (2004).
245. Westley, B. R., Griffin, S. M. & May, F. E. B. Interaction between TFF1, a gastric tumor suppressor trefoil protein, and TFIZ1, a brichos domain-containing protein with homology to SP-C. *Biochemistry* **44**, 7967–7975 (2005).
246. Rodrigues, Emami S & Gespach C Rôle des peptides en trèfle dans l'inflammation et le cancer. Hepato-gastro **11**, 49–62 (2004).
247. Miyashita, S., Nomoto, H., Konishi, H. & Hayashi, K. Estimation of pS2 protein level in human body fluids by a sensitive two-site enzyme immunoassay. *Clin. Chim. Acta* **228**, 71–81 (1994).
248. Madsen, J., Nielsen, O., Tornøe, I., Thim, L. & Holmskov, U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 505–513 (2007).
249. Srivatsa, G. *et al.* Biliary epithelial trefoil peptide expression is increased in biliary diseases. *Histopathology* **40**, 261–268 (2002).
250. Devine, D. A., High, A. S., Owen, P. J., Poulsom, R. & Bonass, W. A. Trefoil factor expression in normal and diseased human salivary glands. *Hum. Pathol.* **31**, 509–515 (2000).
251. dos Santos Silva, E., Ulrich, M., Döring, G., Botzenhart, K. & Gött, P. Trefoil factor family domain peptides in the human respiratory tract. *J. Pathol.* **190**, 133–142 (2000).
252. Poulsom, R. *et al.* Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. *J. Pathol.* **183**, 30–38 (1997).
253. Wiede, A. *et al.* Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res.* **303**, 109–115 (2001).
254. Langer, G., Walter, S., Behrens-Baumann, W. & Hoffmann, W. [TFF peptides. New mucus-associated secretory products of the conjunctiva]. *Ophthalmologe* **98**, 976–979 (2001).
255. Paulsen, F. P., Hinz, M., Schaudig, U., Thale, A. B. & Hoffmann, W. TFF peptides in the human efferent tear ducts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 3359–3364 (2002).
256. Kouznetsova, I. *et al.* Biosynthesis of gastrokine-2 in the human gastric mucosa: restricted spatial expression along the antral gland axis and differential interaction with TFF1, TFF2 and mucins. *Cell. Physiol. Biochem.* **20**, 899–908 (2007).
257. Elia, G., Chinery, R., Hanby, A. M., Poulsom, R. & Wright, N. A. The production and characterization of a new monoclonal antibody to the trefoil peptide human spasmolytic polypeptide. *Histochem. J.* **26**, 644–647 (1994).
258. Wiede, A. *et al.* Localization of TFF3, a new mucus-associated peptide of the human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 1330–1335 (1999).
259. Longman, R. J. *et al.* Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* **47**, 792–800 (2000).
260. Thim, L., Madsen, F. & Poulsen, S. S. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur. J. Clin. Invest.* **32**, 519–527 (2002).
261. Lefebvre, O. *et al.* Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* **274**, 259–262 (1996).
262. Farrell, J. J. *et al.* TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J. Clin. Invest.* **109**, 193–204 (2002).
263. Mashimo, H., Wu, D. C., Podolsky, D. K. & Fishman, M. C. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* **274**, 262–265 (1996).
264. Carrasco, R. *et al.* Trefoil factor family peptide 3 prevents the development and promotes healing of ischemia-reperfusion injury in weanling rats. *J. Pediatr. Surg.* **39**, 1693–1700 (2004).
265. Playford, R. J. *et al.* Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 2137–2142 (1996).
266. Playford, R. J. *et al.* Human spasmolytic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration. *Gastroenterology* **108**, 108–116 (1995).
267. Babyatsky, M. W., deBeaumont, M., Thim, L. & Podolsky, D. K. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology* **110**, 489–497 (1996).
268. Hoffmann, W. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2932–2938 (2005).
269. Emami, S. *et al.* Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. *FASEB J.* **15**, 351–361 (2001).
270. Emami, S. *et al.* Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* **25**, 885–898 (2004).
271. Amiry, N. *et al.* Trefoil factor-1 (TFF1) enhances oncogenicity of mammary carcinoma cells. *Endocrinology* **150**, 4473–4483 (2009).
272. Buache, E. *et al.* Deficiency in trefoil factor 1 (TFF1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF1-knockout mice. *Oncogene* **30**, 3261–3273 (2011).
273. Prest, S. J., May, F. E. B. & Westley, B. R. The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *FASEB J.* **16**, 592–594 (2002).
274. May, F. E. B., Semple, J. I., Prest, S. J. & Westley, B. R. Expression and motogenic activity of TFF2 in human breast cancer cells. *Peptides* **25**, 865–872 (2004).
275. Yio, X. *et al.* Trefoil factor family-3 is associated with aggressive behavior of colon cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis* **22**, 157–165 (2005).
276. Chan, V. Y. W. *et al.* Intestinal trefoil factor promotes invasion in non-tumorigenic Rat-2 fibroblast cell. *Regul. Pept.* **127**, 87–94 (2005).
277. Rivat, C. *et al.* Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) -- and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res.* **65**, 195–202 (2005).
278. Graness, A., Chwieralski, C. E., Reinhold, D., Thim, L. & Hoffmann, W. Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *J. Biol. Chem.* **277**, 18440–18446 (2002).
279. Storesund, T., Hayashi, K., Kolltveit, K. M., Bryne, M. & Schenck, K. Salivary trefoil factor 3 enhances migration of oral keratinocytes. *Eur. J. Oral Sci.* **116**, 135–140 (2008).
280. Fueger, P. T. *et al.* Trefoil factor 3 stimulates human and rodent pancreatic islet beta-cell replication with retention of function. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1251–1259 (2008).
281. Kannan, N. *et al.* Trefoil factor 3 is oncogenic and mediates anti-estrogen resistance in human mammary carcinoma. *Neoplasia* **12**, 1041–1053 (2010).
282. Ge, Y. *et al.* TFF1 inhibits proliferation and induces apoptosis of gastric cancer cells in vitro. *Bosn J Basic Med Sci* **12**, 74–81 (2012).
283. Mao, W. *et al.* Role of trefoil factor 1 in gastric cancer and relationship between trefoil factor 1 and gastrokine 1. *Oncology Reports* (2012).doi:10.3892/or.2012.1939

284. Bossenmeyer-Pourié, C. *et al.* The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J. Cell Biol.* **157**, 761–770 (2002).
285. Uchino, H., Kataoka, H., Itoh, H., Hamasuna, R. & Koono, M. Overexpression of intestinal trefoil factor in human colon carcinoma cells reduces cellular growth in vitro and in vivo. *Gastroenterology* **118**, 60–69 (2000).
286. Lalani, E. N. *et al.* Trefoil factor-2, human spasmolytic polypeptide, promotes branching morphogenesis in MCF-7 cells. *Lab. Invest.* **79**, 537–546 (1999).
287. Kinoshita, K., Taupin, D. R., Itoh, H. & Podolsky, D. K. Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4680–4690 (2000).
288. Taupin, D. R., Kinoshita, K. & Podolsky, D. K. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 799–804 (2000).
289. Rodrigues, S. *et al.* Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J.* **17**, 7–16 (2003).
290. Nikolaidis, N. M. *et al.* Trefoil factor-2 is an allergen-induced gene regulated by Th2 cytokines and STAT6 in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 458–464 (2003).
291. Ebert, M. P. *et al.* Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha. *Gut* **45**, 105–111 (1999).
292. Rio, M. C. *et al.* Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. *Gastroenterology* **100**, 375–379 (1991).
293. Wright, N. A. *et al.* Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **104**, 12–20 (1993).
294. Alison, M. R. *et al.* Experimental ulceration leads to sequential expression of spasmolytic polypeptide, intestinal trefoil factor, epidermal growth factor and transforming growth factor alpha mRNAs in rat stomach. *J. Pathol.* **175**, 405–414 (1995).
295. Ulaganathan, M., Familari, M., Yeomans, N. D., Giraud, A. S. & Cook, G. A. Spatio-temporal expression of trefoil peptide following severe gastric ulceration in the rat implicates it in late-stage repair processes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 506–512 (2001).
296. Itoh, H. *et al.* cDNA cloning of rat pS2 peptide and expression of trefoil peptides in acetic acid-induced colitis. *Biochem. J.* **318 (Pt 3)**, 939–944 (1996).
297. Cook, G. A., Familari, M., Thim, L. & Giraud, A. S. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett.* **456**, 155–159 (1999).
298. Andoh, A., Kinoshita, K., Rosenberg, I. & Podolsky, D. K. Intestinal trefoil factor induces decay-accelerating factor expression and enhances the protective activities against complement activation in intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **167**, 3887–3893 (2001).
299. Wills-Karp, M. *et al.* Trefoil factor 2 rapidly induces interleukin 33 to promote type 2 immunity during allergic asthma and hookworm infection. *J. Exp. Med.* **209**, 607–622 (2012).
300. Qu, Y., Yang, Y., Ma, D. & Xiao, W. Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer. *Oncol. Rep.* **27**, 1277–1283 (2012).
301. Machado, J. C., Nogueira, A. M., Carneiro, F., Reis, C. A. & Sobrinho-Simões, M. Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6). *J. Pathol.* **190**, 437–443 (2000).
302. Taupin, D. *et al.* Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of pS2 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium. *Lab. Invest.* **81**, 397–408 (2001).
303. Kirikoshi, H. & Katoh, M. Expression of TFF1, TFF2 and TFF3 in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **21**, 655–659 (2002).
304. Leung, W. K. *et al.* Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J. Pathol.* **197**, 582–588 (2002).
305. Shi, S.-Q., Cai, J.-T. & Yang, J.-M. Expression of trefoil factors 1 and 2 in precancerous condition and gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **12**, 3119–3122 (2006).
306. Moss, S. F. *et al.* Decreased expression of gastrokine 1 and the trefoil factor interacting protein TFIZ1/GKN2 in gastric cancer: influence of tumor histology and relationship to prognosis. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4161–4167 (2008).
307. Beckler, A. D. *et al.* Decreased abundance of trefoil factor 1 transcript in the majority of gastric carcinomas. *Cancer* **98**, 2184–2191 (2003).
308. Park, W. S. *et al.* Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. *Gastroenterology* **119**, 691–698 (2000).
309. Yio, X. *et al.* Trefoil factor family-1 mutations enhance gastric cancer cell invasion through distinct signaling pathways. *Gastroenterology* **130**, 1696–1706 (2006).
310. Labouvie, C. *et al.* Differential expression of mucins and trefoil peptides in native epithelium, Barrett's metaplasia and squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **125**, 71–76 (1999).
311. Arumugam, T. *et al.* Trefoil factor 1 stimulates both pancreatic cancer and stellate cells and increases metastasis. *Pancreas* **40**, 815–822 (2011).
312. Katoh, M. Trefoil factors and human gastric cancer (review). *Int. J. Mol. Med.* **12**, 3–9 (2003).
313. Ohshio, G. *et al.* Differential expression of human spasmolytic polypeptide (trefoil factor family-2) in pancreatic carcinomas, ampullary carcinomas, and mucin-producing tumors of the pancreas. *Dig. Dis. Sci.* **45**, 659–664 (2000).
314. Kubota, S. *et al.* Pathophysiological investigation of the gastric surface mucous gel layer of patients with Helicobacter pylori infection by using immunoassays for trefoil factor family 2 and gastric gland mucous cell-type mucin in gastric juice. *Dig. Dis. Sci.* **56**, 3498–3506 (2011).
315. Dhar, D. K. *et al.* Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer. *Lab. Invest.* **83**, 1343–1352 (2003).
316. John, R., El-Rouby, N. M., Tomasetto, C., Rio, M.-C. & Karam, S. M. Expression of TFF3 during multistep colon carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* **22**, 743–751 (2007).
317. Aikou, S. *et al.* Tests for serum levels of trefoil factor family proteins can improve gastric cancer screening. *Gastroenterology* **141**, 837–845.e1–7 (2011).
318. Kaise, M. *et al.* The combination of serum trefoil factor 3 and pepsinogen testing is a valid non-endoscopic biomarker for predicting the presence of gastric cancer: a new marker for gastric cancer risk. *J. Gastroenterol.* **46**, 736–745 (2011).
319. Dhar, D. K. *et al.* Expression of trefoil factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6472–6478 (2005).
320. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8418–8423 (2003).

321. Zhao, H. *et al.* Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2523–2536 (2004).
322. Minn, A. J. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* **436**, 518–524 (2005).
323. Richardson, A. L. *et al.* X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* **9**, 121–132 (2006).
324. Saal, L. H. *et al.* Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 7564–7569 (2007).
325. Boersma, B. J. *et al.* A stromal gene signature associated with inflammatory breast cancer. *Int. J. Cancer* **122**, 1324–1332 (2008).
326. Waddell, N. *et al.* Gene expression profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded familial breast tumours using the whole genome-DASL assay. *J. Pathol.* **221**, 452–461 (2010).
327. Foekens, J. A. *et al.* Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res.* **50**, 3832–3837 (1990).
328. Foekens, J. A. *et al.* Prognostic value of PS2 and cathepsin D in 710 human primary breast tumors: multivariate analysis. *J. Clin. Oncol.* **11**, 899–908 (1993).
329. Foekens, J. A. *et al.* Relationship of PS2 with response to tamoxifen therapy in patients with recurrent breast cancer. *Br. J. Cancer* **70**, 1217–1223 (1994).
330. Schwartz, L. H. *et al.* pS2 expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res.* **51**, 624–628 (1991).
331. Goussard, J. *et al.* Immunoradiometric assay of pS2 protein in breast cancer cytosols. *Clin. Chem.* **37**, 1759–1762 (1991).
332. Henry, J. A. *et al.* pNR-2/pS2 immunohistochemical staining in breast cancer: correlation with prognostic factors and endocrine response. *Br. J. Cancer* **63**, 615–622 (1991).
333. Predine, J. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay of pS2 in breast cancers, benign tumors, and normal breast tissues. Correlation with prognosis and adjuvant hormone therapy. *Cancer* **69**, 2116–2123 (1992).
334. Pallud, C. *et al.* Immunohistochemistry of pS2 in normal human breast and in various histological forms of breast tumours. *Histopathology* **23**, 249–256 (1993).
335. Thompson, A. M. *et al.* pS2 is an independent factor of good prognosis in primary breast cancer. *Br. J. Cancer* **68**, 93–96 (1993).
336. Gion, M. *et al.* PS2 in breast cancer--alternative or complementary tool to steroid receptor status? Evaluation of 446 cases. *Br. J. Cancer* **68**, 374–379 (1993).
337. Spyratos, F., Andrieu, C., Hacène, K., Chambon, P. & Rio, M. C. pS2 and response to adjuvant hormone therapy in primary breast cancer. *Br. J. Cancer* **69**, 394–397 (1994).
338. Horiguchi, J., Iino, Y. & Takei, H. Expression of pS2 estrogen-inducible protein in primary breast cancer. *Oncology* **53**, 12–15 (1996).
339. Gillesby, B. E. & Zacharewski, T. R. pS2 (TFF1) levels in human breast cancer tumor samples: correlation with clinical and histological prognostic markers. *Breast Cancer Res. Treat.* **56**, 253–265 (1999).
340. Ioachim, E. *et al.* Clinicopathological study of the expression of hsp27, pS2, cathepsin D and metallothionein in primary invasive breast cancer. *Breast* **12**, 111–119 (2003).
341. Corte, M. D. *et al.* Cytosolic levels of TFF1/pS2 in breast cancer: Their relationship with clinical-pathological parameters and their prognostic significance. *Breast Cancer Res. Treat.* **96**, 63–72 (2006).
342. Chen, Y. *et al.* Estrogen receptor-related genes as an important panel of predictors for breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Letters* **302**, 63–68 (2011).
343. Zhou, L. *et al.* Prognostic and predictive value of TFF1 for adjuvant endocrine therapy in Chinese women with early ER positive breast cancer: comparing aromatase inhibitors with tamoxifen. *Breast* **20**, 15–20 (2011).
344. Crosier, M. *et al.* High expression of the trefoil protein TFF1 in interval breast cancers. *Am. J. Pathol.* **159**, 215–221 (2001).
345. Surowiak, P. *et al.* Multivariate analysis of oestrogen receptor alpha, pS2, metallothionein and CD24 expression in invasive breast cancers. *Br. J. Cancer* **95**, 339–346 (2006).
346. Markićević, M., Petrović, A., Kanjer, K., Nesković-Konstantinović, Z. & Nikolić-Vukosavujević, D. Estrogen-regulated cut-off values of pS2 and cathepsin D expression in breast carcinomas. *Adv. Exp. Med. Biol.* **617**, 341–348 (2008).
347. Ahmed, A. R. H., Griffiths, A. B., Tilby, M. T., Westley, B. R. & May, F. E. B. TFF3 is a normal breast epithelial protein and is associated with differentiated phenotype in early breast cancer but predisposes to invasion and metastasis in advanced disease. *Am. J. Pathol.* **180**, 904–916 (2012).
348. Gruvberger, S. *et al.* Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res.* **61**, 5979–5984 (2001).
349. West, M. *et al.* Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 11462–11467 (2001).
350. Smid, M. *et al.* Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J. Clin. Oncol.* **24**, 2261–2267 (2006).
351. Chenard, M.-P., Tomasetto, C., Bellocq, J.-P. & Rio, M.-C. Urinary pS2/TFF1 levels in the management of hormonodependent breast carcinomas. *Peptides* **25**, 737–743 (2004).
352. Prasad, N. B. *et al.* Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res.* **65**, 1619–1626 (2005).
353. Vestergaard, E. M., Borre, M., Poulsen, S. S., Nexø, E. & Tørring, N. Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 807–812 (2006).
354. Radiloff, D. R. *et al.* Trefoil factor 1 acts to suppress senescence induced by oncogene activation during the cellular transformation process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 6591–6596 (2011).
355. Stone, A. *et al.* Tamoxifen-Induced Epigenetic Silencing of Oestrogen-Regulated Genes in Anti-Hormone Resistant Breast Cancer. *PLoS One* **7**, (2012).
356. Shi, L. *et al.* Expression of ER-{alpha}36, a novel variant of estrogen receptor {alpha}, and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3423–3429 (2009).
357. Klinge, C. M. *et al.* Estrogen receptor alpha 46 is reduced in tamoxifen resistant breast cancer cells and re-expression inhibits cell proliferation and estrogen receptor alpha 66-regulated target gene transcription. *Mol. Cell. Endocrinol.* **323**, 268–276 (2010).
358. van Agthoven, T., van Agthoven, T. L., Dekker, A., Foekens, J. A. & Dorssers, L. C. Induction of estrogen independence of ZR-75-1 human breast cancer cells by epigenetic alterations. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1474–1483 (1994).
359. Raha, P., Thomas, S. & Munster, P. N. Epigenetic modulation: a novel therapeutic target for overcoming hormonal therapy resistance. *Epigenomics* **3**, 451–470 (2011).

360. Bianco, S. & Gévry, N. Endocrine resistance in breast cancer: from cellular signaling pathways to epigenetic mechanisms. *Transcription* **3**, (2012).
361. Zhou, Y. *et al.* Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC Cancer* **7**, 59 (2007).
362. Ballut, L. *et al.* The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 861–869 (2005).
363. Chan, C. C. *et al.* eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* **10**, 200–209 (2004).
364. Knut & Alice Wallenberg foundation The Human Protein Atlas. (2011).at <http://www.proteinatlas.org/>
365. Barretina, J. *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603–607 (2012).
366. Harbeck, N., Kates, R. E. & Schmitt, M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1000–1007 (2002).
367. Mikhitarian, K. *et al.* An innovative microarray strategy identities informative molecular markers for the detection of micrometastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3697–3704 (2005).
368. Piggott, N. H., Henry, J. A., May, F. E. & Westley, B. R. Antipeptide antibodies against the pNR-2 oestrogen-regulated protein of human breast cancer cells and detection of pNR-2 expression in normal tissues by immunohistochemistry. *J. Pathol.* **163**, 95–104 (1991).
369. Bharti, B. & Bharti, S. Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research: trade-off between sensitivity and specificity with change of test cut-offs. *J. Clin. Pathol.* **62**, 1051 (2009).
370. Søreide, K. Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research. *J. Clin. Pathol.* **62**, 1–5 (2009).
371. Leuchowius, K.-J., Weibrecht, I. & Söderberg, O. In situ proximity ligation assay for microscopy and flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* **Chapter 9**, Unit 9.36 (2011).

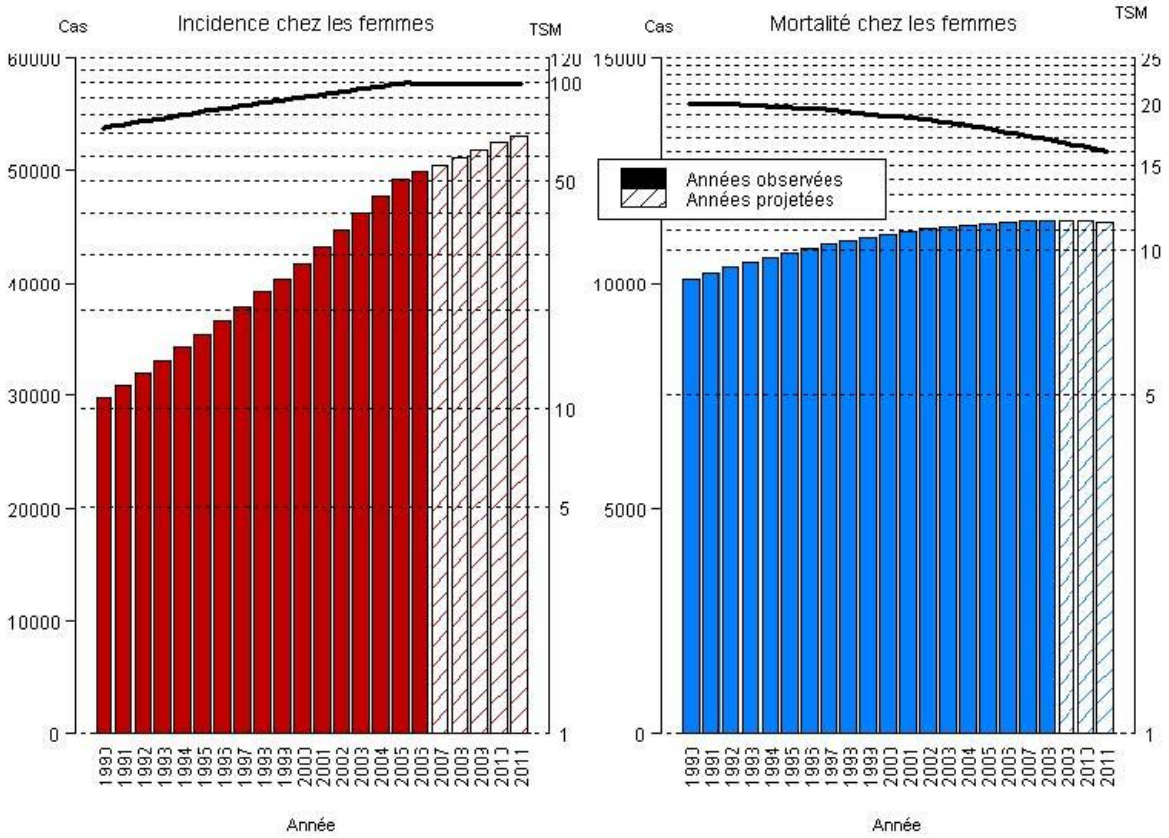

Figure 1 : Evolution de l'incidence et de la mortalité des cancers du sein en France.[4]

Sur l'axe des abscisses est représenté le temps en années. Sur l'axe des ordonnées sont représentés le nombre de patients. Sur le panel de gauche, le nombre de nouveaux cas par an (incidence) est représenté par un diagramme en bâtons rouges. Sur le panel de droite, le nombre de décès est représenté par un diagramme en bâtons bleus. L'incidence est stabilisée depuis quelques années, et la mortalité décroit.

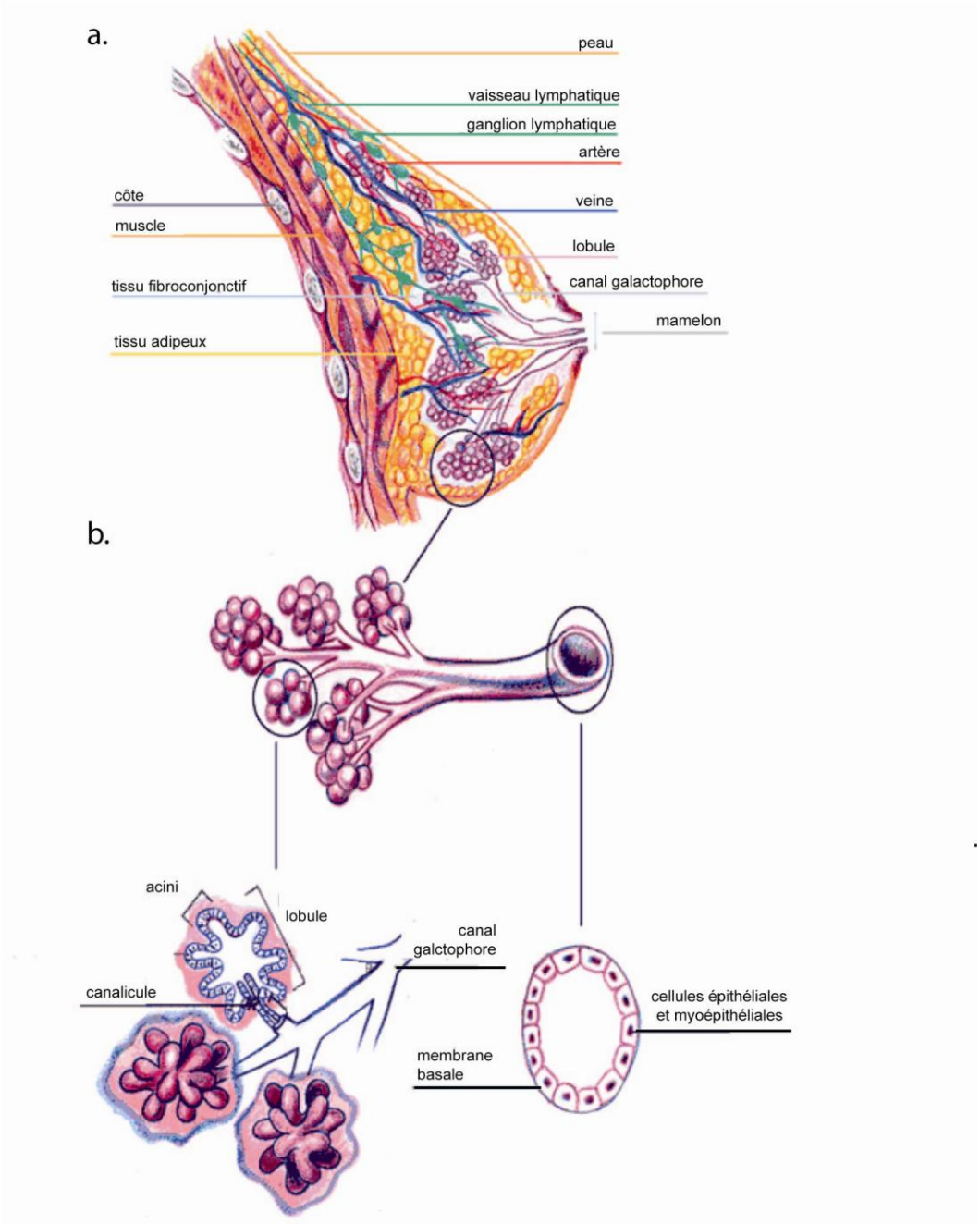

Figure 2 : Structure anatomique fonctionnelle d'un sein normal.

Commencé dès les premières semaines de vie fœtale, le développement anatomique de la glande mammaire suit les étapes hormonales de la vie de la femme. La structure anatomique fonctionnelle présentée ici correspond à une glande mammaire adulte normale non gestante (**a**). Les acinis et les canaux intralobulaires forment un lobule qui se draine par un canal interlobulaire (canal galactophorique de deuxième ordre). Plusieurs lobules se réunissent pour former un lobe glandulaire qui se draine par le canal galactophorique de premier ordre (**b**).

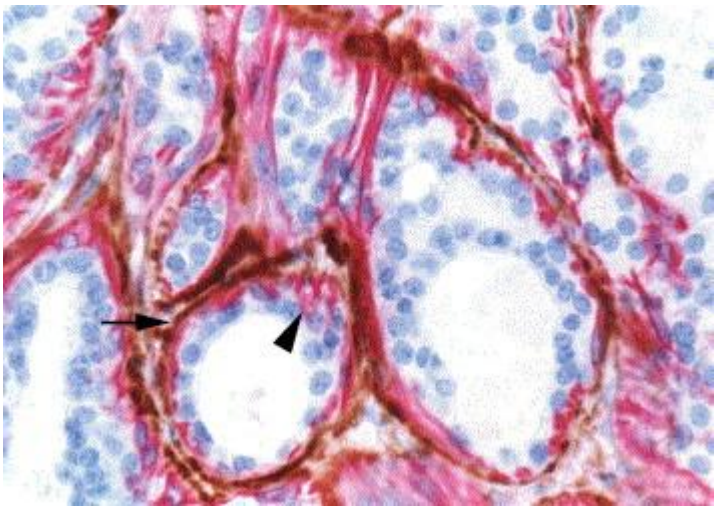

Figure 3 : Immunomarquage de tissu mammaire humain normal [63]

Un échantillon de glande mammaire humaine normale formolée puis incluse en paraffine a été immunomarquée par immunohistochimie (IHC). Un anticorps anti-actine de muscle lisse marque en rouge les cellules myoépithéliales. Un anticorps anti-collagène IV marque la membrane basale en brun. Le marquage bleu par hematoxyline marque le noyau des cellules épithéliales luminales. La lumière apparait en blanc. Grossissement x400.

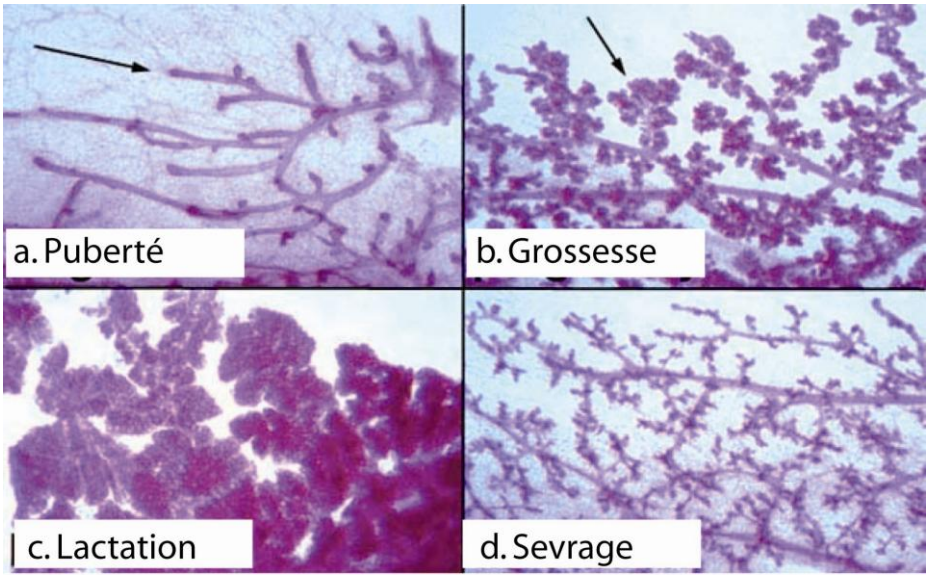

Figure 4 : Différents états de différenciation de la glande mammaire [64]

Ces photographies ont été faites chez la souris, mais l'aspect des canaux est similaire chez la femme aux différents stades de développement. (**a**) A la puberté, le développement mammaire n'est pas achevé. Les canaux galactophoriques ne sont pas fonctionnels. (**b**) Lors de la première grossesse, il y a prolifération des structures lobulaires. (**c**) Lors de la lactation, les cellules sécrétrices sont activées. Les structures lobulaires sont denses et occupent tout l'espace. (**d**) Lors du sevrage, les structures lobulaires régressent. La glande mammaire a atteint sa différenciation terminale.

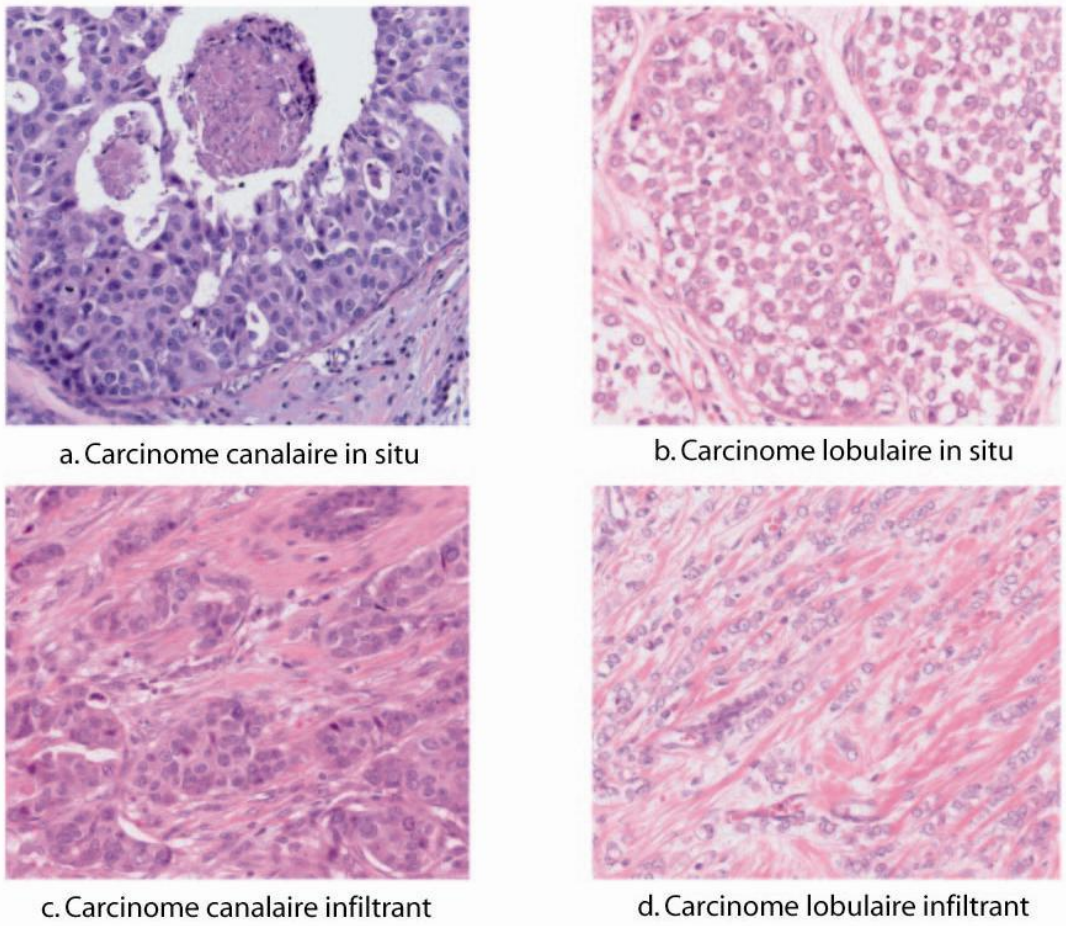

Figure 5 : Illustration des quatre principales formes histologiques de cancer du sein [72]

Coupes histologiques avec coloration hématoxyline et éosine d'un carcinome canalaire in situ (**a**), d'un carcinome lobulaire in situ (**b**), d'un carcinome canalaire infiltrant (**c**), d'un carcinome lobulaire infiltrant (**c**). Dans les carcinomes in situ, les cellulles épithéliales sont confinées à l'intérieur de la membrane basale tandis que dans les carcinomes infiltrants, elles envahissent le stroma. Grossissement x200.

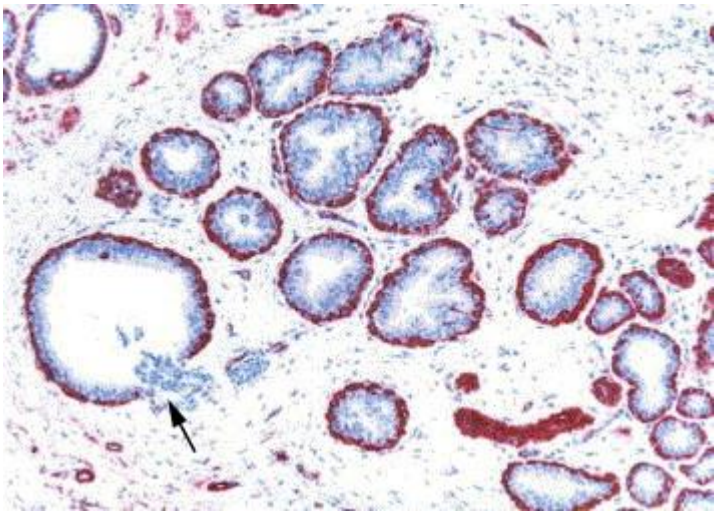

Figure 6 : Immunomarquage d'un carcinome infiltrant [63]

Les cellules myoépithéliales sont marquées en rouge grâce à un anticorps anti-actine de muscle lisse, les noyaux des cellules épithéliales luminales sont marqués en bleu grâce au colorant hématoxyline. La flèche montre la rupture de la membrane basale et l'invasion du tissu sous-jacent par les cellules épithéliales.

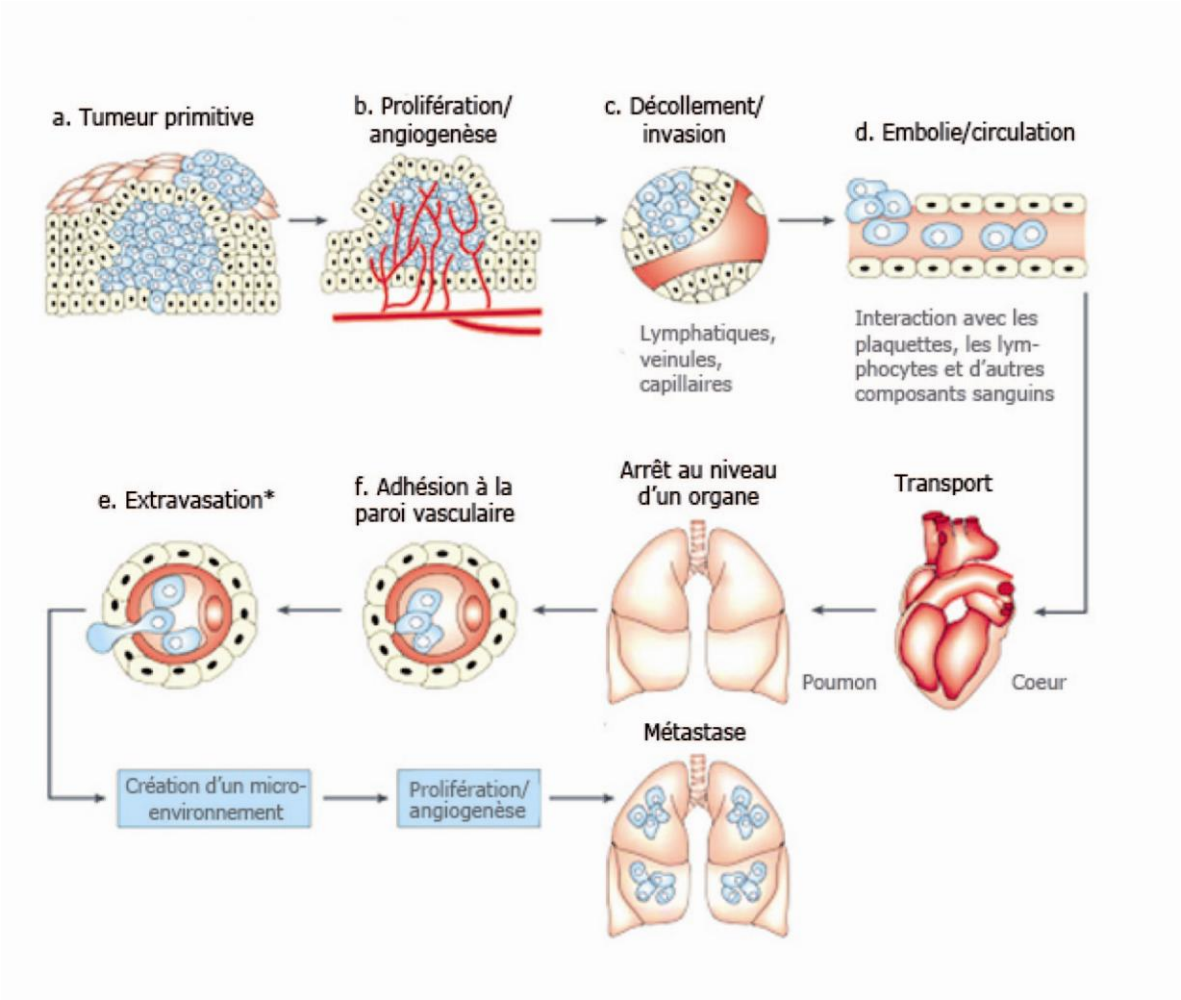

Figure 7 : Les principales étapes de la progression tumorale [75]

(a) La tumeur primaire se forme suite à la transformation d'une cellule épithéliale. **(b)** Les cellules transformées secrètent différents facteurs qui induisent le développement d'un réseau de vaisseau sanguins permettant d'apporter les nutriments. **(c)** Les cellules tumorales acquièrent la capacité d'envahir le tissu environnant puis **(d)** de pénétrer dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. **(e)** Les cellules s'arrêtent au niveau d'un organe secondaire en adhérant aux cellules endothéliales bordant les vaisseaux et pénètrent le tissu sous-jacent.

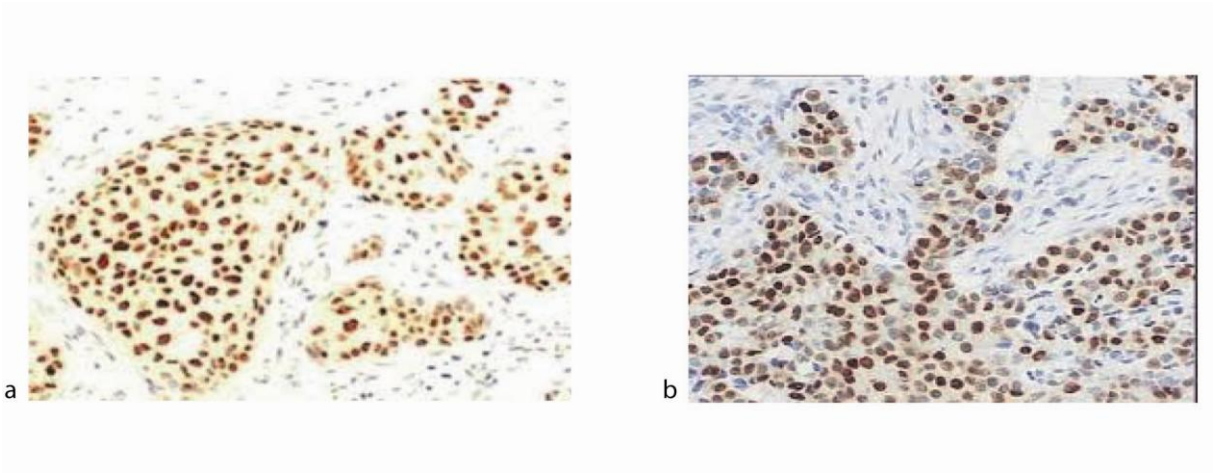

Figure 8 :Détection des récepteurs RE/RP par IHC sur coupes de tissu mammaire tumoral [89]

Sur les deux images, les noyaux de toutes les cellules (épithéliales et conjonctives) sont marqués en bleu grâce au colorant hématoxyline. (a) Un anticorps anti-récepteur aux œstrogènes marque celui-ci en brun. Cette image représente une tumeur fortement positive pour le RE, l'ensemble des noyaux correspondant aux cellules épithéliales sont colorés en brun. (b) Un anticorps anti-récepteur à la progestérone marque celui-ci en brun. Cette image représente une tumeur fortement positive pour le RP, l'ensemble des noyaux correspondant aux cellules épithéliales sont colorés en brun.

Score	Marquage en IHC	Indication thérapeutique anti-HER2
0	Absence de marquage ou marquage membranaire < 10 % de cellules invasives	Non
1+	Marquage membranaire faible et incomplet de > 10 % des cellules invasives	Non
2+	Marquage membranaire faible à modéré et complet de ≥ 10 % de cellules invasives	Oui, seulement si amplification prouvée par FISH/CISH/SISH
3+	Marquage membranaire fort et complet > 30 % des cellules invasives	Oui

Tableau 1 : Score HER2 déterminé par IHC +/- ISH et indications du trastuzumab [103]

En cas score 0 ou + déterminé par IHC, le trastuzumab n'est pas indiqué. En cas de score +++ déterminé par IHC, le trastuzumab est indiqué. En cas de score intermédiaire (++), l'amplification de HER2 doit être recherchée par ISH. Il a été montré que les patientes répondant le mieux au trastuzumab sont celles qui présentent une forte surexpression du récepteur (score IHC +++) et/ou celles qui présentent une amplification du gène (score ISH positif).

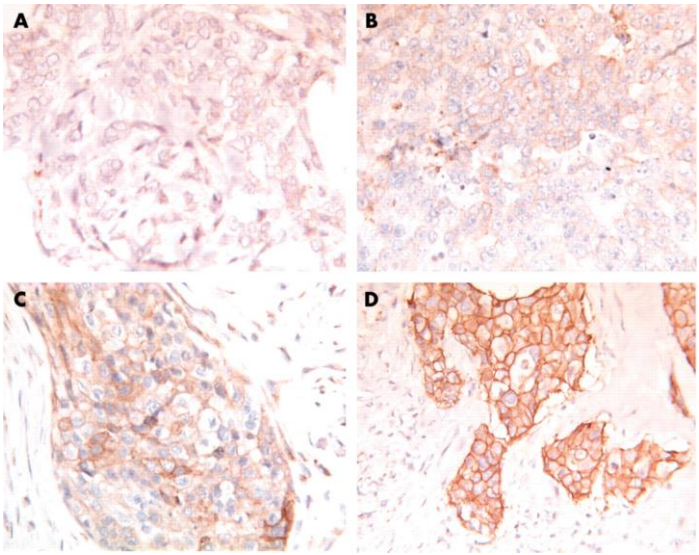

Figure 9 : Détection de HER2 par IHC sur coupes de tissu mammaire tumoral [102]

HER2 est marqué en brun grâce à un anticorps anti-HER2. La coloration est localisée à la membrane des cellules. (**a**) Score HER2 0 : moins de 10% des cellules marquées (**b**) Score HER2 + : faible marquage membranaire dans plus de 10% des cellules (**c**) Score HER2 ++ : marquage membranaire complet mais modéré dans moins de 30% des cellules. (**d**) Score HER2 +++ : marquage membranaire fort et complet dans plus de 30% des cellules.

	FISH, CISH ou SISH double sonde
amplification	rapport HER2/chr 17 supérieur à 2,2 ou présence de clusters
absence d'amplification	rapport HER2/chr 17 inférieur à 1,8
Borderline	entre 1,8 et 2,2. Recompter sur plus de noyaux
	FISH, CISH ou SISH simple sonde
amplification	plus de 6 signaux HER2 présents par noyaux ou présence de clusters
absence d'amplification	de 1 à 3,99 signaux HER2 présents par noyau
borderline	entre 4 et 6 signaux HER2 par noyau: effectuer une technique double sonde

Tableau 2 : Détermination du score HER2 par ISH [103]

Il existe plusieurs méthodes d'hybridation ISH, elles diffèrent par la nature de la sonde. La sonde est visualisable grâce à un fluorochrome dans un FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) ou par un chromogène dans un CISH (Chromogenic In Situ Hybridization) ou un SISH (Silver In Situ Hybridization). L'ISH est une méthode complémentaire à l'IHC qui permet de déterminer si la surexpression de HER2 observée en IHC est le résultat de l'amplification du gène ou non.

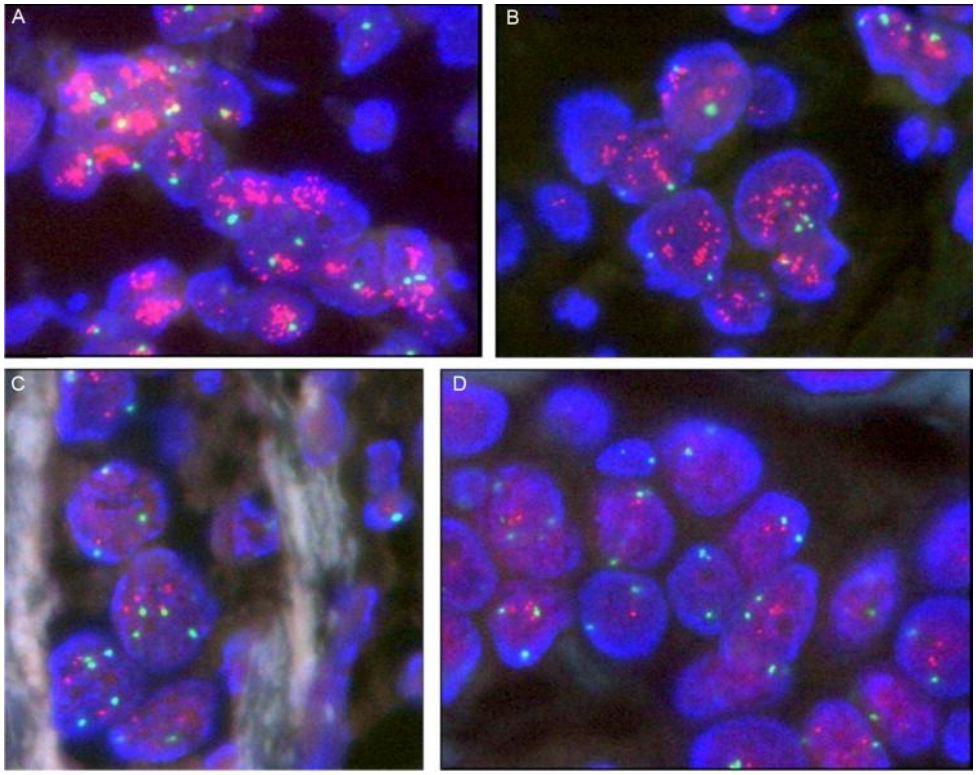

Figure 10 : Détermination du score HER2 par FISH [101]

Hybridation in situ avec sonde fluorescente (FISH). HER2 est en rouge, et le centrosome du chromosome 17 (CEP17)en vert. (**A)** Cas amplifié sous forme majoritaire de « clusters » ou agrégats de signaux. (**B)** Cas amplifié sans agrégats (environ 20 copies HER2 par cellules). (**C**) Cas avec polysomie : quatre copies HER2 et quatre copies CEP17, absence d'amplification. (**D**) Cas non amplifié.

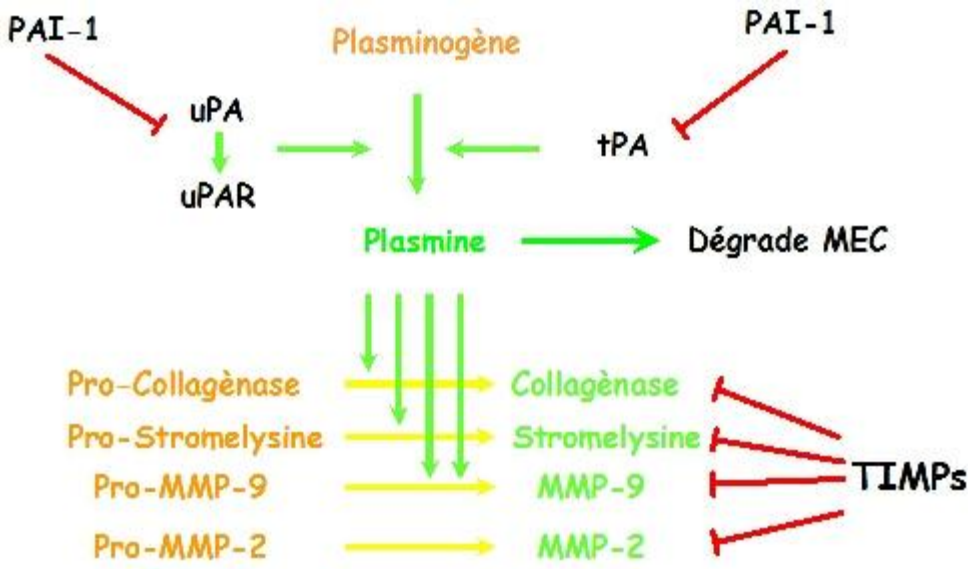

Figure 11 : Système uPA plasminogène [115]

La valeur pronostique de l'activateur de type urokinase du plasminogène (uPA) et de son inhibiteur PAI-1 dans les cancers du sein sans envahissement ganglionnaire est utilisée dans la pratique clinique. Comme l'indique le schéma, uPA est le carrefour moléculaire d'activation d'un ensemble de pro-protéases impliquées dans le phénomène invasif. Le plasminogène est activé en plasmine sous l'action de uPA et de tPA, inhibés par PAI-1. La plasmine participe à la dégradation de la MEC, et active les collagénases et MMPs. Les MMPs sont inhibées par les TIMPs.

		Taille de la tumeur primitive
Tx		la tumeur primitive ne peut pas être évaluée
T0		la tumeur primitive n'est pas palpable
T is		tumeur in situ
1		tumeur ≤2 cm dans sa plus grande dimension
	T1 mic	≤ 1 mm dans sa plus grande dimension
	T1a	0,1 mm < tumeur ≤ 5 mm dans sa plus grande dimension
	T1b	0,5 cm < tumeur ≤ 1 cm dans sa plus grande dimension
	T1c	1 cm < tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
T2		2 cm < tumeur ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
T3		> 5 cm dans sa plus grande dimension
T4		tumeur avec extension à la paroi thoracique ou à la peau, ou tumeur inflammatoire
	T4a	extension à la paroi thoracique
	T4b	œdème (y compris peau d'orange), ulcération de la peau ou nodules de perméation situés sur la peau même du sein
	T4c	T4a + T4ab
	T4d	cancer inflammatoire
		Ganglions lymphatiques regionaux
Nx		l'envahissement des ganglions régionaux ne peut être évalué
N0		pas d'adénopathie axillaire
N1 mi		0,2mm <métastase ≤ 2 mm
N1	**N1a**	envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires
	N1b	envahissement des ganglions de la CMI detecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
	N1c	N1a + N1b
N2	**N2a**	envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire >2 mm
	N2b	envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire
N3	**N3a**	envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires
	N3b	envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaire et envahissement des ganglions de la CMI detecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
	N3c	envahissement des ganglions sus-claviculaire homolatéraux
		Métastases
Mx		renseignements insuffisants
M0		absences de métastases à distance
M1		présence de métastases à distance

Tableau 3: Classification TNM (2002) [103]

La classification TNM est un système international permettant de classer les tumeurs selon leur extension anatomique. Elle tient compte de la taille de la tumeur (T), de l'envahissement ganglionnaire (N) et des métastases (M)

0	T is NO MO
I	T1 N0 M0
IIA	T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0
IIB	T2 N1 M0 ; T3 N0 M0
IIIA	T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0
IIIB	T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0
IIIC	tous T N3 M0
IV	tous T tous N M1

Tableau 4 : Classification par stade UICC [103]

Il existe un tableau de correspondances entre la classification TNM et les stades UICC

1. Différenciation tubulo-glandulaire :	**Score**
proportion de tubes ou glandes dans la tumeur (en % 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 ; valeurs définies pour un champ de 0,48 mm de diamètre ; calibrage du microscope nécessaire pour des champs différents)	
0 à 6 mitoses	1
7 à 12 mitoses	2
> 12 mitoses	3
AU TOTAL	
Grade I	3, 4, 5
Grade II	6, 7
Grade III	8, 9

Tableau 5 : Grade SBR modifié par Elston et Ellis [103]

Le garde SBR permet le calcul d'un score basé sur 3 critères histologiques, cotés de 1 à 3. La somme des cotes obtenues pour chacun critère donne le score final.

groupe 1	score 2
groupe 2	score 3
groupe 3	score 4
groupe 4	score 5
groupe 5	score 6

Tableau 6 : Grade MSBR (Modified SBR) [103]

Le grade MSBR prend en compte seulement de deux des trois critères du grade SBR :le pléomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses, mais pas la proportion de tubes ou glandes. La somme des cotes obtenues pour chacun critère donne le score final. Il comprend 5 groupes.

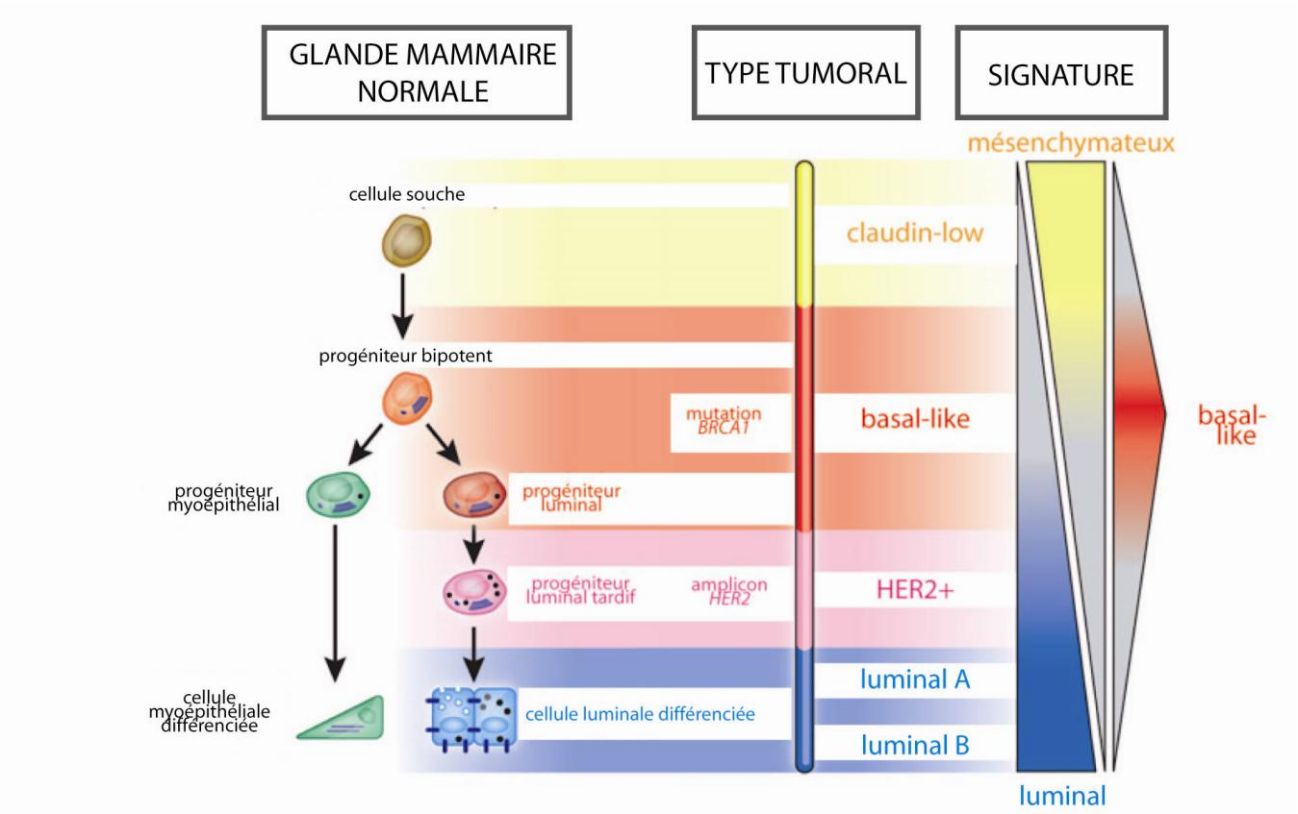

Figure 12 : Modèle reliant la hiérarchie cellulaire mammaire et les sous-types tumoraux [149]

Les sous-populations de la glande mammaire normale peuvent à un stade du développement stopper leur différenciation, et se transformer en cellules cancéreuses. Les différents sous types tumoraux sont caractérisés par un profil moléculaire particulier qui se rapproche de certains stades de différenciation de l'épithélium mammaire . En 2011, les travaux de Cédric Blanpain [70] remettent en cause ce modèle. La glande mammaire contient en réalité non pas un type de cellule souche multipotente mais deux types de cellules souches unipotentes, une pour la lignée luminale et une pour la lignée myoépithéliale.

Sous-types	Définition clinico-pathologique		Traitements
Luminal A	RE+/RP+/HER2- Ki67 bas		Hormonothérapie exclusive sauf si facteur de risques
Luminal B	**HER2 négatif**	RE+ et/ou RP+ / HER2- Ki67 fort	Hormonothérapie +/- Chimiothérapie
	HER2 positif	RE+ et/ou RP+ / HER2- Ki67 indifférent	Chimiothérapie Trastuzumab Hormonothérapie
HER2+ non luminal	RE-/RP-/HER2+		Chimiothérapie Trastuzumab
Triple négatif	RE-/RP-/HER2-		Chimiothérapie
Cas histologiques particuliers	Hormonosensibles	Cribiformes, tubuleux, mucineux	Hormonothérapie exclusive sauf si facteur de risques
	Non-hormonosensibles	Apocrines, médullaires, adénoides kystiques et métaplasiques	Chimiothérapie

Tableau 7 : Classification des cancers du sein [114]

La classification des cancers du sein utilisé en clinique comprend 5 sous-types principaux : Luminal A et B qui surexpriment les récepteurs hormonaux, HER2+ non luminal, les triples négatifs et les cas particuliers. Cette classification oriente la stratégie thérapeutique.

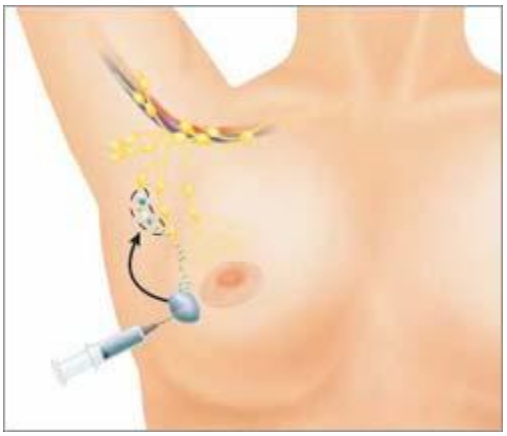

Figure 13 : Technique du ganglion sentinelle [103]

Il s'agit de repérer le premier ganglion susceptible d'être atteint par les cellules malignes, de le retirer chirurgicalement et de l'analyser. S'il est parfaitement sain, il est alors inutile d'enlever les autres ganglions. La double détection isotopique et colorimétrique du ganglion sentinelle constitue la technique de référence (Mathelin et al. 2009). La détection colorimétrique est réalisée par injection au niveau péri-aréolaire de bleu de méthylène en début d'intervention. La détection isotopique est réalisée par injection au niveau péri-aréolaire d'un colloïde marqué avec du technétium la veille ou le matin de l'intervention.

Famille	Action	Molécules	Effets indésirables
Anthracyclines	Grace à la présence dans leur structure de cycles plans, ils s'intercalent dans la double hélice des acides nucléiques.	daunorubicine doxorubicine épirubicine	myélosuppression cardiomyopathies
Taxanes	Ils se fixent sur les tubules et stoppent leur dépolymérisation. La persistance des microtubules empêche la cellule de se diviser.	paclitaxel docétaxel	myélosuppression neutropénie neuropathies alopécie
Analogues des bases pyrimidiques (5FU)	Il est transformé en métabolites actifs qui s'incorporent dans la biosynthèse des acides nucléiques.	5-fluoro-uracile	granulopénie thrombopénie alopécie dermatite
Alkylants (cyclophosphamide et ifosfamide)	Ils agissent en attachant un groupe alkyle (C_nH_{2n+1}) à l'ADN, ce qui perturbe la division cellulaire.	cyclophosphamide ifosfamide	Neutropénies alopécie cystites hémorragiques

Tableau 8 : Les principales chimiothérapies utilisées dans le cancer du sein [175 (adapté)]

Les familles de chimiothérapie principalement utilisées dans le cancer du sein sont les anthracyclines, les taxanes, les analogues des bases pyrimidiques et les alkylants. Les anthracyclines présentent une forte toxicité cardiaque et nécessitent un monitoring

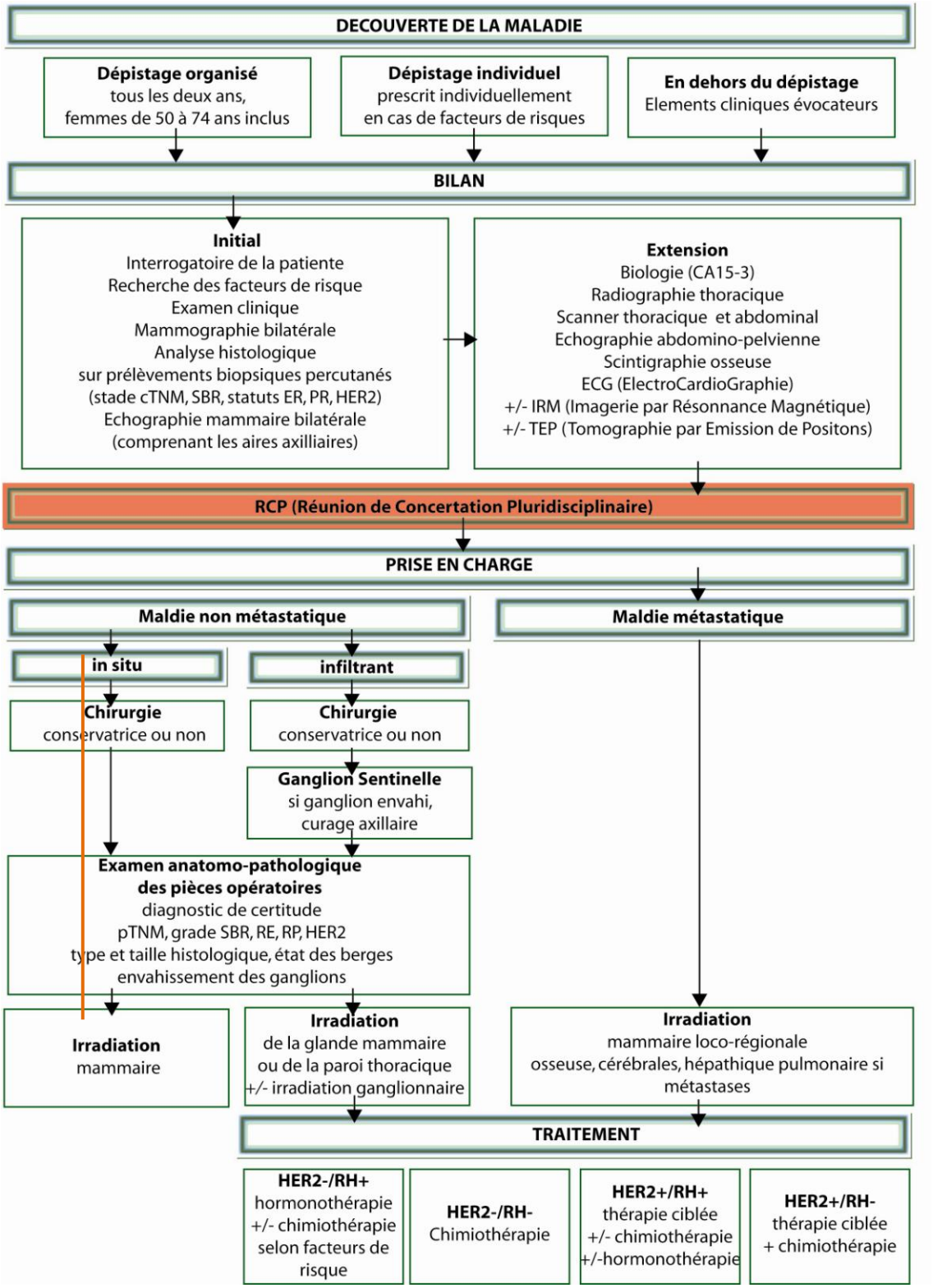

Figure 14 : Le parcours d'une patiente [175 (adapté)]

La découverte de la maladie peut avoir lieu lors du dépistage organisé ou individuel, ou dehors de tout dépistage. L'ensemble des données du bilan initial et d'extension sont discutées en RCP afin de décider de la meilleure stratégie thérapeutique (adapté de VidalReco, 2012).

ACR 1	Mammographie normale
ACR 2	Il existe des anomalies bénignes ne nécessitant ni surveillance ni examen complémentaire
ACR 3	Il existe une anomalie probablement bénigne pour laquelle une surveillance à court terme est conseillée
ACR 4	Il existe une anomalie indéterminée ou suspecte qui indique une vérification histologique
ACR 5	Il existe une anomalie évocatrice d'un cancer

Tableau 9 : Classification ACR des images radiographiques [103]

La classification des images oriente le suivi ultérieur de la patiente : surveillance, examens complémentaires, vérification histologique…

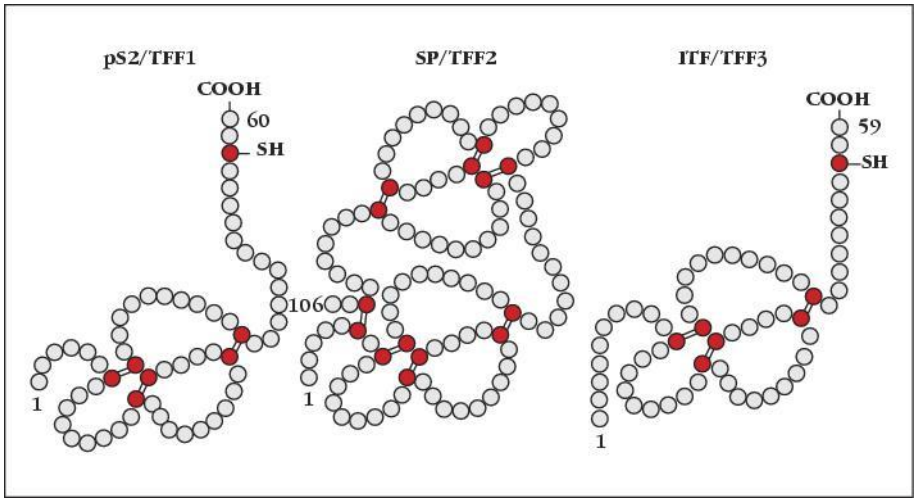

Figure 15 : Structure primaire des protéines en trèfle [236]

Chaque cercle représente un acide aminé (aa). La position du premier et du dernier acide aminé est indiqué par un nombre. TFF1 possède 60 aa, TFF2 possède 106 aa, TFF3 possède 59 aa. Les perles rouges symbolisent les cystéines et les doubles barres les ponts disulfures.

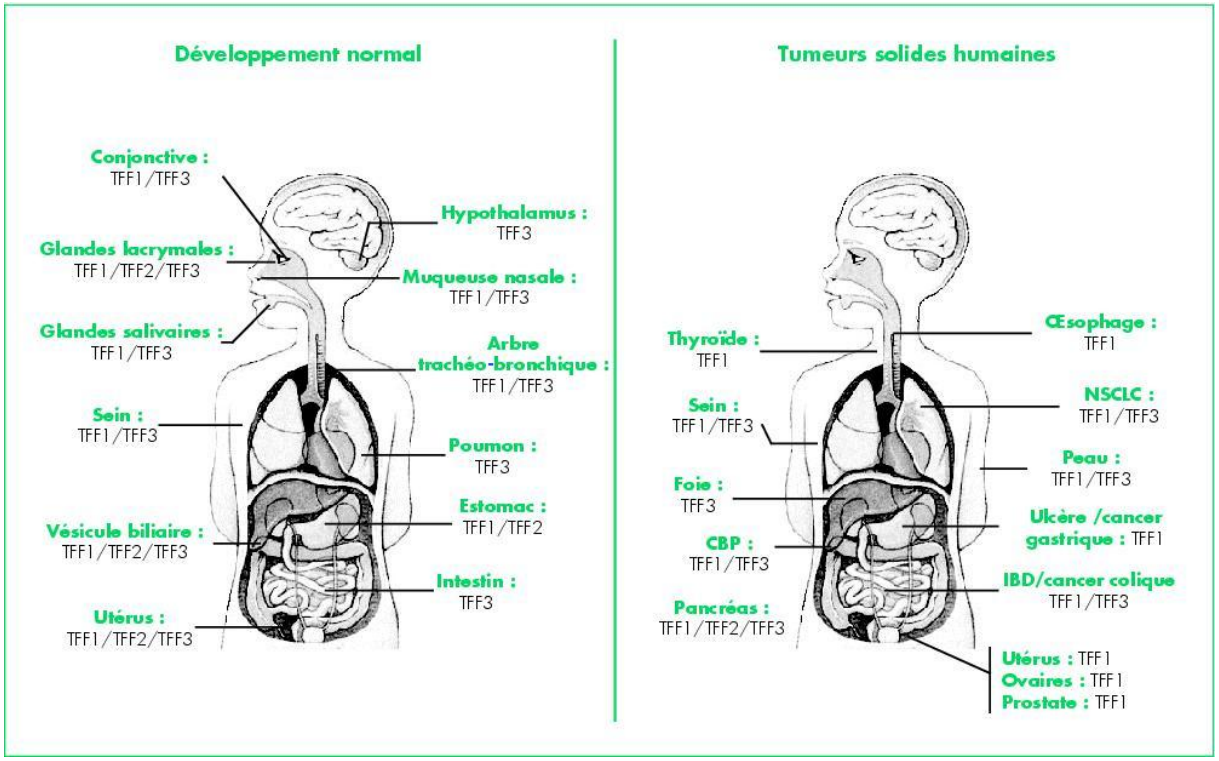

Figure 16 : Distribution des TFF [246]

Le panel de gauche présente la distribution des TFF dans les tissus sains. Le panel de droite présente la distribution des TFF dans les tumeurs solides. CBP : Cirrhose Biliaire Primitive ; NSCLC : cancers pulmonaires non à petites cellules ; IBD : maladies inflammatoires de l'intestin.

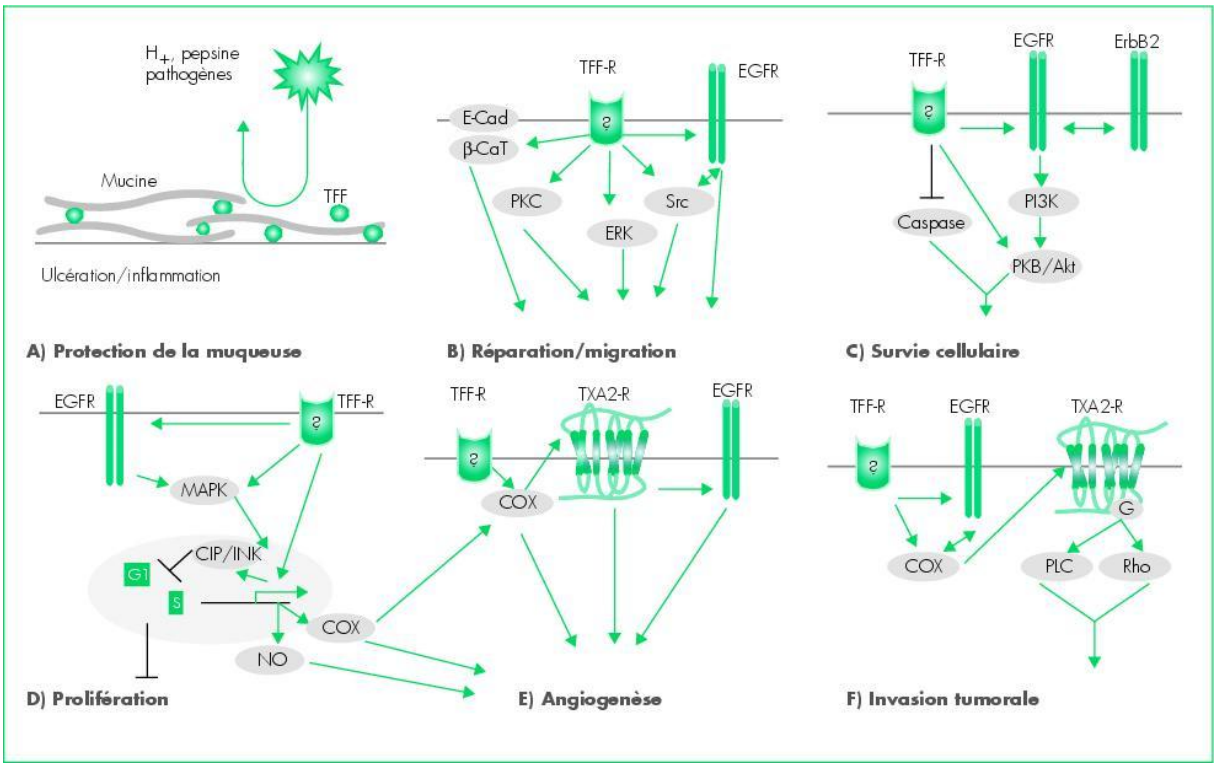

Figure 17 : Fonctions des TFF [246]

Les TFF possèdent des propriétés de protection et de réparation contre les lésions affectant la muqueuse digestive, suite à des agressions mécaniques, l'intrusion d'agents pathogènes, l'ulcération et les processus inflammatoires (A). Dans ce contexte, ils exercent des effets bénéfiques sur la migration, la survie et la prolifération cellulaires et l'angiogenèse (B, C, D, E). Pendant les processus de cancérogenèse, ces mêmes fonctions cellulaires exercent au contraire des effets indésirables, associés aux propriétés pro-invasives des TFF (F). Ces fonctions font appel à l'activation transitoire ou permanente de voies de signalisation directement impliquées dans les processus tumoraux, et comprenant les récepteurs putatifs des TFF (TFF-R), de l'EGF (EGFR) et du thromboxane A2 (TXA2-R), les produits des cyclo-oxygénases (COX) incluant le TXA2 et les prostaglandines. L'activation de ces récepteurs mobilise en aval les protéines G hétérotrimériques (G) transformantes Gα12/13 et Gαq, les petites protéines G apparentées à Rho, les COX, le NO, les cascades de signalisation utilisant les kinases Src, PKC, PI3'K, PKB/Akt, MAPK-ERK, et les inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines comme CIP/INK qui bloquent la prolifération à la transition G1/S du cycle cellulaire.

Techniques	Niveau d'expression du gène	Matériel	Brève description	Contrôle de la taille	Contrôle de la cellularité
IHC (Immuno HistoChimie)	protéines	Coupe de tissu formolé et inclus en paraffine	Dépôt de l'ac Ir sur la coupe, fixation de l'ac Ir sur la protéine d'intérêt, dépôt de l'ac IIr marqué.	non	oui
ELSA-kit (Element Linked Solid Assay)	protéines	Extraits protéiques cytosoliques de broyats de tissu	Fixation de la protéine d'intérêt par l'ac Ir, lui même accroché à une phase solide. Après lavages, fixation de l'anticorps IIr marqué	non	non
WB (Western Blot)	protéines	Extraits protéiques totaux de broyats de tissu	voir Ch.4-V	oui	non
ISH (Hybridation In Situ)	ADN ou ARNm	Coupe de tissu formolé et inclus en paraffine	voir Ch.1-IV-ii	non	oui
RT-PCR	ARNm	Extraits ARN issus de broyats de tissu	Rétro-transcription suivi d'une PCR (dénaturation de la molécule d'ADN, hybridation avec des amorces spécifiques	non	non
NB (Northern Blot)	ARNm	Extraits ARN issus de broyats de tissu	Séparation des ARN par électrophorèse, puis transfert sur membrane et hybridation avec une sonde spécifique marquée.	oui	non
puces	ARNm	Extraits ARN rétrotranscrits de broyats de tissu	Hybridation de l'ARN rétrotranscrit marqué avec le brin complémentaire sur la matrice	non	non

Tableau 10 : Caractéristiques principales de différentes méthodes de dosage

L'expression des TFFs dans les tissus tumoraux humains a été étudiée à de nombreuses reprises dans la littérature. Les caractéristiques des techniques utilisées dans les articles sont présentées et comparées ici.

Premier auteur	Année de publication	Niveau d'expression	Technique utilisée	Nbre de patients	% total de tumeurs TFF1+	% de tumeurs ER+	% de tumeurs ER+/TFF1+
Rio	1987	protéine	IHC	180	50	72	67
Foekens	1990	protéine	IHC	205	27	74	35
Schwartz	1991	protéine	IHC	72	29	nr	35
Henry	1991	protéine	IHC	172	68	52	nr
Goussard	1991	protéine	ELSA	289	39	68	49
Pallud	1993	protéine	IHC	145	33	nr	59
Gion	1993	protéine	IHC	446	60	73	75
Thompson	1993	ARNm	NB	78	32	58	42
Foekens	1993	protéine	ELSA	170	61	nr	nr
Spyratos	1994	protéine	ELSA	319	70	70	77
Foekens	1994	protéine	ELSA	230	60	83	72
Horiguchi	1996	protéine	IHC	210	49	nr	nr
Poulsom	1997	ARNm	ISH	45	73	nr	nr
		protéine	IHC	45	78	nr	nr
Gillesby	1999	ARNm	RT-PCR	100	nr	nr	59
Crosier	2001	protéine	IHC	84	15	77	43
		protéine	IHC	51 (1)	55	34	75
West	2001	ARNm	puce	49	31	50	36
Van de Vijver	2002	ARNm	puce	295	32	70	24
Ioachim	2003	protéine	IHC	134	38	70	34
Sorlie	2003	ARNm	puce	112	43	74	36,5
Zhao	2004	ARNm	puce	49	20	70	29
Minn	2005	ARNm	puce	99	20	58	35
Richardson	2006	ARNm	puce	39	18	38	46
Surowiak	2006	protéine	IHC	104	40	60	45
Saal	2007	ARNm	puce	105	16	43	31
Boersma	2008	ARNm	puce	47	36	45	57
Mathelin	2008	protéine	IHC	61	46	69	60
		protéine	IHC	40(2)	57.5	47.5	84
Zhou	2011	protéine	IHC	1973 (3)	nr	nr	65
				moyennes	**46**	**67**	**57**

Tableau 11 : Principaux articles ayant recherché l'expression de TFF1 dans des échantillons tumoraux mammaires humains.

Une revue de la littérature a été réalisée en utilisant le moteur de recherche Pubmed. Les résultats de microarray ont été obtenus après consultation de la base de données Oncomine (https://www.oncomine.org/). (1) Ces 51 patients représentent une sous-population particulière. Ces 51 tumeurs dits « de l'intervalle » sont devenus symptomatiques entre deux mammographies de dépistage organisé. (2) Ces 40 patientes représentent une sous-population particulière. Toutes ces patientes sont

atteintes d'un cancer associé à la grossesse. [3] Ces 1973 patientes sont toutes ER+. Les références des articles sont renseignées dans la partie bibliographique.

Premier auteur	Année de publication	Niveau d'expression	Technique utilisée	Nbre de patients	% total de tumeurs TFF3 +	% de tumeurs ER+	% de tumeurs ER+/TFF3 +
Poulsom	1997	ARNm	ISH	45	89	nr	nr
West	2001	ARNm	puce	49	16	50	28
Gruvberger	2001	ARNm	puce	47	28	48	48
Sorlie	2003	ARNm	puce	112	40	74	46
Minn	2005	ARNm	puce	99	19	58	32
Richardson	2006	ARNm	puce	39	15	38	40
Waddel	2010	ARNm	puce	69	57	61	39
Ahmed	2012	protéine	IHC	372	83	nr	nr
				moyennes	**58**	**59**	**39**

Tableau 12 : Principaux articles ayant recherché l'expression de TFF3 dans des échantillons tumoraux mammaires humains.

Une revue de la littérature a été réalisée en utilisant le moteur de recherche Pubmed. Les résultats de microarray ont été obtenus après consultation de la base de données Oncomine (https://www.oncomine.org/).

	IHC	ELSA	puces	WB
% de tumeurs ER+	75	73	61	86
% de tumeurs ER+/TFF1+	56	66	32	42
% de tumeurs TFF1 total	48	57	29	36
% de tumeurs ER+	nr		59	86
% de tumeurs ER+/TFF3+	nr		39	19
% de tumeurs TFF3 total	84		31	16.5
% de tumeurs TFF1+/TFF3+				13

Tableau 13 : Pourcentages moyens de tumeurs TFF1 et TFF3 positives dans des échantillons mammaires humains.

Des proportions moyennes (en pourcentage) de tumeurs mammaires humaines exprimant TFF1 ou TFF3 parmi l'ensemble des tumeurs et parmi les tumeurs ER+ ont été calculées, en tenant compte du nombre de patients inclus dans chaque étude. Les populations particulières citées plus haut n'ont pas été inclues dans le calcul de ces moyennes. Les études ayant utilisé les mêmes techniques ont été regroupées.

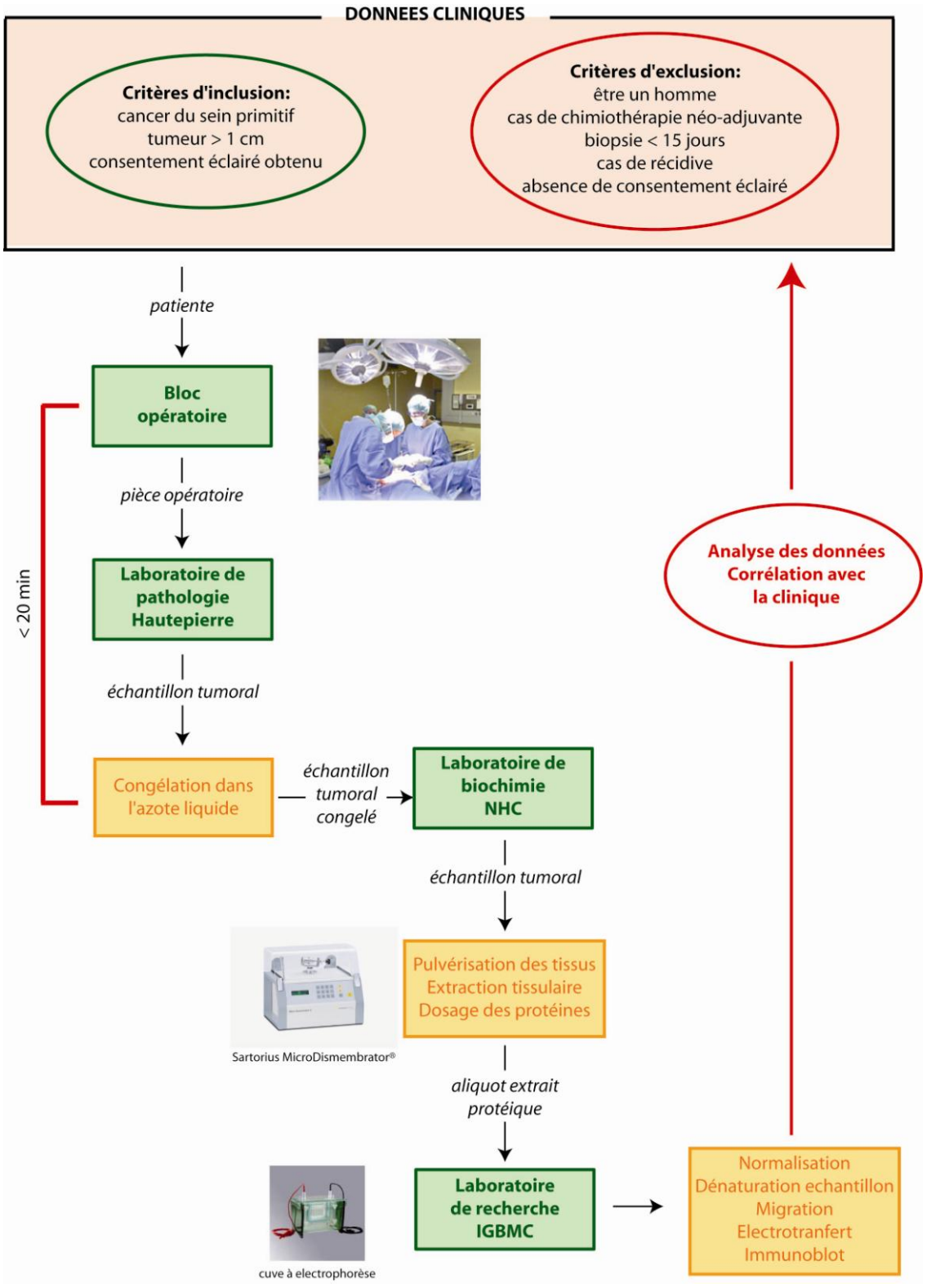

Figure 18 : Le principe de l'étude

Au bloc opératoire, le chirurgien confie le plus rapidement possible la pièce opératoire au pathologiste. Si les critères d'inclusions sont réunis, un échantillon est prélevé et congelé dans de l'azote liquide. L'échantillon est transmis par coursier au laboratoire de biochimie pour extraction protéique. Notre équipe récupère un aliquot de cet extrait protéique sur lequel est réalisé un immunoblot.

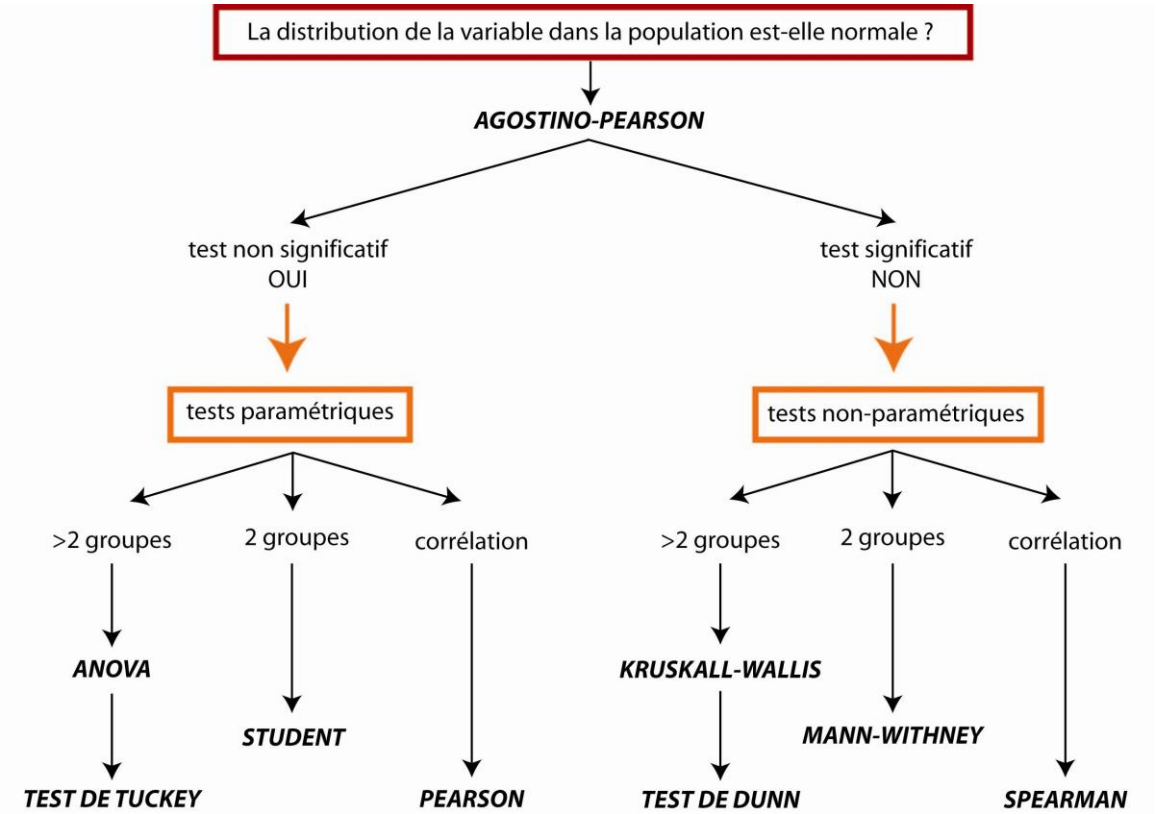

Figure 19 : Arbre décisionnel pour les tests statistiques

Le test d'Agostino permet de tester la normalité de la distribution et de s'orienter vers des tests paramétriques ou non-paramétriques. Les tests sont réalisés au risque α 5%.

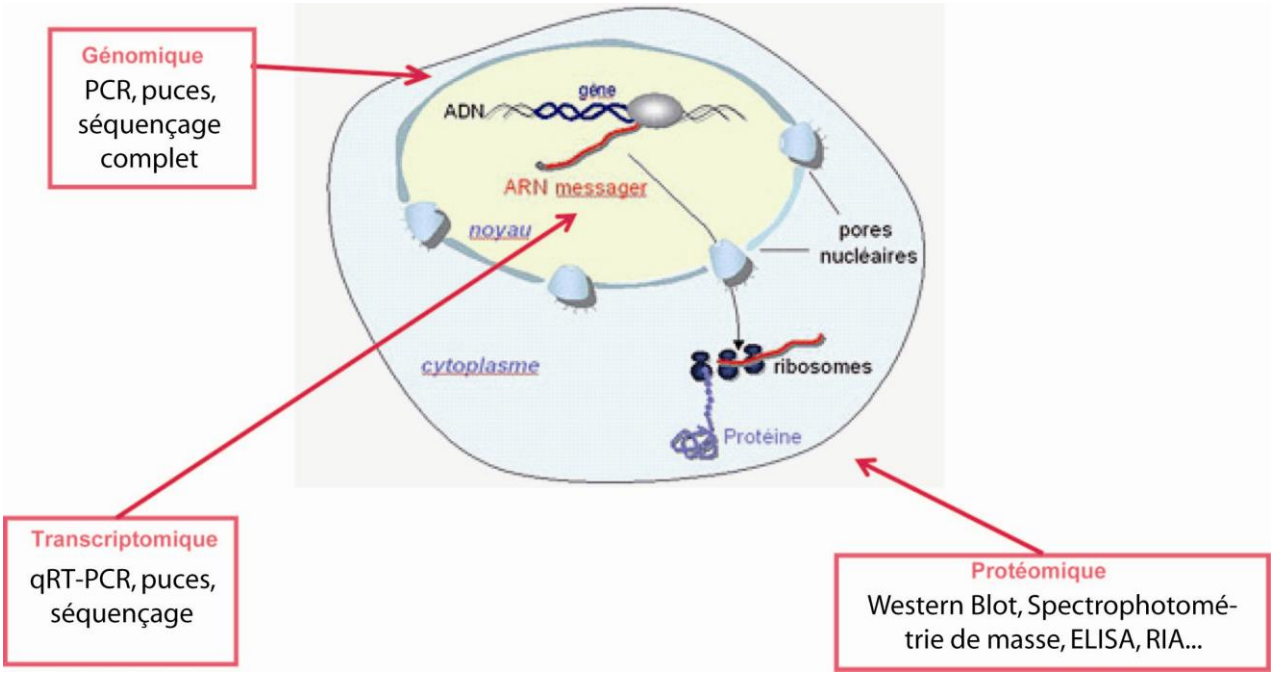

Figure 20 : Différents niveaux d'expression des gènes et technique adaptées

L'ADN est transcrit en ARN dans le noyau puis traduit en protéines dans le cytoplasme. L'exploration au niveau génomique peut être réalisée par PCR ou puces, au niveau transcriptomique par qRT-PCR ou par puces, au niveau protéomique par Western Blot, ELISA, RIA ou par spectrophotométrie de masse.

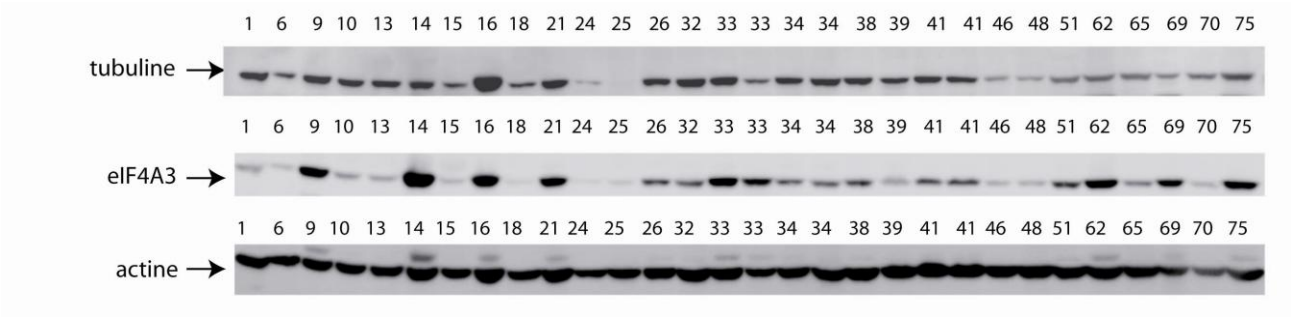

Figure 21 : Choix du témoin de charge

Les extraits protéiques tumoraux ont été analysés par Western Blot avec un anticorps anti-tubuline (ligne 1), un anticorps anti-eIF4AIII (ligne 2), un anticorps anti-actine (ligne3).

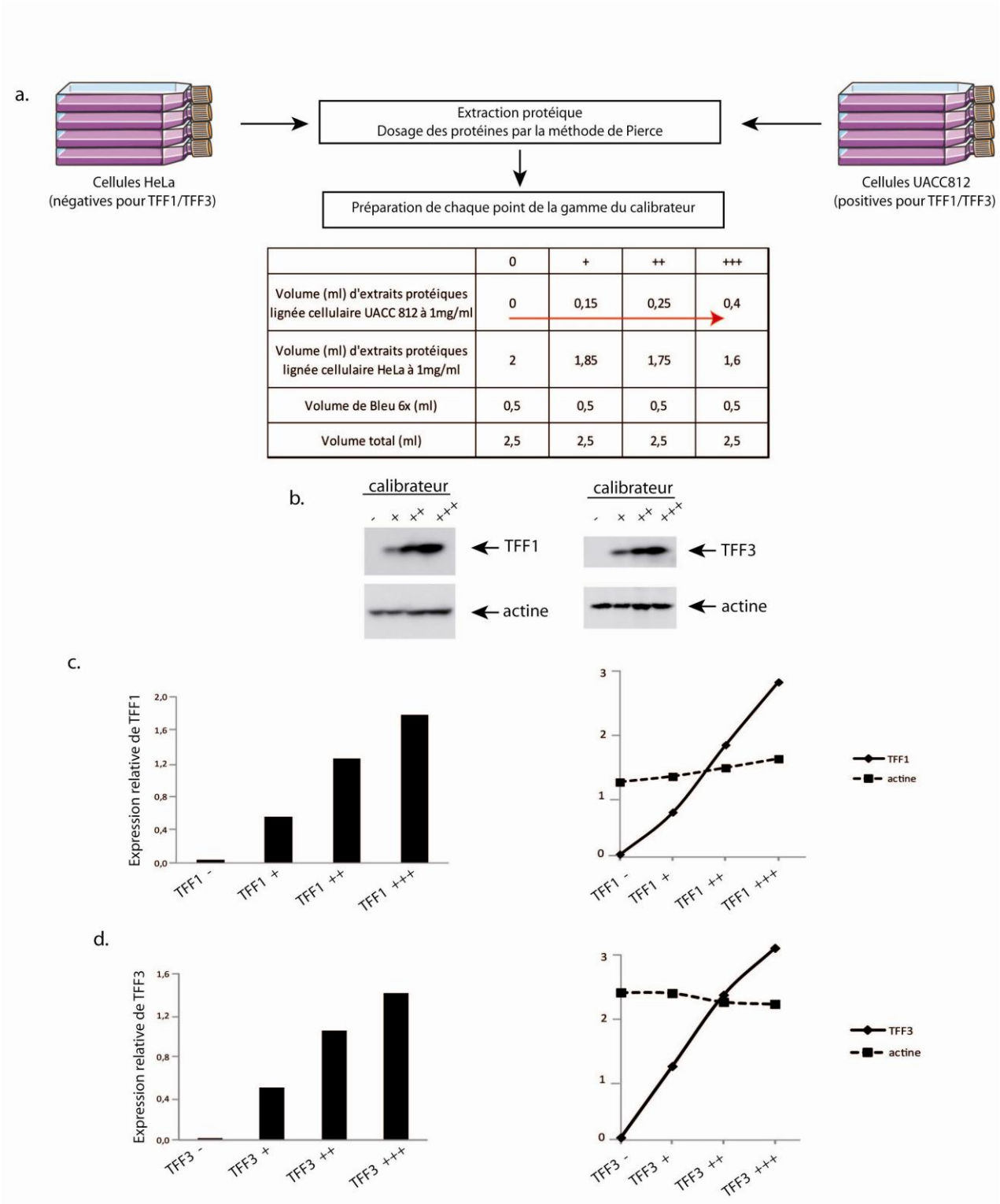

Figure 22 : Principe du calibrateur

Des extraits protéiques cellulaires positifs pour TFF1/TFF3 (UACC812) et des extraits protéiques cellulaires négatifs pour TFF1/TFF3 (HeLa) sont mélangés pour préparer la gamme de concentration des TFFs (**a**). L'expression des protéines est contrôlée par Western Blot (**b**). Les quantités absolues de protéines sont quantifiées sur ImageJ® et les rapports [protéine d'interêt] / [témoin de charge] sont calculés. Un diagramme en bâtons (**c** et **d,** panel de gauche) visualise les quantités relatives de TFF1 (**c**) et

de TFF3 (**d**). Les courbes représentent les quantités absolues de protéine, FF en trait plein, et actine, en trait pointillé (**c** et **d**, panel de droite).

	Patientes RE+ n=82	Patientes RE- n=14	Patientes HER2+ n=8	Patientes triple négatif n=11	Patientes toutes confondues n=96
Age					
moyenne (années)	61,9 [40-90]	61.9 [35-73]	62,3 [40-83]	62,4 [35-83]	61,7 [35-90]
≤50 ans	11 (13%)	3 (21%)	2 (25%)	2 (18%)	14 (15%)
>50 ans	71 (87%)	11 (79%)	6 (75%)	9 (82%)	82 (85%)
Ménopause					
non	14 (17%)	3 (21%)	4 (50%)	1 (9%)	17 (18%)
oui	68 (83%)	11 (79%)	4 (50%)	10 (91%)	79 (82%)
Ménarche					
précoce < 12 ans	8 (10%)	2 (14%)	1 (12%)	2 (18%)	10 (10%)
normale 12-13 ans	38 (46%)	10 (71%)	4 (50%)	8 (73%)	48 (50%)
tardive > 13 ans	36 (44%)	2 (14%)	3 (38%)	1 (9%)	38 (40%)
Nombre d'enfants					
0	8 (10%)	1 (7%)	1 (12%)	1 (9%)	9 (9%)
1	21 (26%)	2 (14%)	4 (50%)	1 (9%)	23 (24%)
2	24 (29%)	5 (36%)	2 (26%)	4 (36%)	29 (30%)
3	20 (24%)	5 (36%)	1 (12%)	4 (36%)	25 (26%)
≥ 4	9 (11%)	1 (7%)	0 (0%)	1 (9%)	10 (11%)
THS					
non	68 (83%)	11 (79%)	7 (64%)	8 (73%)	79 (81%)
< 5 ans	7 (10%)	1 (7%)	1 (12%)	1 (9%)	8 (9%)
≥ 5 ans	7 (7%)	2 (14%)	0 (0%)	2 (18%)	9 (10%)
Antécédents familiaux de cancer du sein					
aucun	48 (59%)	5 (36%)	5 (63%)	3 (27%)	53 (55%)
Au moins 1 proche (mère, sœur, fille)	15 (18%)	7 (50%)	2 (25%)	6 (55%)	22 (23%)
Au moins 1 proche (cousine, tante…)	19 (23%)	2 (14%)	1 (12%)	2 (18%)	21 (22%)
Métastases					
aucune	65 (79%)	11 (79%)	5 (63%)	10 (91%)	76 (79%)
probable	16 (20%)	3 (21%)	2 (25%)	1 (9%)	19 (21%)
certaine	1 (1%)	0 (0%)	1 (12%)	0 (0%)	1 (1%)

Tableau 14 : Caractéristiques de la population-1

	tumeurs RE+ n=83	tumeurs RE- n=14	tumeurs HER2+ n=8	tumeurs triple négatif n=11	tumeurs toutes confondues n=97
Taille de la tumeur					
pT1c	40 (48%)	9 (64%)	2 (25%)	7 (64%)	49 (51%)
pT2	37 (45%)	5 (36%)	6 (75%)	4 (36%)	42 (43%)
pT3	6 (7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (6%)
SBR					
1	18 (22%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (18%)
2	40 (48%)	1 (7%)	1 (12%)	1 (9%)	41 (43%)
3	25 (30%)	13 (93%)	7 (88%)	10 (91%)	38 (39%)
SBRM					
1	14 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	14 (14%)
2	28 (34%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	28 (29%)
3	18 (22%)	1 (7%)	1 (12%)	1 (9%)	19 (20%)
4	14 (17%)	8 (57%)	3 (38%)	4 (36%)	22 (22%)
5	9 (11%)	5 (36%)	4 (50%)	6 (55%)	14 (14%)
Type Tumoral					
CCI	66 (80%)	14 (100%)	8 (100%)	11 (100%)	80 (82%)
CI tubuleux	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (2%)
C papillaire	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)
CCI + CLI	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)
CLI	13 (15%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (14%)
Récepteurs Hormonaux					
RP-	18 (22%)	14 (100%)	6 (75%)	11 (100%)	32 (33%)
RP +	65 (78%)	0 (0%)	2 (25%)	0 (0%)	65 (67%)
RE-	0 (0%)	14 (100%)	3 (38%)	11 (100%)	14 (18%)
RE +	83 (100%)	0 (0%)	5 (62%)	0 (0%)	83 (82%)
Statut HER2					
HER2-	78 (94%)	11 (79%)	0 (0%)	11 (100%)	89 (92%)
HER2+	5 (6%)	3 (21%)	8 (100%)	0 (0%)	8 (8%)
Ki67					
≤ 15%	44 (53%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	44 (45%)
> 15 % et < 30%	22 (27%)	2 (14%)	1 (12%)	2 (9%)	24 (25%)
≥ 30 %	17 (20%)	12 (86%)	7 (88%)	9 (91%)	29 (30%)

Tableau 15 : Caractéristiques de la population-2

	tumeurs RE+ n=83	tumeurs RE- n=14	tumeurs HER2+ n=8	tumeurs triple négatif n=11	toutes confondues n=97
CA-15.3					
< 30 U/ml	68 (82%)	12 (86%)	7 (88%)	10 (91%)	80 (82%)
≥ 30 U/ml	15 (18%)	2 (14%)	1 (12%)	1 (9%)	17 (18%)
uPA					
< 3 ng/mg de protéines	61 (73%)	7 (50%)	3 (38%)	5 (45%)	68 (70%)
≥ 3 ng/mg de protéines	22 (37%)	7 (50%)	5 (62%)	6 (55%)	29 (30%)
PAI-1					
< 14 ng/mg de protéines	50 (60%)	4 (29%)	4 (50%)	2 (18%)	54 (56%)
≥ 14 ng/mg de protéines	33 (40%)	10 (71%)	4 (50%)	9 (82%)	43 (44%)
Angio-invasion					
aucune	72 (87%)	12 (86%)	5 (63%)	10 (91%)	84 (87%)
rares	3 (4%)	0 (0%)	1 (12%)	0 (0%)	3 (3%)
multiples	8 (9%)	2 (14%)	2 (25%)	1 (9%)	10 (10%)
Ganglions envahis					
N-	45 (54%)	9 (64%)	4 (50%)	2 (9%)	54 (56%)
N+ (micrométastases)	6 (7%)	1 (7%)	1 (12%)	1 (18%)	7 (7%)
N+	32 (39%)	4 (29%)	3 (38%)	8 (73%)	36 (37%)
TFF1					
0	48 (58%)	14 (0%)	4 (50%)	11 (100%)	62 (64%)
+	17 (20%)	0 (0%)	2 (25%)	0 (0%)	17 (18%)
++	8 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (8%)
+++	10 (12%)	0 (0%)	2 (25%)	0 (0%)	10 (10%)
TFF1positif (total)	**35 (42%)**	**0 (0%)**	**4 (50%)**	**0 (0%)**	**35 (36%)**
TFF3					
0	67 (81%)	14 (100%)	7 (88%)	11 (100%)	81 (84%)
+	7 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (7%)
++	3 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (3%)
+++	6 (7%)	0 (0%)	1 (12%)	0 (0%)	6 (6%)
TFF3 positif (total)	**16 (19%)**	**0 (0%)**	**1 (12%)**	**0 (0%)**	**16 (16,5%)**

Tableau 16 : Caractéristiques de la population-3

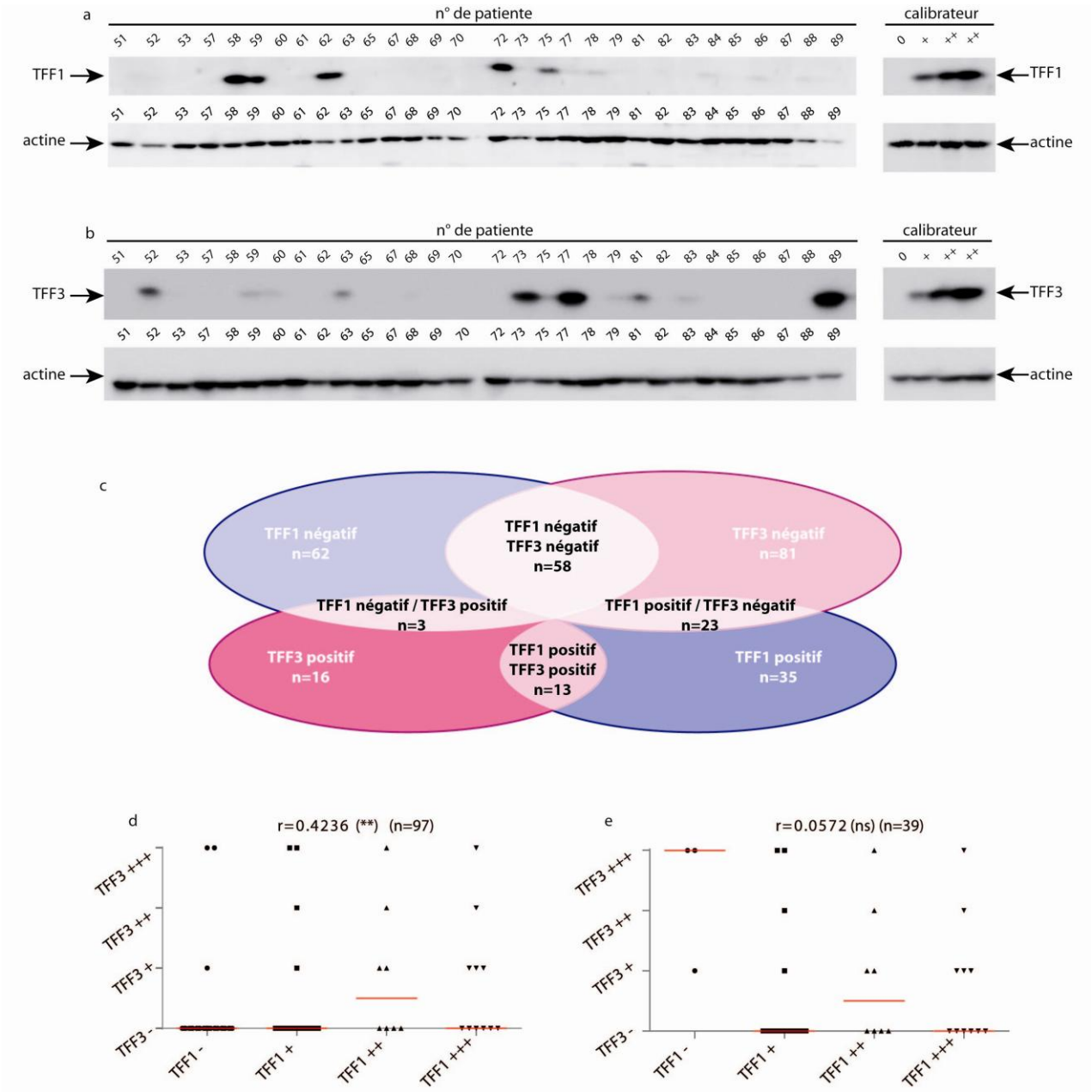

Figure 23 : TFF1 et TFF3 ne sont pas nécessairement co-exprimés dans les tumeurs du sein.

La présence des protéines TFF1 et TFF3 dans les extraits protéiques tumoraux a été analysée par WB au cours de plus de 3 expériences indépendantes pour chaque protéine. L'expression des protéines d'intérêt a été quantifiée puis normalisée sur l'expression de l'actine. Un immunoscore représentatif de l'expression de la protéine d'intérêt a été attribué à partir du calibrateur (- : négatif ; + : faible, ++ : moyen ; +++ : fort) à chaque extrait tumoral. Un immunoblot montre l'expression de TFF1 en (**a**) et de TFF3 en (**b**) dans 30 tumeurs primitives mammaires représentatives de notre panel. En (**c**), un schéma représente les sous-populations. Les sous-groupes TFF1et TFF3 négatifs sont en bleu et rose clair, et les sous groupes TFF1 et TFF3 positifs en bleu et rose foncé. L'association entre l'expression de TFF1 et celle de TFF3 a été testée en (**d**) par le coefficient de corrélation de Spearman parmi les 97 tumeurs de notre panel. De même, l'association entre TFF1 et TFF3 a été testée par le coefficient de corrélation de Spearman parmi 39 tumeurs TFF1 simple positives, TFF3 simple positives ou TFF1/TFF3 double positives (**e**). Les barres rouges horizontales correspondent aux médianes.

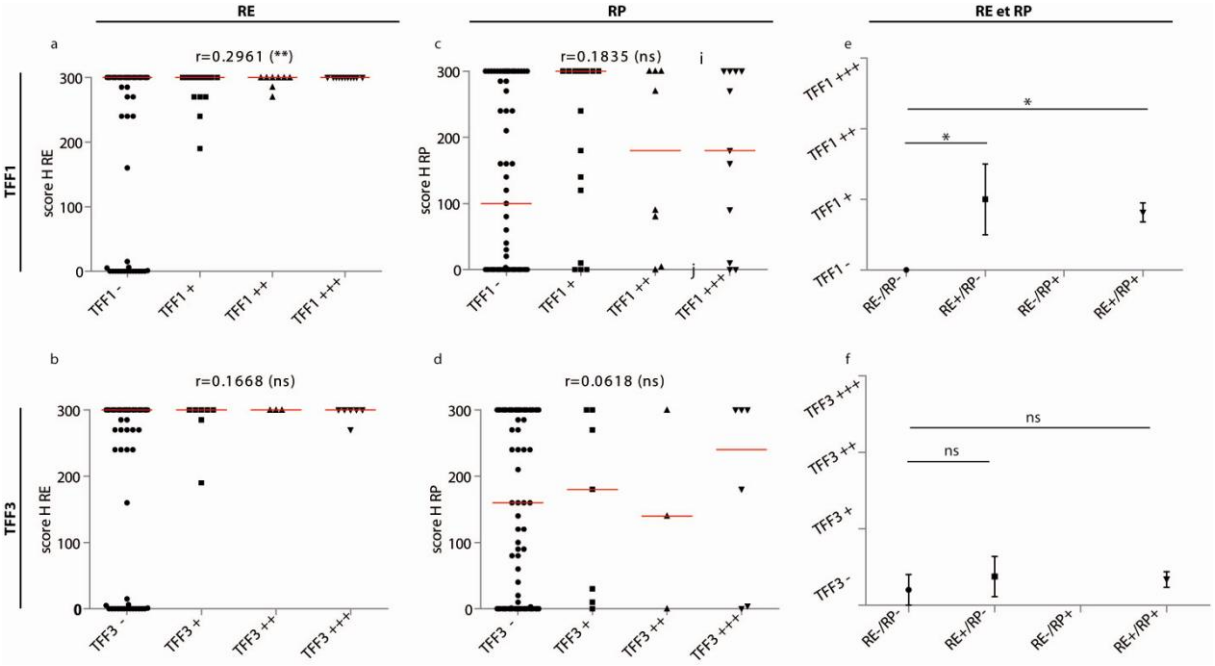

Figure 24 : L'expression de TFF1 est corrélée à l'expression du RE.

L'association entre l'expression de TFF1 et du RE (**a**), de TFF3 et du RE (**b**), de TFF1 et du RP (**c**) et de TFF3 et du RP (**d**) a été étudiée grâce au coefficient de corrélation de Spearman parmi les 97 tumeurs de notre panel. Le score H permet d'évaluer l'expression du RE et du RP sur coupes de tissu tumoral. Il prend en compte le pourcentage de cellules marquées en IHC et l'intensité du signal. Le score va de 0 à 300, avec un seuil de positivité fixé à 10. Les barres horizontales rouges correspondent aux médianes. En (**e**) et en (**f**) l'expression de TFF1 et de TFF3 a été comparée entre les groupes de tumeurs RE-/RP-, RE+/RP-, RE-/RP+, RE+/RP+ par une analyse de la variance non-paramétrique de Kruskal-Wallis suivie de tests de comparaison multiples de Dunn. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type.

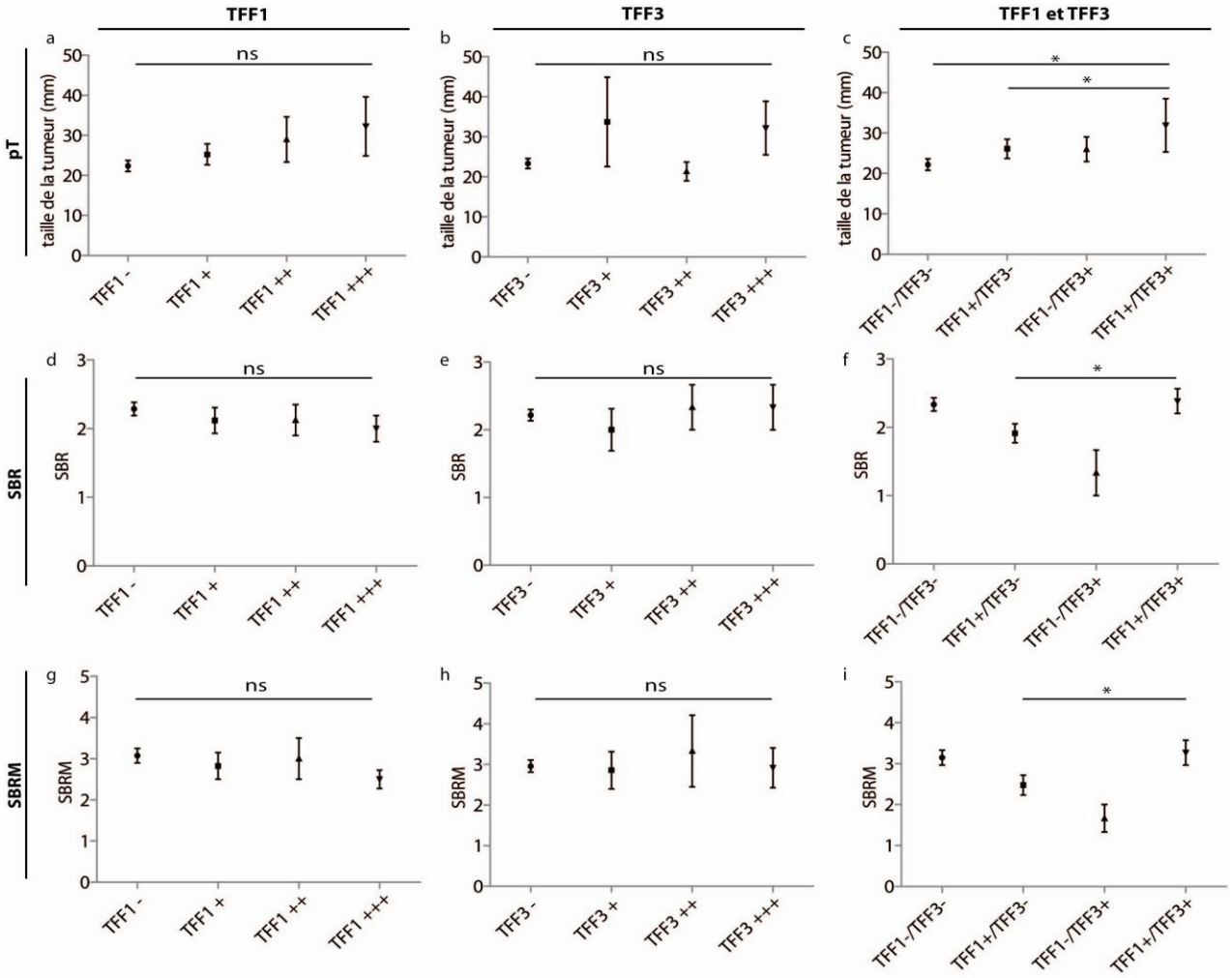

Figure 25 : Association entre l'expression des TFFs et des critères histologiques.

La taille moyenne des tumeurs a été comparée entre les groupes TFF1-, TFF1+, TFF1++, TFF1+++ (**a**), les groupes TFF3-, TFF3+, TFF3++, TFF3+++ (**b**), et les groupes TFF1-/TFF3-, TFF1+/TFF3-, TFF1-/TFF3+, TFF1+/TFF3+ (**c**) par une analyse de la variance non-paramétrique de Kruskal-Wallis, suivie de tests de comparaison multiples de Dunn. Le grade SBR moyen (**d**, **e** et **f**), et le grade SBRM moyen (**g**, **h** et **i**) ont été comparés entre ces mêmes groupes. La taille initiale de la tumeur est un critère pronostique important. Le grade SBR évalue le degré de différenciation des tumeurs en tenant compte de la proportion de glandes ou de tubes, du degré d'atypie nucléaire et du nombre de mitoses. Le grade SBRM ne prend en compte que le degré d'atypie nucléaire et le nombre de mitoses. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type.

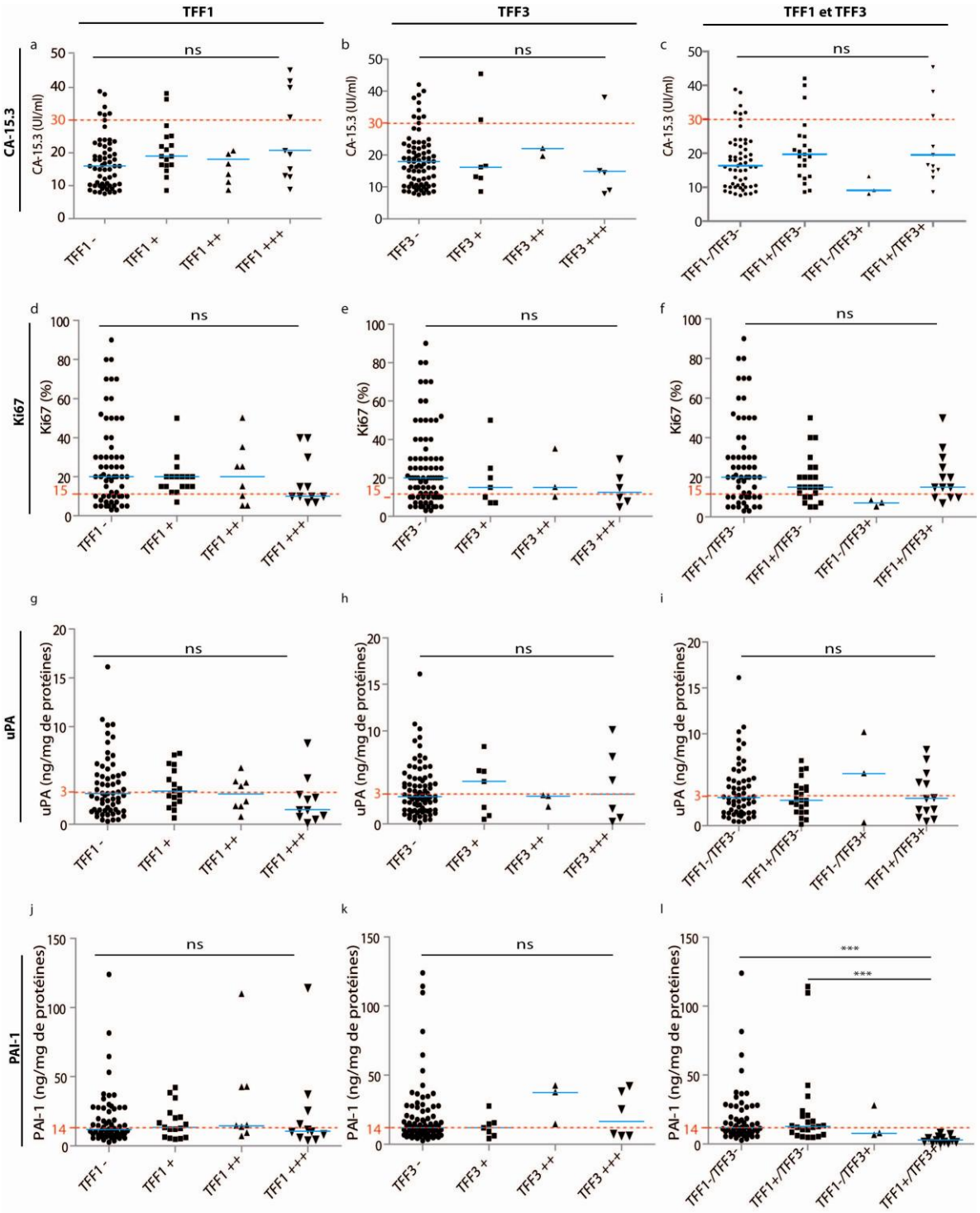

Figure 26 : Association entre l'expression des TFFs et des marqueurs biologiques.

Les concentrations moyennes de CA-15.3 ont été comparées entre les groupes TFF1-, TFF1+, TFF1++, TFF1+++ (**a**), les groupes TFF3-, TFF3+, TFF3++, TFF3+++ (**b**), et les groupes TFF1-/TFF3-, TFF1+/TFF3-, TFF1-/TFF3+, TFF1+/TFF3+ (**c**) par une analyse de la variance non-paramétrique de Kruskal-Wallis, suivie de tests de comparaison multiples de Dunn. Les pourcentages moyens intra-tumoraux de l'antigène Ki67 (**d**, **e** et **f**), les concentrations intra-tumorales de uPA (**g**, **h** et **i**) et de PAI-1 (**j**, **k** et **l**) ont été comparées entre ces mêmes groupes. Les barres horizontales bleues correspondent aux médianes et les lignes en pointillés rouge correspondent aux seuils de positivité.

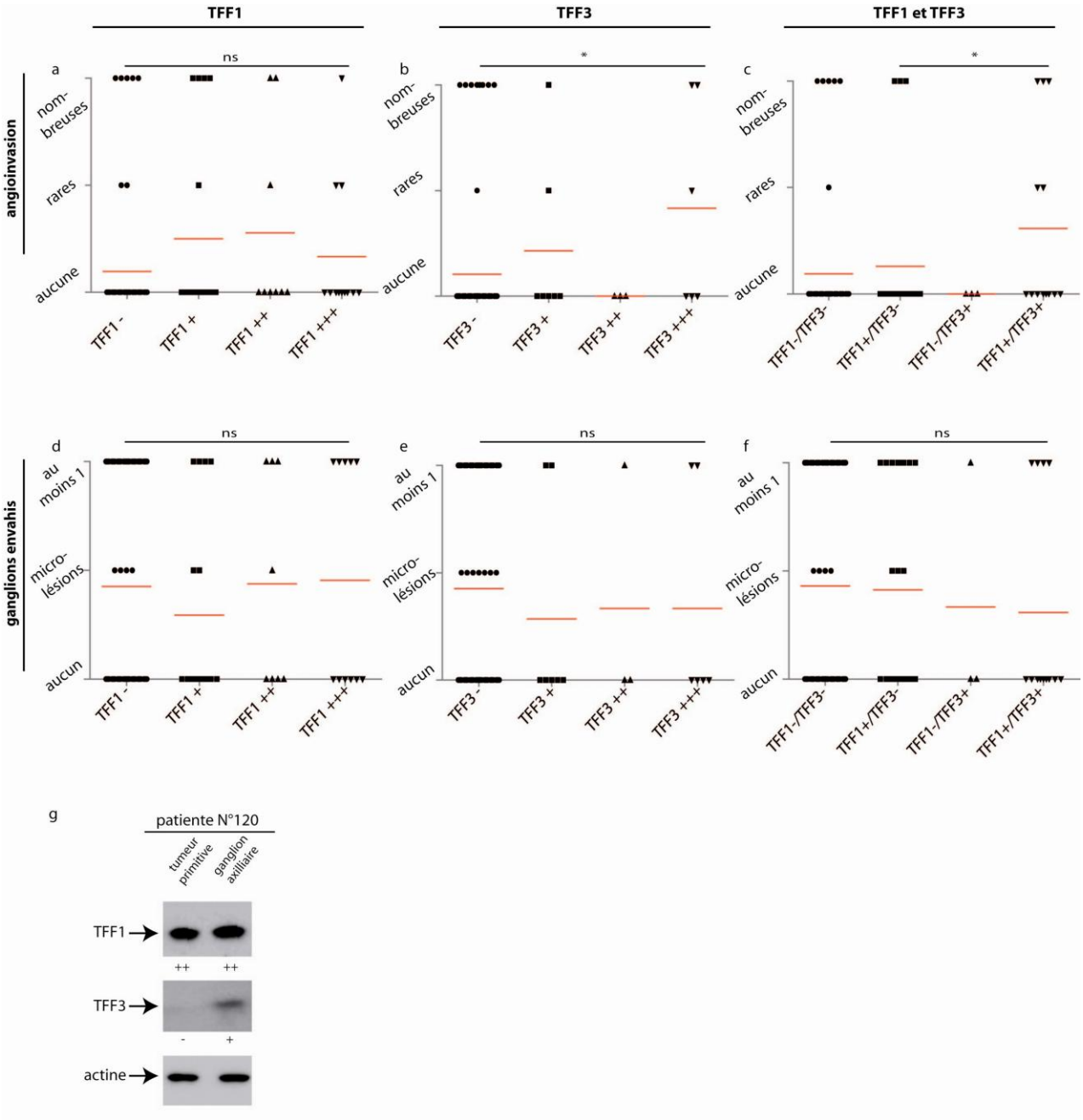

Figure 27 : Association entre les TFFs et l'invasion

On parle d'angio-invasion lorsque les vaisseaux sanguins et/ou les vaisseaux lymphatiques de la pièce opératoire sont envahis par des cellules cancéreuses (aucune, quelques, ou plusieurs). Le degré moyen d'angioinvasion a été comparé entre les groupes TFF1-, TFF1+, TFF1++, TFF1+++ (**a**), les groupes TFF3-, TFF3+, TFF3++, TFF3+++ (**b**), et les groupes TFF1-/TFF3-, TFF1+/TFF3-, TFF1-/TFF3+, TFF1+/TFF3+ (**c**) par une analyse de la variance non-paramétrique de Kruskal-Wallis, suivie de tests de comparaison multiples de Dunn. De même, l'invasion ganglionnaire a été comparée entre ces mêmes groupes (**d**, **e** et **f**). Les barres horizontales rouges correspondent aux médianes. En (**g**), la présence de TFF1 et de TFF3 a été recherchée par WB dans la tumeur primitive et le ganglion axillaire correspondant envahi d'une même patiente. La tumeur primitive est TFF1++/TFF3- tandis que le ganglion envahi est TFF1++/TFF3+.

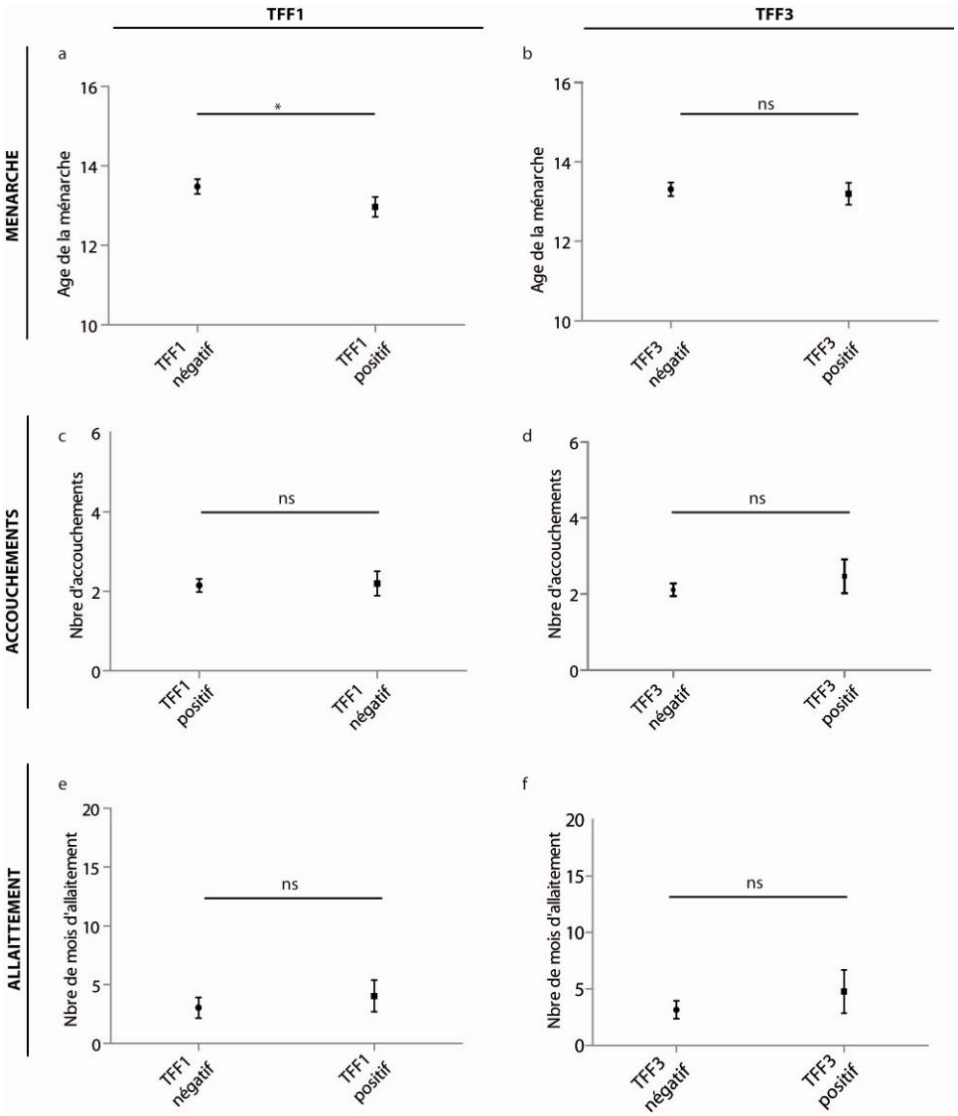

Figure 28 : Association entre les TFFs et la ménarche, le nombre d'accouchements et l'allaitement.

L'âge des premières règles a été comparé entre les groupes de patientes ayant des tumeurs négatives ou positives pour TFF1 (**a**) et négative ou positive pour TFF3 (**b**) par un test de Student. Le nombre d'accouchements et le nombre de mois d'allaitements ont été comparés par un test de Mann-Withney entre les groupes de patientes ayant des tumeurs négatives ou positives pour TFF1 (**c** et **e**) et négative ou positive pour TFF3 (**d** et **f**). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type.

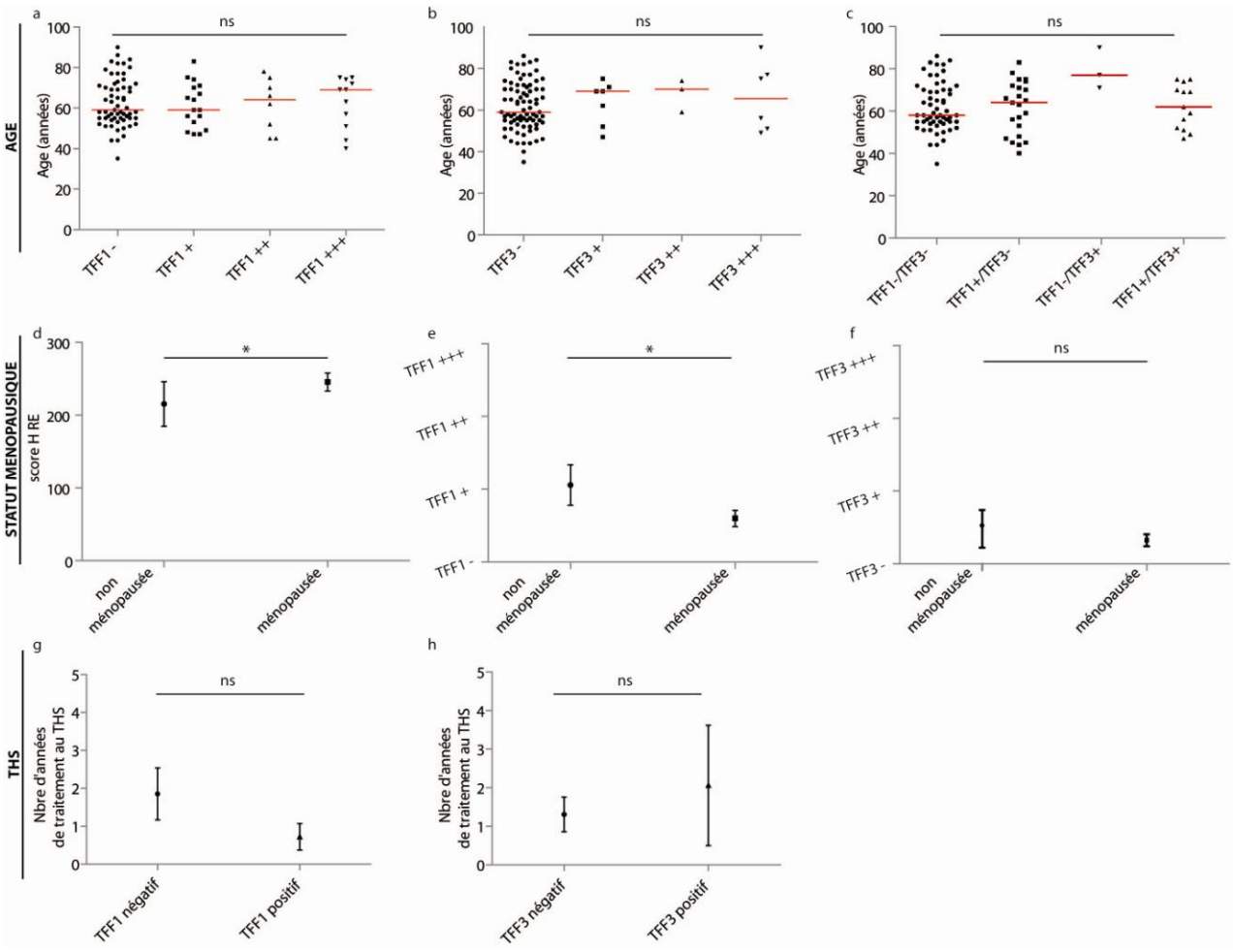

Figure 29 : Association entre les TFFs et l'âge de la patiente, le statut ménopausique et le Traitement Hormonal Substitutif (THS).

L'âge moyen de diagnostic a été comparé entre les groupes TFF1-, TFF1+, TFF1++, TFF1+++ (**a**), les groupes TFF3-, TFF3+, TFF3++, TFF3+++ (**b**), et les groupes TFF1-/TFF3-, TFF1+/TFF3-, TFF1-/TFF3+, TFF1+/TFF3+ (**c**) par une ANOVA, suivie de tests de comparaison multiples de Tuckey. L'expression du RE (**d**), de TFF1 (**e**) et de TFF3 (**f**) a été comparée entre les groupes de tumeurs de patientes ménopausées et de patientes non ménopausées par un test de Mann-Withney. Le nombre d'années de THS a été comparé entre les patientes ayant des tumeurs TFF1 négatif et les patientes ayant des tumeurs TFF1 positives (**g**) et les patientes ayant des tumeurs TFF3 négatif et les patientes ayant des tumeurs TFF3 positives (**h**). Les barres horizontales rouges correspondent aux médianes. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type.