



**UNIVERSITE DE LORRAINE  
2014**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**MEMOIRE  
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
d'Innovation Pharmaceutique et Recherche**

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 17 Octobre 2014

par Maëva Lion  
née le 25 Mars 1982

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE  
pour le DIPLOME D'ETAT  
de DOCTEUR en PHARMACIE**

**Étude de nouveaux biomarqueurs tumoraux et détermination  
de leurs impacts sur la réponse aux thérapies ciblées dans le  
traitement du cancer du sein**

Membres du Jury

Président :	M. le Professeur Jean-Louis MERLIN	PU-PH, Nancy
Juges :	M. le Docteur Laurent ARNOULD	PH, Dijon
	M. le Docteur Joseph CICCOLINI	MCU, Marseille
	M. le Docteur Alexandre HARLÉ	AHU, Nancy
	Mme le Docteur Véronique NOIREZ	PH, Metz-Thionville

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2013-2014**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Président de la Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Président de la Commission Prospective Facultaire**

Jean-Yves JOUZEAU

**Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement**

**Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

**Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Raphaël DUVAL/Bertrand RIHN

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

<b>ENSEIGNANTS</b>	<i>Section CNU*</i>	<i>Discipline d'enseignement</i>
<b>PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS</b>		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU		
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
<b>PROFESSEURS DES UNIVERSITES</b>		
Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL ☒	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Max HENRY	87	<i>Botanique, Mycologie</i>
Pierre LABRUDE	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>
<b>MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS</b>		
Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN ☒	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA ☒		
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>
<b>MAITRES DE CONFÉRENCES</b>		
Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT ☒	87	<i>Biologie générale, Biochimie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>

<b>ENSEIGNANTS (suite)</b>	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Environnement et Santé
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE ☿	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
<b>PROFESSEUR ASSOCIE</b>		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
<b>PROFESSEUR AGREGE</b>		
Christophe COCHAUD	11	Anglais

☿ En attente de nomination

*\*Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**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 jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS  
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT  
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR  
AUTEUR ».

# REMERCIEMENTS

**A Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin,**

*Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire pendant ces trois années, mais aussi pour vos conseils, votre disponibilité et le soutien dont vous avez fait preuve tout au long de ce travail. Veuillez trouver ici, Monsieur, l'assurance de mon profond respect ainsi que toute ma reconnaissance.*

**A Madame le Docteur Véronique Noirez,**

*Je vous remercie pour votre présence au sein de ce jury et pour l'intérêt que vous portez à mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

**A Monsieur le Docteur Laurent Arnould,**

*C'est un grand honneur pour moi de vous compter parmi les membres de mon jury. Je vous suis reconnaissante pour le regard expert et critique que vous pourrez porter sur ce travail.*

**A Monsieur le Docteur Joseph Ciccolini,**

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

**A Alexandre,**

*Merci de m'avoir toujours soutenue dans le travail et pour ton aide inconditionnelle. Sans toi je n'aurais pas accompli autant de choses. Merci de croire en moi.*

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

*Merci infiniment à toutes d'avoir été là pour moi au cours de ces trois années passées à l'UBT, merci pour votre aide dans le travail et votre soutien dans les moments difficiles. Sans vous rien n'aurait été possible. Merci pour tous ces bons moments passés en votre compagnie. Vous allez vraiment me manquer. Bonne continuation à toutes. Je vous souhaite le meilleur pour la suite!*

**A mes parents,**

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

**A mon frère,**

*Merci pour ton amour et ton soutien de toujours.*

**A mes grands-mères,**

*Merci pour votre amour, et pour avoir toujours cru en moi.*

**A mes amis de Marseille, et tout particulièrement à Claire, Julien, Seb, Ben, Alice, et ma petite Manu,**

*Merci pour ces moments inoubliables passés à vos côtés pendant toutes ces années. Et merci d'avoir toujours été là pour moi et ce malgré la distance pendant ces quatre dernières années.*

**A mes amies de Nancy, Charlotte et Clara,**

*Merci d'avoir été là pour moi pendant ces quatre ans passés loin de mes proches. Merci pour votre soutien et votre amitié, et pour tous ces bons moments passés en votre compagnie. Je ne vous oublierai pas.*

# SOMMAIRE

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>10</b>
<b>PARTIE I: INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>12</b>
<b>I. Cancer du sein - épidémiologie .....</b>	<b>13</b>
<b>II. Hétérogénéité du cancer du sein .....</b>	<b>13</b>
II.1. Classification histologique.....	13
II.2. Classification moléculaire.....	14
II.2.1. Les tumeurs lumineales .....	16
II.2.1.1. Les tumeurs lumineales de type A .....	16
II.2.1.2. Les tumeurs lumineales de type B.....	16
II.2.2. Les tumeurs basal-like .....	17
II.2.3. Les tumeurs triple-négatives .....	17
II.2.4. Les tumeurs HER2+.....	18
II.3. Le grade histopronostique SBR (EE).....	20
II.4. La classification TNM .....	21
<b>III. Métastases et cancer du sein .....</b>	<b>21</b>
<b>IV. Facteurs de risques du cancer du sein .....</b>	<b>22</b>
<b>V. Signalisation cellulaire et cancer du sein.....</b>	<b>22</b>
V.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase .....	22
V.2. Les récepteurs HER .....	23
V.3. Les principales voies de signalisation impliquées en oncologie mammaire: les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase.....	27
V.3.1. La voie PI3K/AKT/mTOR .....	27
V.3.1.1. Mécanisme d'activation des PI3K de classe I en aval des récepteurs à activité Tyrosine Kinase.....	28
V.3.1.2. Voie de signalisation PI3Kinase et PTEN(Phosphatase and tensing homolog)29	
V.3.1.3. Mutations du gène <i>PIK3CA</i> dans les cancers du sein .....	30

V.3.2. La voie RAS/RAF/MAPKinase.....	33
V.3.2.1. La P38MAPKinase.....	34
<b>VI. Stratégie thérapeutique pour la prise en charge du cancer du sein.....</b>	<b>36</b>
VI.1. Hormonothérapie et Thérapies ciblées.....	36
VI.1.1. L'hormonothérapie.....	36
VI.1.1.1. Les anti-œstrogènes.....	37
VI.1.1.2. Les inhibiteurs de l'aromatase.....	38
VI.1.2. Les thérapies ciblées.....	41
VI.1.2.1. Les anticorps monoclonaux.....	41
VI.1.2.1.2. Trastuzumab (HERCEPTIN®).....	42
VI.1.2.1.3. Pertuzumab (PERJETA®).....	45
VI.1.2.1.4. Bevacizumab (AVASTIN®).....	46
VI.1.2.1.5. T-DM1: trastuzumab emtansine (KADCYLA®).....	48
VI.1.2.3. Les inhibiteurs de kinase.....	50
VI.1.2.3.1. Lapatinib (TYVERB®).....	50
VI.1.2.3.2. Everolimus (AFINITOR®).....	52
<b>VII. Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées.....</b>	<b>54</b>
VII.1. Trastuzumab.....	54
VII.2. Lapatinib.....	55
VII.3. Anti-œstrogènes.....	56
<b>VIII. Biomarqueurs moléculaires et cancer du sein.....</b>	<b>57</b>
<b>PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>58</b>
<b>I. Objectifs de l'étude.....</b>	<b>59</b>
<b>II. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>59</b>
II.1. Détermination du statut mutationnel du gène <i>PIK3CA</i> par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	59
II.1.1. Patients.....	59
II.1.2. Qualification des prélèvements.....	59
II.1.3. Extraction d'ADN.....	61
II.1.4. Dosage d'ADN.....	61
II.1.5. Dilution des échantillons.....	62

II.1.6. La PCR-HRM .....	63
II.1.7. La PCR-ARMS Scorpion.....	65
II.1.8. Interprétation statistique des résultats .....	67
II.2. Étude du niveau d'expression des phosphoprotéines des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase .....	68
II.2.1. Patients.....	68
II.2.2. Extraction des protéines.....	68
II.2.3. Technique d'analyse BPA.....	69
II.2.4. Analyse des résultats.....	70
<b>III. Résultats.....</b>	<b>71</b>
III.1. Résultats de l'étude des mutations du gène <i>PIK3CA</i> .....	71
III.1.1. Détermination du statut mutationnel du gène <i>PIK3CA</i> avec deux techniques de PCR temps réel.....	71
III.1.2. Étude des paramètres clinico-biologiques des tumeurs.....	74
III.1.2.1. Relation entre le statut mutationnel du gène <i>PIK3CA</i> déterminé par PCR- HRM et les caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des tumeurs .....	74
III.1.2.2. Relation entre le statut mutationnel du gène <i>PIK3CA</i> déterminé par PCR- ARMS et les caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des tumeurs..	76
III.2. Résultats de l'étude du niveau d'expression des phosphoprotéines des voies PI3Kinase et MAPKinase .....	78
III.2.1. Recueil des caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs.....	78
III.2.2. Corrélation entre le niveau d'expression des phosphoprotéines et les caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs .....	79
<b>IV. Discussion.....</b>	<b>83</b>
IV.1. Statut mutationnel du gène <i>PIK3CA</i> .....	83
IV.2. Expression des phosphoprotéines des voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase.....	88
<b>V. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>92</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>110</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1:</b> La structure du sein en coupe sagittale .....	14
<b>Figure 2:</b> Profil d'expression génique d'échantillons de carcinomes mammaires .....	15
<b>Figure 3:</b> Spectre des carcinomes triple-négatifs. ....	18
<b>Figure 4:</b> Les récepteurs à activité Tyrosine Kinase .....	23
<b>Figure 5:</b> Les récepteurs HER. ....	24
<b>Figure 6:</b> Structure des récepteurs HER.....	25
<b>Figure 7:</b> Transduction du signal à partir des récepteurs HER .....	26
<b>Figure 8:</b> Les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase.....	27
<b>Figure 9:</b> Activités catalytiques de PI3K et PTEN.....	29
<b>Figure 10:</b> La voie PI3Kinase .....	30
<b>Figure 11:</b> Schéma du gène <i>PIK3CA</i> .....	31
<b>Figure 12:</b> Répartition des différentes mutations de <i>PIK3CA</i> dans les cancers du sein .....	32
<b>Figure 13:</b> La voie de signalisation des MAPKinases .....	35
<b>Figure 14:</b> Mécanismes d'action des anti-œstrogènes et des inhibiteurs de l'aromatase .....	40
<b>Figure 15:</b> Structure d'un Anticorps Monoclonal de type IgG.....	41
<b>Figure 16:</b> Mécanismes d'action du trastuzumab. ....	43
<b>Figure 17:</b> Sites de fixation du trastuzumab et du pertuzumab .....	46
<b>Figure 18:</b> Mécanisme d'action du Bévacicumab .....	47
<b>Figure 19:</b> T-DM1: Trastuzumab couplé à un agent cytotoxique.....	49
<b>Figure 20:</b> Mécanisme d'action du T-DM1 .....	49
<b>Figure 21:</b> Mécanisme d'action du Lapatinib .....	51
<b>Figure 22:</b> Mécanisme d'action de l'évérolimus.....	52
<b>Figure 23:</b> Schéma récapitulatif des mécanismes d'action des thérapies ciblées .....	54
<b>Figure 24:</b> Qualification du prélèvement et macrodissection de la tumeur. ....	60
<b>Figure 25:</b> Les différentes étapes de l'analyse des échantillons de tumeurs. ....	62
<b>Figure 26:</b> Principe de la PCR-HRM .....	64
<b>Figure 27:</b> Schéma d'une amorce Scorpion.....	65
<b>Figure 28:</b> Principe de la PCR-ARMS Scorpion.....	66
<b>Figure 29:</b> Les différentes étapes de l'analyse par technique BPA .....	70
<b>Figure 30:</b> Profils des courbes de fusion obtenues par PCR-HRM.....	72
<b>Figure 31:</b> Profil des courbes d'amplification obtenues par PCR-ARMS.....	73
<b>Figure 32:</b> Expression de P38MAPK et de p-P38MAPK en fonction du type de tumeurs ....	80
<b>Figure 33:</b> Niveau d'expression de p-AKT en fonction du statut HER2 des tumeurs.....	81
<b>Figure 34:</b> Niveau d'expression de p-ERK en fonction du grade SBR des tumeurs. ....	82

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Récapitulatif des caractéristiques des principaux sous-types moléculaires. ....	19
<b>Tableau II:</b> Le grade SBR modifié par Elston et Ellis.....	20
<b>Tableau III:</b> Hormonothérapie en fonction du statut ménopausal des femmes atteintes d'un cancer du sein hormonodépendant .....	40
<b>Tableau IV:</b> Mutations du gène <i>PIK3CA</i> détectées par PCR-HRM et PCR-ARMS .....	71
<b>Tableau V:</b> Concordance des mutations détectées par les 2 techniques de PCR temps réel ..	74
<b>Tableau VI:</b> Corrélation entre le statut mutationnel du gène <i>PIK3CA</i> déterminé par PCR-HRM et les caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des tumeurs .....	75
<b>Tableau VII:</b> Corrélation entre le statut mutationnel du gène <i>PIK3CA</i> déterminé par PCR-ARMS et les caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des tumeurs .....	77
<b>Tableau VIII:</b> Caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs de sein infiltrantes canalaire.....	78

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ac: Anticorps

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

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AFA: Alcool, Formol, Acide acétique

AFAQAP: Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologique

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

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché

AR: Amphiréguline

ARN: Acide RiboNucléique

ATP: Adénosine Triphosphate

BPA: Bioplex Protein Array

BRCA 1 et 2: Breast Cancer 1 et 2

BTC: Beta-cellulose

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

CK: Cytokératine

DNA: DeoxyriboNucleic Acid

dNTP: desoxyribonucléotide triphosphate

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPR: Epiréguline

ERE: Estrogen Responsive Element

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

Fab: Fragment antibody binding

FDA: Food and Drugs Administration

FFPE: Formalin Fixed Paraffin Embedded

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor (Récepteur aux facteurs de croissance des fibroblastes)

FKBP-12: FK506-binding protein 12

FLT-1: FMS-Like Tyrosine kinase-1

FOXA1: Forkhead box A1  
FOXO3a: Forkhead box class O 3a  
GATA3: GATA binding protein 3  
Grb2: Growth Factor Receptor-Binding Protein 2  
GSK3b: Glycogene synthase kinase 3 $\beta$   
HB-EGF: Heparin Binding- Epidermal Growth Factor  
HER: Human Epidermal Growth Factor Receptor (Récepteur du facteur de croissance épidermique humain)  
HES: Hématoxyline-Eosine-Safran  
IA: Inhibiteurs de l'aromatase  
Ig: Immunoglobuline  
IGF1: Insulin Growth Factor 1  
IHC: Immunohistochimie  
ICL: Institut de Cancérologie de Lorraine  
INCa: Institut National du Cancer  
IR: Insulin Receptor (Récepteur à l'Insuline)  
ITK: Inhibiteur de Tyrosine Kinase  
IV: Intraveineuse  
kDa: KiloDalton  
KDR: Kinase insert Domain protein Receptor  
MAP: Mitogen-Activated Protein  
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase  
MEK: Mitogen-activated Extracellular signal regulated Kinase-activating kinase  
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin  
MUC4: Membrane-associated glycoprotein mucin  
NK: Natural Killer  
NRGs: Neurorégulines  
OS: Overall Survival  
P38MAPK: P38 Mitogen Activated Protein Kinase  
P70S6K: P70 ribosomal protein S6 Kinase  
pAKT: phospho-AKT  
PCR: Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)  
PCR-HRM: PCR- High Resolution Melting  
PCR-ARMS-Scorpions: PCR-Amplification Refractory Mutational System

PDGFR: Plateled Derivated Growth Factor Receptor (Récepteur aux facteurs de croissance des plaquettes)

PE: Phycoérythrine

p-EGFR: phospho-EGFR

p-ERK1/2: phospho-ERK 1/2

p-MEK: phospho-MEK

PFS: Progression Free Survival

p-GSK3 $\beta$ : phospho-GSK3 $\beta$

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase

*PIK3CA*: gène codant pour la sous-unité catalytique de PI3K

*PIK3RI*: gène codant pour la sous-unité régulatrice de PI3K

PIP: Phosphatidylinositol-3-phosphate

PIP2: Phosphatidylinositol-3, 4-diphosphate

PIP3: Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate

PMSF: Phenylmethylsulfonylfluoride

p-P38MAPK: phospho-P38MAPK

p-P70S6K: phospho-P70S6K

PTEN: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RAS: Rat Sarcoma Virus

RE: Récepteurs aux œstrogènes

RH: Récepteurs hormonaux

RNase: Ribonucléase

RP: Récepteurs à la progestérone

RTK: Récepteur à activité Tyrosine Kinase

SBR (EE): Scarff - Bloom Richardson (Elston Ellis)

SERDs: Selective Estrogen Receptor Down regulation

SERMs: Selective Estrogen Receptor Modulator

SHc: Src Homology

SH2: Src Homology 2

SKP2: S-phase Kinase associated Protein -2

SOS1: Son of sevenless homolog 1

Src: Sarcoma Virus

Taq Polymerase: *Thermus aquaticus* Polymérase

TBE: Tris, acide borique, EDTA

T-DM1: Trastuzumab entamsine

TGF $\alpha$ : Transforming Growth Factor  $\alpha$

TK: Tyrosine Kinase

TN: Tumeurs Triple-Negatives

TNM: Tumor Node Metastasis

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

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

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

## INTRODUCTION GENERALE

Malgré de considérables avancées dans la prise en charge du cancer ces dernières années, cette maladie demeure un problème majeur de santé publique.

En 2012, 355000 nouveaux cas de cancers, toutes localisations confondues, ont été recensés en France, regroupant 200000 hommes et 155000 femmes (1).

Bien que la mortalité par cancer ait régulièrement diminué ces 30 dernières années, cette maladie reste la première cause de mortalité en France et le nombre de nouveaux cas a quant à lui doublé (1).

La lutte contre le cancer constitue une des priorités du système de santé français, notamment grâce au plan cancer mis en place depuis 2003. Les enjeux principaux sont la prévention et le dépistage des cancers avec, entre autres, la mise en place de campagnes de sensibilisation (Octobre Rose pour le cancer du sein, Mars Bleu pour le cancer colorectal). Les objectifs sont également l'amélioration continue de la prise en charge des patients mais aussi le maintien d'une qualité de vie correcte au cours des traitements en minimisant les toxicités liées à des thérapeutiques agressives.

Grâce à l'apport de la biologie moléculaire ces dernières années, il a clairement été établi que le cancer était une maladie de la signalisation cellulaire. La caractérisation des principales voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse a permis l'identification de cibles moléculaires et donc le développement de thérapeutiques dirigées contre celles-ci.

L'essor des thérapies ciblées a considérablement amélioré la prise en charge des cancers et marque une évolution majeure de la thérapeutique anticancéreuse. Contrairement aux chimiothérapies conventionnelles qui sont non spécifiques, les thérapies ciblées sont dirigées contre une cible moléculaire particulière présente au niveau des cellules tumorales et détruisent alors spécifiquement celles-ci limitant la toxicité. L'arrivée de ces molécules sur le marché a permis le développement de la médecine personnalisée et a ainsi amélioré le pronostic de certains cancers.

Actuellement, il existe des tests de génétique moléculaire permettant de prescrire aux patients la bonne thérapie ciblée. On peut notamment citer l'exemple de la recherche des mutations des gènes *RAS* dans le cancer colorectal métastatique qui conditionne la prescription des traitements anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). La caractérisation moléculaire de la tumeur est donc un critère majeur, devenue indispensable pour la décision thérapeutique.

Malgré des progrès importants aussi bien thérapeutiques que technologiques, on constate dans certains cas l'apparition de résistance primaire ou secondaire aux thérapies ciblées. L'identification et la validation de nouveaux biomarqueurs moléculaires tumoraux aussi bien diagnostiques, prédictifs de réponse aux traitements, que pronostiques, sont actuellement les principaux enjeux de la recherche en oncologie.

**PARTIE I**  
**INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. Le cancer du sein – épidémiologie

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué et est la principale cause de décès par cancer chez la femme. Il représentait 25,2% du total des nouveaux cas de cancers féminins et 14,7% du total des décès dans le monde en 2012 (2). Alors qu'il reste la principale cause de décès par cancer dans les pays les moins développés (14.3% du total, 324000 décès), il est actuellement au deuxième rang des cause de décès par cancer chez la femme dans les pays développés (198000 décès, 15.4% du total) derrière le cancer du poumon. Cette différence s'explique par la précocité du diagnostic grâce aux campagnes de dépistage ainsi que par l'amélioration de la prise en charge dans les pays développés améliorant considérablement la survie en cas de cancers mammaires ces dernières années.

En France, 48 763 nouveaux cas de cancers du sein et 11 886 décès ont été recensés en 2012 (3). L'âge moyen estimé au diagnostic était de 63 ans. Le taux global de survie relative à 5 ans s'est amélioré et est supérieur à 80%. Il diminue toutefois avec l'âge et la sévérité du stade au diagnostic (3).

Le cancer du sein présente une grande hétérogénéité de forme aussi bien histologique que moléculaire avec des pronostics très différents expliquant l'intérêt de développer des thérapeutiques de plus en plus personnalisées en fonction des caractéristiques de la tumeur (4).

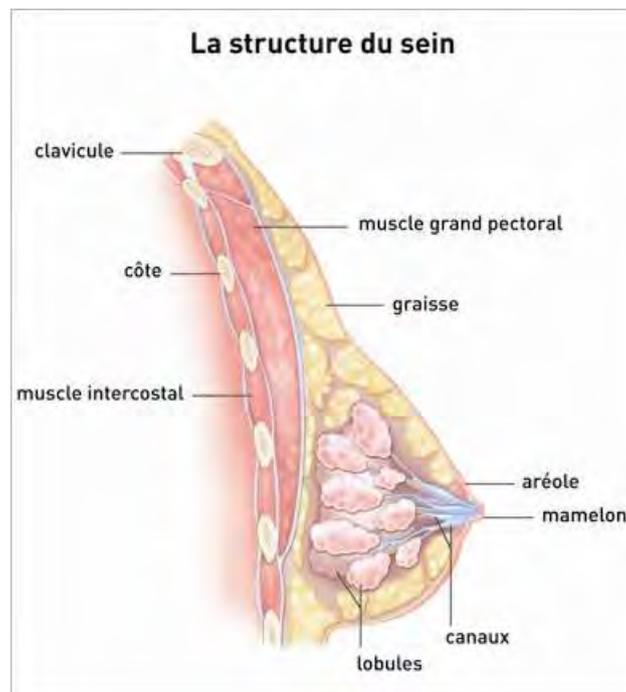
## II. Hétérogénéité du cancer du sein

### II.1. Classification histologique

La glande mammaire est constituée de tissu glandulaire, de tissu graisseux et de tissu conjonctif. Elle contient des lobules dont la fonction est de produire le lait et des canaux galactophores qui transportent le lait au mamelon. Les cancers du sein se développent initialement à partir des cellules épithéliales des canaux ou des lobules (**Figure 1**) (5, 6).

D'un point de vue histologique, on distingue les cancers canaux caractérisés par la prolifération des cellules tapissant les canaux galactophores, des cancers lobulaires qui eux se développent à partir de l'épithélium tapissant les lobules du sein.

Les cancers du sein peuvent être non invasifs, sans franchissement de la membrane basale par les cellules néoplasiques, ces cancers sont appelés cancers *in situ*, ou alors invasifs caractérisés par un franchissement de la membrane basale par les cellules tumorales, on parle alors de cancers infiltrants. Les carcinomes canauxaux infiltrants représentent 80% du total des cancers du sein contre seulement 5 à 10% de carcinomes lobulaires infiltrants (5).



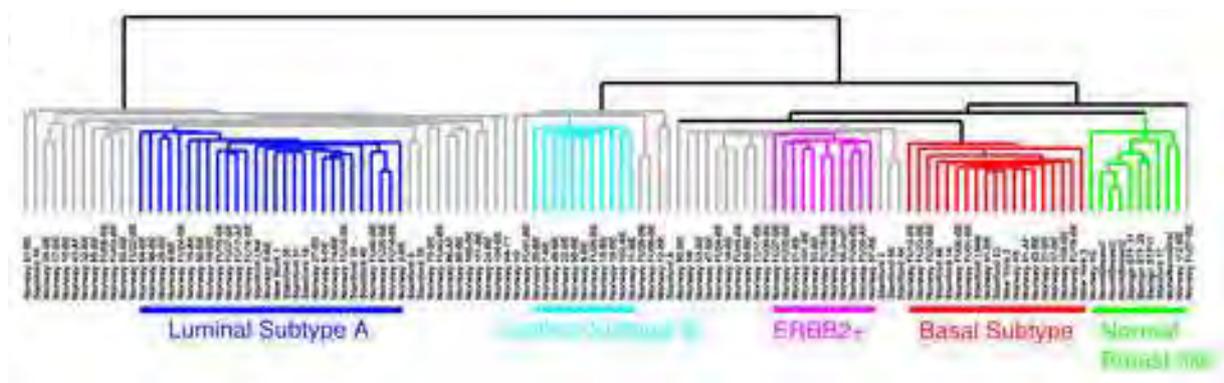
**Figure 1: La structure du sein en coupe sagittale. (D'après site internet INCa: <http://www.e-cancer.fr/>)**  
Le sein est constitué de lobules produisant le lait et de canaux galactophores assurant le transport du lait au mamelon. Les cancers du sein se développent à partir des lobules (cancers lobulaires) ou des canaux (cancers canauxaux) de la glande mammaire (6).

## II.2. Classification moléculaire

L'essor de la biologie moléculaire au cours de ces dernières années a permis d'affiner la classification des cancers du sein en mettant en évidence des caractéristiques moléculaires propres à chaque tumeur, permettant ainsi d'identifier différents sous-types moléculaires. Les tumeurs possèdent leurs propres caractéristiques moléculaires permettant de les classer en différents sous-types (7). La première classification moléculaire du cancer du sein a été proposée en 2000 par Perou *et al.* (8). Cette classification distingue 4 sous-types moléculaires basés sur le profil d'expression génique: le sous-type luminal/épithélial/récepteurs aux œstrogènes (RE) positifs, le sous-type HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) positif, le sous-type basal-like et le normal-like.

En 2001, cette classification a été précisée par Sorlié *et al.* avec une division des tumeurs lumineuses en trois sous-types A, B, C (9). L'existence du sous-type luminal C a ensuite été remis en question en 2003 pour ne garder que les sous-types lumineux A et B (**Figure 2**) (10). En 2003, Sotiriou *et al.* démontrait l'existence de 6 groupes similaires mais cette fois-ci, divisait le sous-type basal-like en 2 sous-groupes en fonction de leur profil d'expression et supprimait le groupe normal-like (11). En effet, ce groupe est actuellement controversé et est plutôt considéré par certains comme le résultat d'une contamination par un contingent cellulaire normal que comme un réel sous-type.

De nombreuses études ont été menées pour définir un panel de biomarqueurs d'intérêt aussi bien prédictifs que pronostiques afin d'améliorer la prise en charge et le suivi de la maladie mais également permettre de mieux contrôler les toxicités des traitements. Bien que de nombreuses études sur le profil d'expression génique des tumeurs et sur leur signature génomique aient été réalisées (12, 13), et que de nombreux marqueurs potentiels aient été mis en évidence, actuellement, seuls 3 marqueurs sont utilisés en routine. Il s'agit du statut hormonal, avec les récepteurs aux œstrogènes et ceux à la progestérone et le statut HER2.



**Figure 2: Profil d'expression génique d'échantillons de carcinomes mammaires. 115 échantillons de carcinomes mammaires et 7 échantillons de tissus sains.**

Le dendrogramme représente la répartition des tumeurs mammaires analysées en cinq sous-groupes. Les tumeurs lumineuses A sont représentées en bleu marine, les tumeurs lumineuses B en bleu turquoise, les tumeurs surexprimant HER2 en rose, les basal-like en rouge et enfin les normal-like en vert. Les branches grises représentent les tumeurs qui ne correspondent à aucun sous-type. D'après Sorlié *et al.*(10)

## II.2.1. Les tumeurs lumineales

Les cancers luminaux sont principalement caractérisés par une surexpression des récepteurs aux œstrogènes (14).

### II.2.1.1. Les tumeurs lumineales de type A

Ces tumeurs se développent au niveau des cellules lumineales de la glande mammaire. Les cellules lumineales expriment fortement les récepteurs hormonaux, notamment les récepteurs aux œstrogènes et peuvent également surexprimer les récepteurs à la progestérone. En revanche, elles ne surexpriment pas le récepteur HER2. Il s'agit en règle générale de tumeurs de bas grade, à faible pouvoir prolifératif (index de prolifération mitotique Ki67 inférieur à 14%). Ces tumeurs expriment les gènes régulés par les récepteurs œstrogéniques notamment GATA3 (GATA binding protein 3), FOXA1 (Forkhead box A1) et expriment des cytokératines (CK) de bas poids moléculaires telles que CK8/18 et CK19. En revanche, elles expriment peu les gènes liés à la prolifération (11, 15-19).

On retrouve rarement des mutations de P53 dans ce type de tumeur (13% des cas). Ces tumeurs représentent 60% des carcinomes et sont de pronostic favorable. Il s'agit pour la plupart de carcinomes mucineux, lobulaires ou canauxaires de grade I/II.

### II.2.1.2. Les tumeurs lumineales de type B

Il s'agit également de tumeurs développées à partir des cellules lumineales, mais qui expriment plus faiblement les récepteurs œstrogéniques que les tumeurs lumineales de type A. Elles sont divisées en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe ne surexprime pas le récepteur HER2, et est caractérisé par un pouvoir prolifératif important et donc un Ki67 élevé. Le second sous-groupe quant à lui, surexprime HER2, quelque soit la valeur du Ki67. Cette surexpression de HER2 est retrouvée chez 30% des tumeurs lumineales de type B (sous type luminal HER2+) (20, 21). Ce type de tumeurs exprime également les cytokératines (CK) de type luminal, CK8 et CK18 et CK19, et ont en revanche une faible expression des gènes régulés par les récepteurs œstrogéniques (15-19). Des mutations de P53 sont retrouvées dans 29% des cas dans ce sous-groupe (22, 23).

Ces tumeurs représentent environ 20% des carcinomes et sont de pronostic intermédiaire (pronostic moins bon que celui des tumeurs de type luminal A). Il s'agit pour la plupart de carcinomes canaux de grade II/III.

### II.2.2. Les tumeurs "basal-like"

Les cancers de type basal sont des cancers développés à partir des cellules myoépithéliales (ou basales) de la glande mammaire. Ils expriment des cytokératines de type basal de haut poids moléculaire telles que les cytokératines 5/6 et 14 et 17 et également de façon importante les gènes liés à la prolifération. Ces cancers sont caractérisés par une absence ou une faible expression des récepteurs hormonaux et par une absence d'expression de HER2. On retrouve fréquemment des mutations de P53 (80% des cas) dans ce type de tumeur ainsi qu'une activité mitotique élevée (22). Des mutations constitutives de *BRCA1* (Breast Cancer 1) ainsi qu'une grande instabilité génétique sont également souvent retrouvées (15-19). Les tumeurs "basal-like" représentent 20% des carcinomes et sont en général de pronostic défavorable. Les principaux types histologiques concernés sont les carcinomes canaux de grade III, les carcinomes médullaires ainsi que les carcinomes métaplasiques.

### II.2.3. Les tumeurs triple-négatives

Ce sous-type ne surexprime ni les récepteurs hormonaux, ni HER2 et représente 10 à 15% des tumeurs. Ce sont pour la plupart des carcinomes canaux de haut grade, de très mauvais pronostic, retrouvés plus fréquemment chez les femmes jeunes (30-35 ans). Les tumeurs triple-négatives sont souvent confondues avec les tumeurs "basal-like" car 80% de ces tumeurs sont de type basal et seulement 20% de type luminal. Le type "basal-like" est en réalité un sous groupe de tumeurs triple-négatives qui exprime des cytokératines de haut poids moléculaires normalement exprimées dans les cellules myoépithéliales mammaires saines, les CK5/6 et CK14. Ce sous-groupe exprime également le récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGF). Les tumeurs triples-négatives peuvent également être des tumeurs métaplasiques, médullaires, ou encore des carcinomes sécrétant juvéniles, adénoïdes kystiques, sporadiques ou présentant une mutation de *BRCA1* (**Figure 3**) (15-19, 24).

Il n'existe aucune thérapie ciblée indiquée pour ce type de tumeur car aucune cible moléculaire n'a actuellement été identifiée. L'efficacité de la chimiothérapie conventionnelle reste de plus très limitée ce qui explique le mauvais pronostic de ces tumeurs.

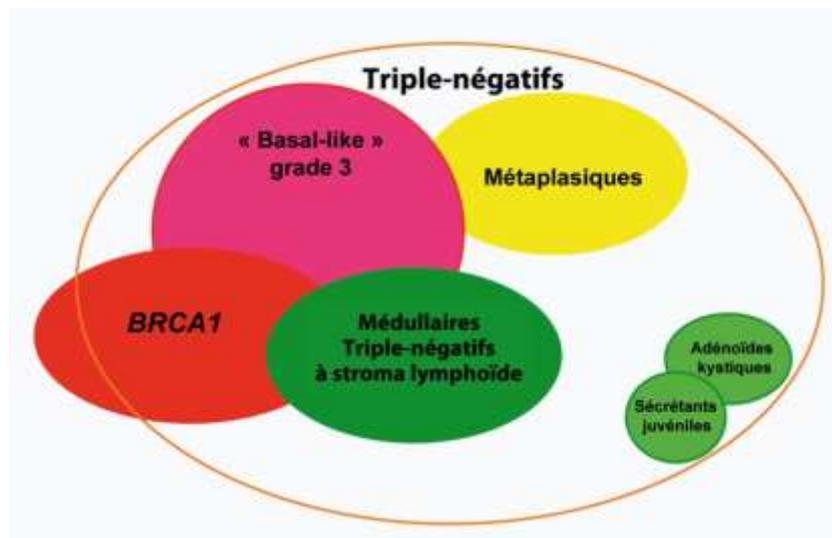


Figure 3: Spectre des carcinomes triple-négatifs.

Les tumeurs triple-négatives regroupent plusieurs types de tumeurs: les tumeurs "basal-like", les tumeurs métaplasiques, médullaires et celles présentant une mutation du gène *BRCA1*. Ces tumeurs sont de mauvais pronostic. Elles comprennent également les carcinomes adénoïdes kystiques et les carcinomes sécrétant juvéniles qui eux sont de meilleur pronostic. D'après Vincent-Salomon *et al.* (25)

#### II.2.4. Les tumeurs HER2+

Les tumeurs HER2+ représentant 15 à 20% des carcinomes, surexpriment le récepteur HER2 mais ne surexpriment pas les récepteurs hormonaux (26). Elles sont caractérisées par une expression élevée des gènes liés à la prolifération et sont liées à des mutations fréquentes de P53 (71%) (15-19). Ces tumeurs étaient à la base de pronostic défavorable mais avec le développement des thérapies ciblées anti-HER2 et notamment la mise sur le marché en 2001 du trastuzumab, premier anticorps monoclonal anti-HER2, le pronostic de ces tumeurs s'est considérablement amélioré (27). Il s'agit pour la plupart de carcinomes canaux infiltrants de grade II/III.

Ces caractéristiques moléculaires sont venues s'ajouter aux caractéristiques histologiques et ont permis d'affiner la classification des tumeurs. Ceci a permis de mieux appréhender les réponses thérapeutiques en fonction du profil moléculaire des tumeurs et ainsi de développer une médecine personnalisée. La caractérisation moléculaire est actuellement indispensable dans la décision thérapeutique, le but étant que chaque patient bénéficie d'un traitement le plus adapté possible aux caractéristiques de sa tumeur. Ceci est déjà le cas pour les cancers HER2+ qui bénéficient de thérapies anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab, trastuzumab-entamsine) ou encore pour les tumeurs hormonodépendantes qui elles sont traitées par hormonothérapie (tamoxifène, anastrozole, letrozole etc.). Les recherches actuelles ont pour but de développer le ciblage moléculaire afin de l'étendre à de nombreuses localisations cancéreuses et permettre une amélioration continue de la qualité des soins. L'objectif est l'identification de nouveaux biomarqueurs d'intérêt afin de cibler l'action du médicament et d'améliorer ainsi l'efficacité thérapeutique tout en limitant les toxicités. Les principales caractéristiques des différents types moléculaires de cancers du sein sont résumées dans le *Tableau I*.

**Tableau I: Récapitulatif des caractéristiques des principaux sous-types moléculaires.**

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

II.3. Le grade histopronostique de Scarff-Bloom-Richardson modifié par Elston et Ellis, grade SBR (EE)

Le grade SBR est un grade histopronostique. Il prend en compte trois critères histologiques: l'architecture de la tumeur (formations tubulo-glandulaires au sein de la tumeur), les atypies cytonucléaires (pléomorphisme nucléaire) et enfin le nombre de mitoses sur 10 champs au grossissement x400 (fonction du diamètre du champ). Le grade est ensuite déterminé en additionnant les scores obtenus pour chacun de ces critères. On distingue alors les tumeurs de bon pronostic (SBR I: score de 3 à 5), de pronostic intermédiaire (SBR II: score de 6 à 7) et de mauvais pronostic (SBR III: score de 8 à 9). Il s'agit d'un facteur pronostique important et indépendant. Ce grade s'applique uniquement aux tumeurs infiltrantes (28-30). Les critères permettant de définir le grade SBR des tumeurs du sein sont résumés dans le **Tableau II**.

**Tableau II: Le grade SBR modifié par Elston et Ellis (modifié d'après (30))**

<b>Grade histopronostique SBR modifié par Elston et Ellis</b>	<b>Score</b>
<b>1. Différenciation tubulo-glandulaire</b>	
<b>Formation tubulo-glandulaire au sein de la tumeur en pourcentage de surface tumorale</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• &gt;75 % : Tumeur bien différenciée</li> <li>• 10-75 % : Tumeur moyennement différenciée</li> <li>• &lt;10 % : Tumeur peu différenciée</li> </ul>	<p><b>1</b></p> <p><b>2</b></p> <p><b>3</b></p>
<b>2. Pléomorphisme nucléaire: degré d'atypie apprécié sur la population tumorale prédominante</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Noyaux petits, réguliers, uniformes</li> <li>• Pléomorphisme modéré</li> <li>• Variations marquées de taille, de forme, avec nucléoles proéminents</li> </ul>	<p><b>1</b></p> <p><b>2</b></p> <p><b>3</b></p>
<b>3. Nombre de mitoses (à compter sur 10 champs au grossissement x 400)</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 à 6 mitoses</li> <li>• 7 à 12 mitoses</li> <li>• &gt;12 mitoses</li> </ul>	<p><b>1</b></p> <p><b>2</b></p> <p><b>3</b></p>

## II.4. Classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis)

Il s'agit d'une classification internationale qui se base sur trois critères pour caractériser l'agressivité de la tumeur et définit ainsi différents stades de tumeurs mammaires (stades I à IV). Il existe 2 classifications TNM, la classification clinique ou radiologique (cT), dont la détermination est pré-thérapeutique et la classification histopathologique (pT) exigeant la vérification de l'absence de tumeur perceptible en limite d'exérèse. Le T fait référence à la taille de la tumeur primitive, le N à la présence ou non d'un envahissement ganglionnaire lymphatique (N pour node), et le M à la présence ou non de métastases (30, 31) (**Annexe I**).

## III. Métastases et cancer du sein

Le cancer du sein peut être à l'origine d'une dissémination métastatique dans les ganglions lymphatiques mais également dans différents organes (32). Les principaux sites métastatiques retrouvés sont les os, les poumons, le foie et le cerveau. Si l'on considère tous les types de tumeurs mammaires, la première localisation métastatique retrouvée est le tissu osseux (70% des patientes atteintes d'un cancer du sein avancé) (33).

Des études ont mis en évidence une relation entre sous-type moléculaire et site de développement des métastases (24). Le profil d'expression génique tumoral prédisposerait à l'envahissement métastatique d'un site privilégié permettant de prédire l'évolution de la maladie, et d'adapter ainsi la prise en charge des cancers (24, 33, 34). Ainsi, les tumeurs lumineuses de type A et B (luminales B/HER2-), sont associées à un faible risque de développer des métastases cérébrales mais sont en revanche principalement associées à des métastases osseuses. Les tumeurs HER2+ sont, quant à elles, associées à des métastases à prédominance cérébrales, mais aussi hépatiques, pulmonaires et osseuses. Les tumeurs "basal-like" entraînent principalement des métastases cérébrales, pulmonaires et ganglionnaires. Elles exposent à un risque moins important de développer des métastases hépatiques et osseuses (24, 33-35). Malgré ces découvertes, de nombreux mécanismes biologiques et génétiques restent à élucider pour la compréhension des processus à l'origine du développement métastatique.

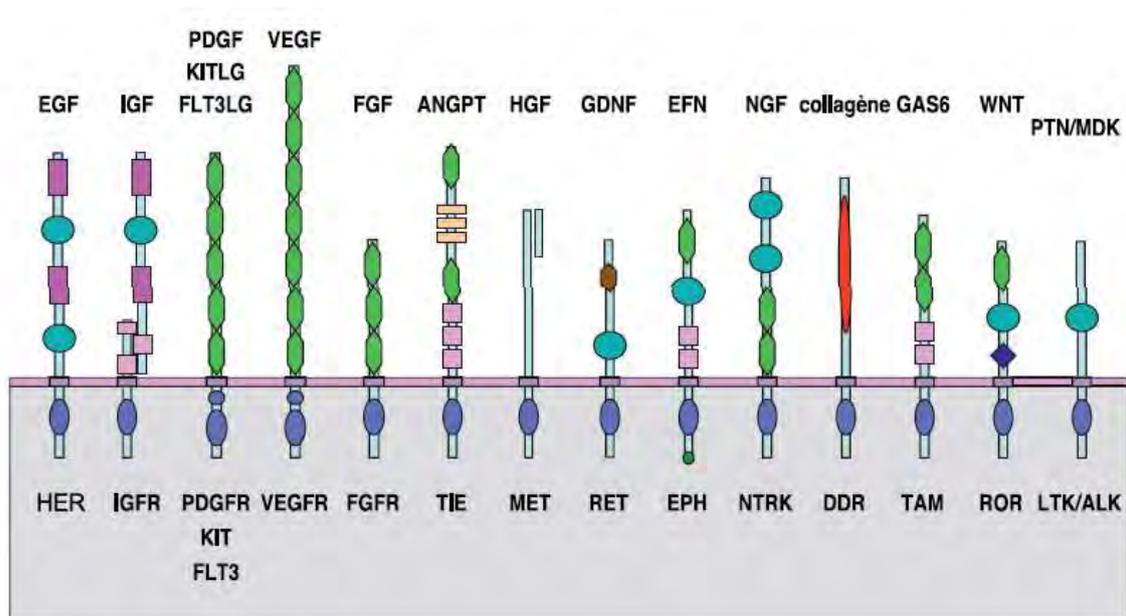
#### IV. Facteurs de risques du cancer du sein

Un certain nombre de facteurs de risque de cancer du sein ont été identifiés. Il existe plusieurs types de facteurs de risques, d'une part les facteurs de risques constitutifs, propre à chaque individu parmi lesquels nous pouvons citer le sexe féminin, l'âge (risque majoré après 50 ans), les histoires familiales de cancer du sein, les prédispositions génétiques (femmes porteuses d'une mutation du gène *BRCA1* et/ou 2), les mastopathies bénignes proliférantes, les antécédents d'irradiation thoracique (notamment en cas d'antécédent de lymphome hodgkinien), la nulliparité, le 1<sup>er</sup> enfant après 35 ans, la puberté précoce (première règles avant 12 ans), la ménopause tardive (après 55 ans), les cycles anovulatoires (36) et d'autre part, les facteurs de risques liés à l'environnement et au mode de vie tel que l'alimentation, le tabac, la consommation d'alcool ou encore la sédentarité. Le fait de présenter un ou plusieurs de ces facteurs de risque n'entraînera cependant pas systématiquement l'apparition d'un cancer du sein. De plus, l'implication de certains d'entre eux dans le développement tumoral reste encore incertaine voire controversée (37).

#### V. Signalisation cellulaire et cancer du sein

##### V.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont des glycoprotéines transmembranaires possédant des caractéristiques structurales et fonctionnelles similaires (38). Il en existe 18 familles chez les vertébrés parmi lesquels nous pouvons citer les récepteurs à insuline (IR), les récepteurs aux facteurs de croissance épidermique (EGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) ainsi que les récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR) (**Figure 4**) (38, 39). Ces récepteurs situés en amont des voies de signalisation cellulaire sont des éléments essentiels du processus de tumorigenèse. En effet, la présence de mutations activatrices, notamment au niveau du domaine tyrosine kinase, ou la surexpression de ce type de récepteurs peut aboutir à une stimulation excessive ou à une dérégulation des voies de signalisation (40, 41).



**Figure 4: Les récepteurs à activité Tyrosine Kinase (d'après Robert J.,2010) (38).**

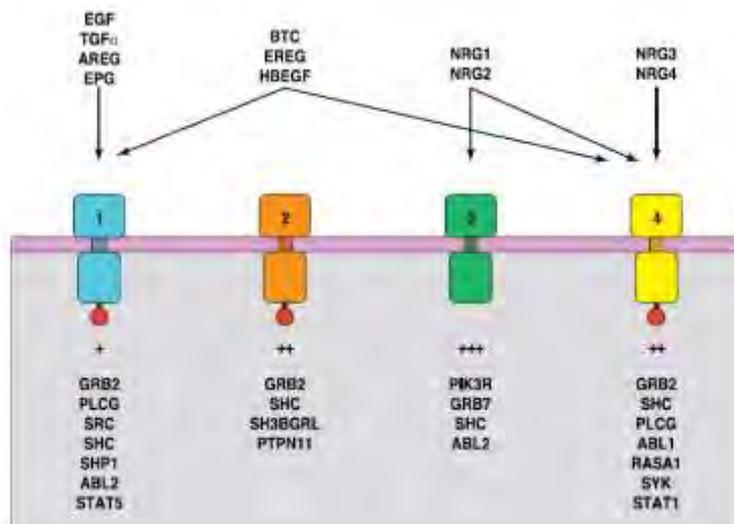
Il existe 18 familles de récepteurs à activité tyrosine kinase (TK) chez les mammifères. Ils sont formés d'une partie extramembranaire, d'une partie transmembranaire et d'une partie intracytoplasmique responsable de l'activité tyrosine kinase.

## V.2. Les récepteurs HER (Human Epidermal growth factor Receptor)

Les récepteurs HER, appelés également récepteurs ErbB, appartiennent à la famille des RTK de classe I. Ils sont exprimés dans la quasi totalité des tissus non hématopoïétiques et sont impliqués dans différents processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, le contrôle du métabolisme cellulaire, la migration, la survie cellulaire, la stimulation de la progression cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (38). Des études ont montré que l'activation anormale des kinases des récepteurs HER jouait un rôle fondamental dans le développement et la croissance de nombreux cancers humains (42). Des altérations oncogéniques des récepteurs HER telles que des mutations activatrices ou des surexpressions sont particulièrement retrouvées (40) dans des tumeurs solides et notamment dans les cancers du sein. Ces récepteurs suscitent donc un grand intérêt en tant que cibles des thérapeutiques anticancéreuses (43).

Les récepteurs HER sont des protéines kinases transmembranaires. Il existe quatre récepteurs homologues: HER1 (ou EGFR ou ErbB1), HER2 (ou cErbB2/neu), HER3 (ou ErbB3) et HER4 (ou ErbB4) (**Figure 5**) (40, 44).

Ces récepteurs partagent une forte homologie de structure primaire qui se traduit par une organisation structurale commune caractéristique. Ils sont constitués d'une seule chaîne polypeptidique formant un domaine extracellulaire, domaine de fixation du ligand au récepteur, un domaine hydrophobe transmembranaire en hélice alpha composé de 23-24 acides aminés, constituant un point d'ancrage dans la membrane plasmique cellulaire, un domaine juxtamembranaire dont le rôle n'est pas entièrement élucidé et un domaine intracytoplasmique renfermant l'activité tyrosine kinase et permettant la transduction du signal au sein de la cellule (**Figure 6**) (38, 40, 43-46). Les récepteurs HER sont activés par la liaison d'une famille de ligands contenant un domaine EGF-like. De nombreux ligands sont actuellement connus pour ces récepteurs ce qui explique une grande diversité des voies de signalisation. Ces ligands peuvent être divisés en 3 groupes. Le premier groupe comprend 3 ligands spécifiques de l'EGFR: l'EGF, le TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ), et l'amphireguline (AR). Le deuxième groupe comprend la beta-celluline (BTC), l'heparine binding epidermal growth factor (HB-EGF) et l'epireguline (EPR) qui montrent une spécificité double en liant EGFR et HER4. Le troisième groupe est composé de neuroregulines (NRGs) et peut être subdivisé en 3 sous groupes basés sur leurs capacités à lier HER3 et HER4 (NRG-1 et NRG-2) ou seulement HER4 (NRG-3 et NRG-4) (38). HER2 ne possède pas de ligand identifié. Sa conformation le rend constitutivement actif et rend sa dimérisation possible en permanence (**Figure 5**) (44-46).



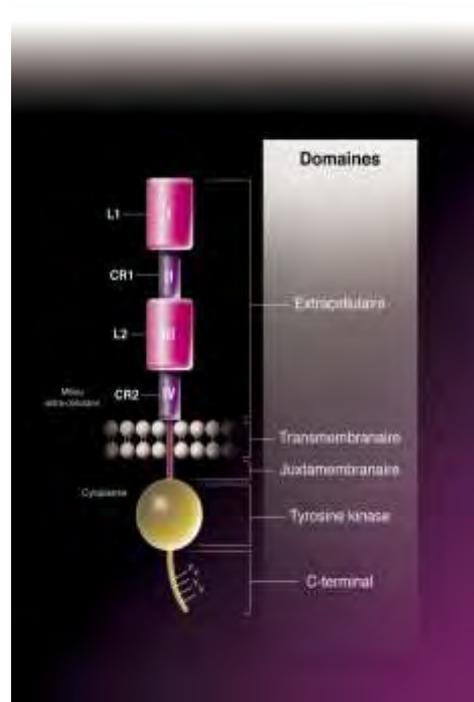
**Figure 5: Les récepteurs HER (d'après Robert J., 2010) (38).**

Il existe 4 familles de récepteurs HER, numérotés de 1 à 4. Ils possèdent chacun leurs ligands propres, à l'exception de HER2 pour lequel aucun ligand n'est nécessaire à son activation.

Site de fixation du ligand →

Hélice  $\alpha$  transmembranaire →

Domaine Tyrosine Kinase →

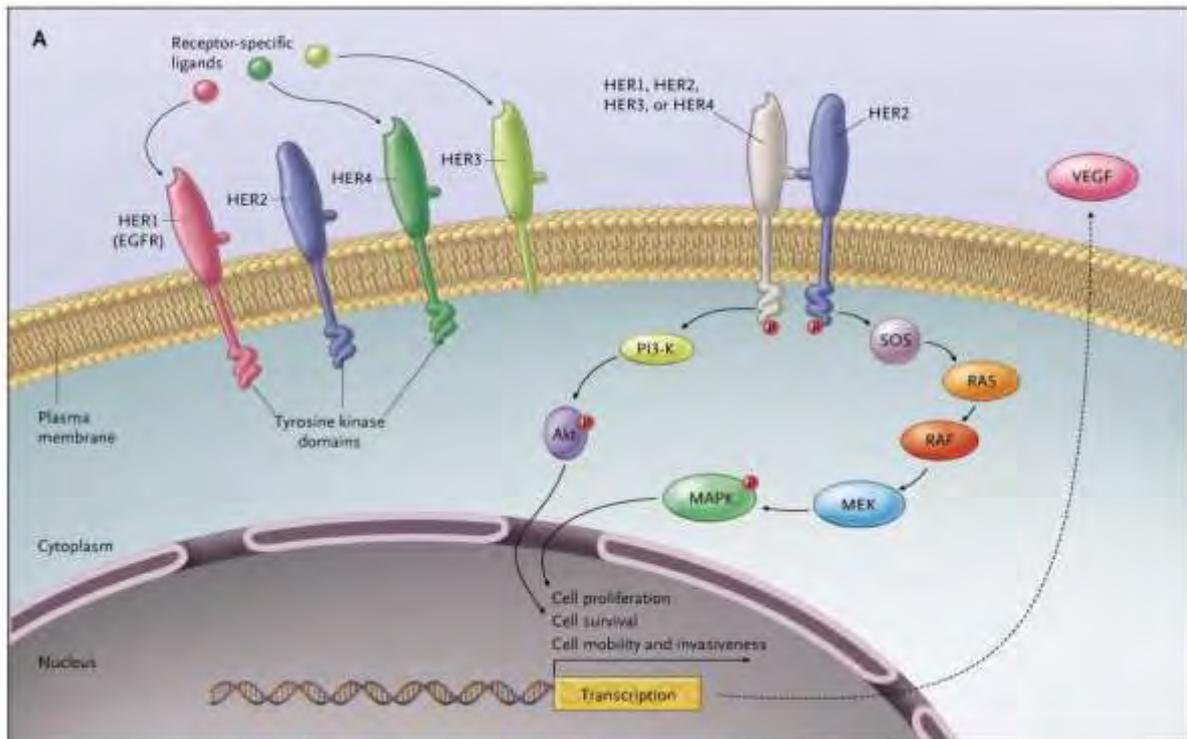


**Figure 6: Structure des récepteurs HER. (D'après documents GSK Oncologie)**

Les récepteurs HER présentent une partie extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase.

L'activation des récepteurs est liée à une homo ou une hétérodimérisation non covalente des récepteurs monomériques en présence du ligand conduisant à une libération de l'activité tyrosine kinase du domaine intracellulaire et à une autophosphorylation du récepteur. L'activité enzymatique des RTK est localisée dans le cytoplasme et permet le transfert du phosphate  $\gamma$  de l'ATP vers l'hydroxyle des résidus tyrosines des protéines cibles et /ou du récepteur lui-même. La disposition dans l'espace des deux domaines catalytiques permet la phosphorylation croisée des résidus tyrosine de chacun d'eux en C-terminal. La phosphorylation de ces résidus permet le recrutement et l'activation de nombreux effecteurs ce qui entraînent l'initiation de plusieurs voies de signalisation. Les différentes protéines recrutées peuvent être des protéines adaptatrices comme SHC (Src Homology), CRK (CT10 Regulator of Kinase), Grb2 (Growth factor Receptor-Bound Protein 2) ou des kinases comme la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase) et Src (Sarcoma virus).

Les principales voies de signalisation activées par les récepteurs HER sont les voies RAS (Rat sarcoma virus)/RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)/MAPKinase (Mitogen-Activated Protein Kinase) et la voie PI3K/AKT (Protéine kinase B)/mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (**Figure 7**) (40, 44, 47).

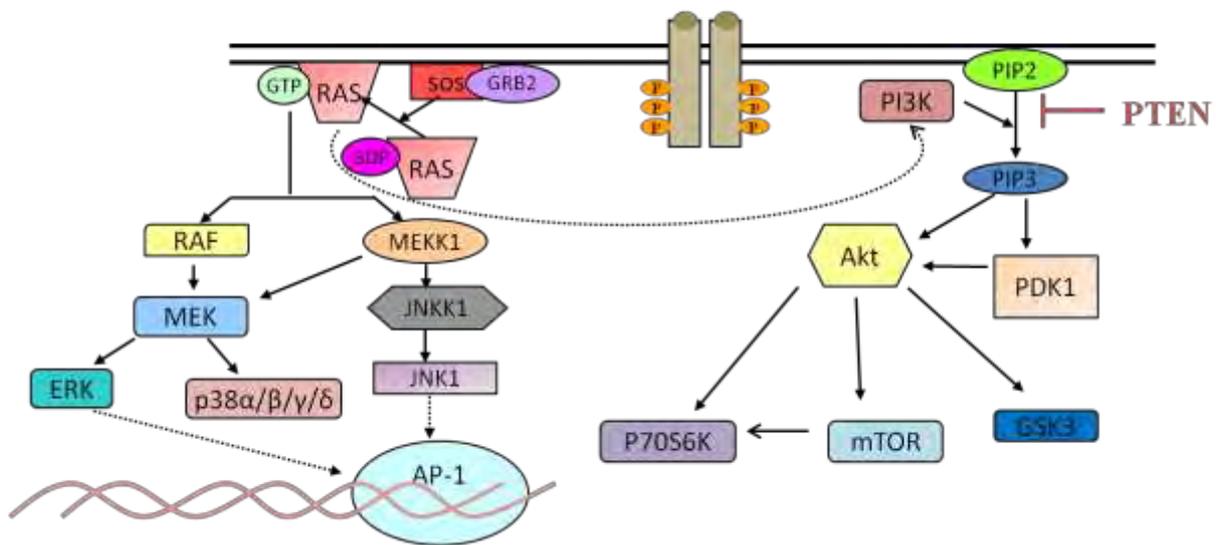


**Figure 7: Transduction du signal à partir des récepteurs HER. D'après Hudis CA.,2007 (48).**

La dimérisation des récepteurs HER entraîne une cascade de phosphorylations permettant l'activation des voies de signalisation situées en aval des récepteurs et ainsi la régulation des principales fonctions cellulaires.

### V.3. Les principales voies de signalisation impliquées en oncologie mammaire: les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase

Les voies de signalisation intracellulaire PI3K/AKT/mTOR et MAPKinase, situées en aval des récepteurs HER ont une implication majeure en oncogénèse mammaire et sont souvent étudiées comme cibles potentielles de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses (**Figure 8**). L'étude de nombreux biomarqueurs intervenant dans ces voies de signalisation et l'évaluation de leur intérêt théranostique sont actuellement des objectifs majeurs.



**Figure 8: Les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase**

Les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase font intervenir de nombreux effecteurs et sont interconnectées au niveau de la protéine RAS.

#### V.3.1. La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire située en aval des récepteurs HER et jouant un rôle clé dans l'homéostasie cellulaire. Elle régule les principales fonctions cellulaires dont notamment l'apoptose, la croissance, le cycle cellulaire ainsi que l'angiogenèse (49, 50). Cette voie est dérégulée dans de nombreux cancers, particulièrement dans les carcinomes mammaires, la plupart des protéines la constituant pouvant être mutées, délétées ou surexprimées selon les cas (50-53). Les PI3K sont des enzymes à activité lipide kinase capables de phosphoryler les phosphoinositides en position 3 du noyau inositol pour produire des D3 phosphoinositides considérés comme seconds messagers.

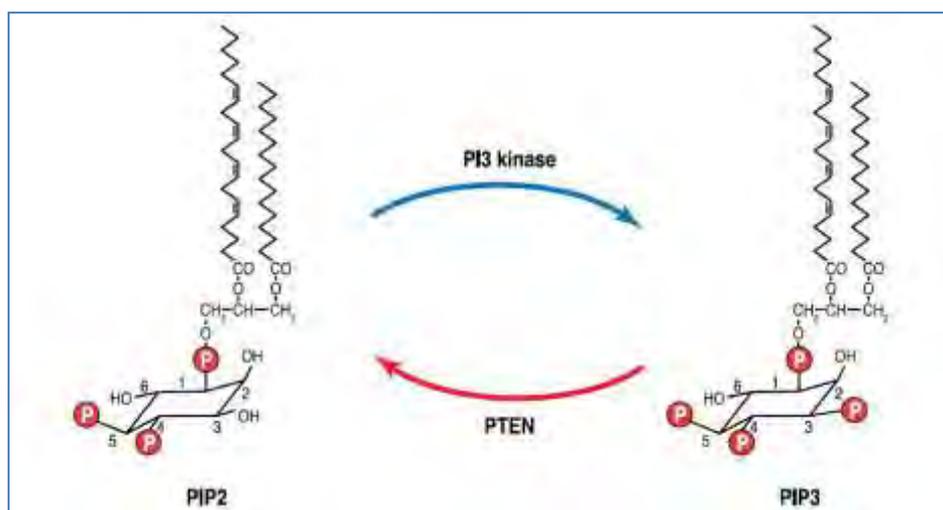
Cette réaction mène à l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire qui régulent les fonctions comme le métabolisme cellulaire, la survie cellulaire, la croissance cellulaire, la prolifération et le trafic vésiculaire (54). Les PI3K possèdent également une activité sérine thréonine kinase. La famille des PI3K est composée de trois classes (classe I, classe II, classe III) qui diffèrent par leurs caractéristiques structurales, leurs distributions tissulaires, leurs mécanismes d'activation et leurs fonctions. Les PI3K de classe I sont divisées en 2 sous-classes dépendantes des récepteurs auxquels elles se couplent. On distingue la sous classe IA correspondant aux PI3kinases activées par les RTK, les récepteurs couplés aux protéines G ainsi que par certains oncogènes (tel que *RAS*) et la classe IB qui elle comprend uniquement des PI3Kinases régulées par les récepteurs couplés aux protéines G. Des 3 classes, la classe IA est la plus fréquemment impliquée dans les cancers (54-57).

#### V.3.1.1. Mécanisme d'activation des PI3K de classe I en aval des récepteurs à activité Tyrosine Kinase

Les PI3K se présentent généralement sous forme d'hétérodimères constitués de 2 sous-unités: une sous-unité régulatrice p85 et une sous-unité catalytique p110 $\alpha$ . La sous-unité régulatrice p85 codée par le gène *PIK3RI*, possède un domaine SH2 (Src Homology 2) qui, dans un premier temps lui permet de se lier à une tyrosine du récepteur, phosphorylée par SRC (Sarcoma Virus, protéine K cytosolique). PI3K est ensuite phosphorylée par le récepteur et activée. SRC peut également directement phosphoryler la PI3K et l'activer. La sous-unité catalytique p110 $\alpha$ , à activité lipide kinase est codée par le gène *PIK3CA*, localisé sur le chromosome 3. Elle phosphoryle le phosphatidylinositol-3, 4-biphosphate (PIP2) en position 3' du noyau inositol générant du phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PIP3). Ce PIP3 permet le recrutement d'autres effecteurs cellulaires au niveau de la membrane plasmique, dont notamment la kinase AKT, et entraîne donc l'activation de multiples voies de signalisation situées en aval (**Figure 10**) (38, 50, 52, 54, 55, 58-60).

### V.3.1.2. Voie de signalisation PI3Kinase et PTEN (Phosphatase and tensing homolog)

PI3K peut être régulée négativement par une phosphatase, PTEN. PTEN, aussi connue sous le nom de MMAC1 ou TEP, est codée par un gène suppresseur de tumeur de 105kb, constitué de 9 exons, localisé sur le chromosome 10 (position 10q23.3), et ayant un rôle clef dans l'inhibition de la prolifération cellulaire (61, 62). PTEN est liée à la membrane cellulaire par un domaine C2 et est régulée négativement par SRC. Elle possède une activité phosphatase qui déphosphoryle spécifiquement le PIP3 en PIP2 (50, 62, 63) et régule ainsi la fonction de PI3K ce qui aboutit à la régulation négative de l'expression d'AKT (**Figure 9 et Figure 10**). Elle empêche la croissance tumorale en antagonisant l'activité TK et réduit ainsi l'envahissement cellulaire tumoral et métastatique (57).



**Figure 9: Activités catalytiques de PI3K et PTEN (D'après Robert J., 2010)**

PI3K phosphoryle PIP2 en PIP3. PTEN régule négativement la voie PI3Kinase en déphosphorylant PIP3 en PIP2 (38).

Sa perte de fonction est fréquente dans les tumeurs solides et peut être due à des mutations, à des délétions, à une perte d'hétérozygotie, à une modulation épigénétique ou encore à une instabilité protéique (54, 57, 64-66). La perte d'expression de la protéine s'accompagne de la méthylation du promoteur de PTEN. Cette perte a été rapportée dans presque 50% des tumeurs mammaires (67). Il a été mis en évidence que l'efficacité du trastuzumab était dépendante de PTEN et de sa capacité à inhiber la voie PI3K. Par conséquent, la perte

d'expression de PTEN est liée à une mauvaise réponse au traitement par trastuzumab (67-71). PTEN serait un facteur prédictif de réponse au trastuzumab.

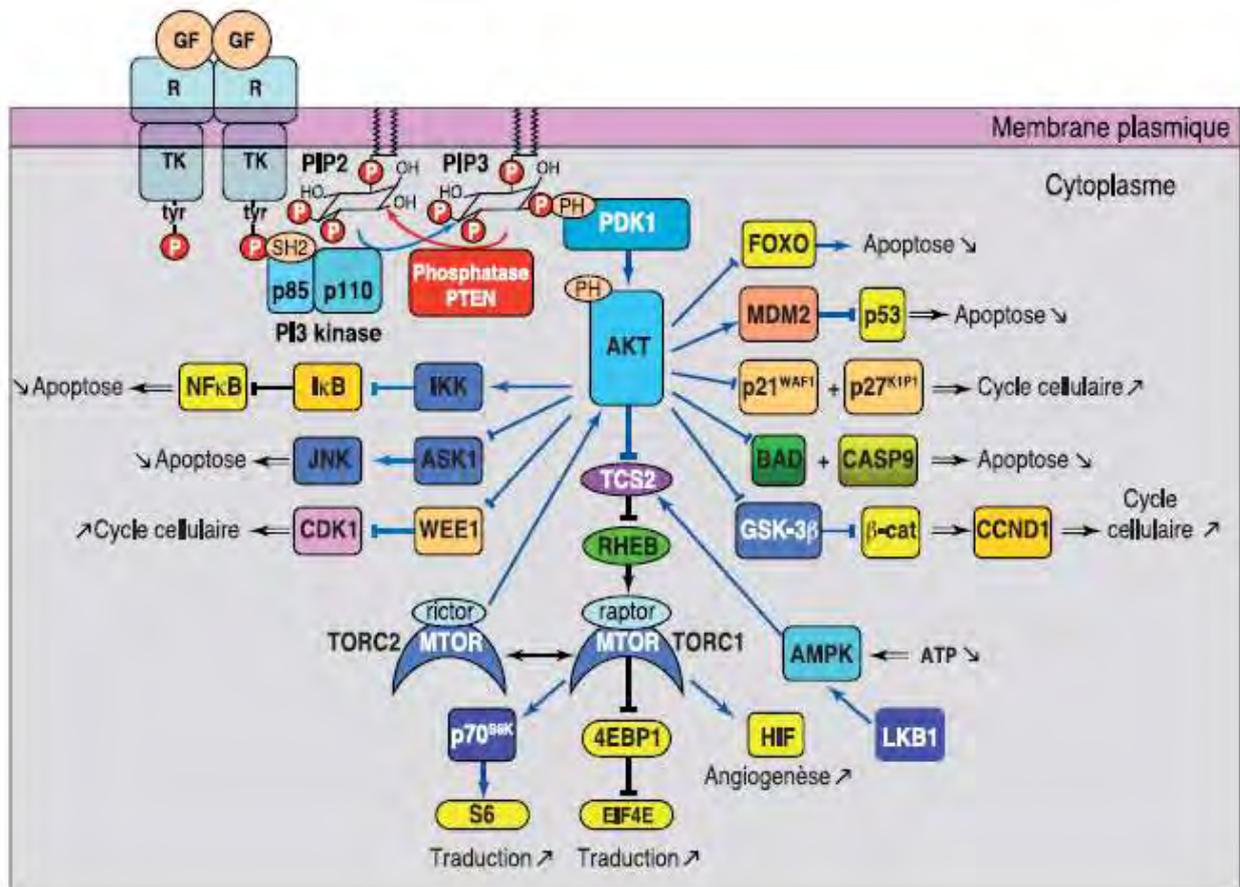


Figure 10: La voie PI3Kinase (D'après Robert J., 2010) (38)

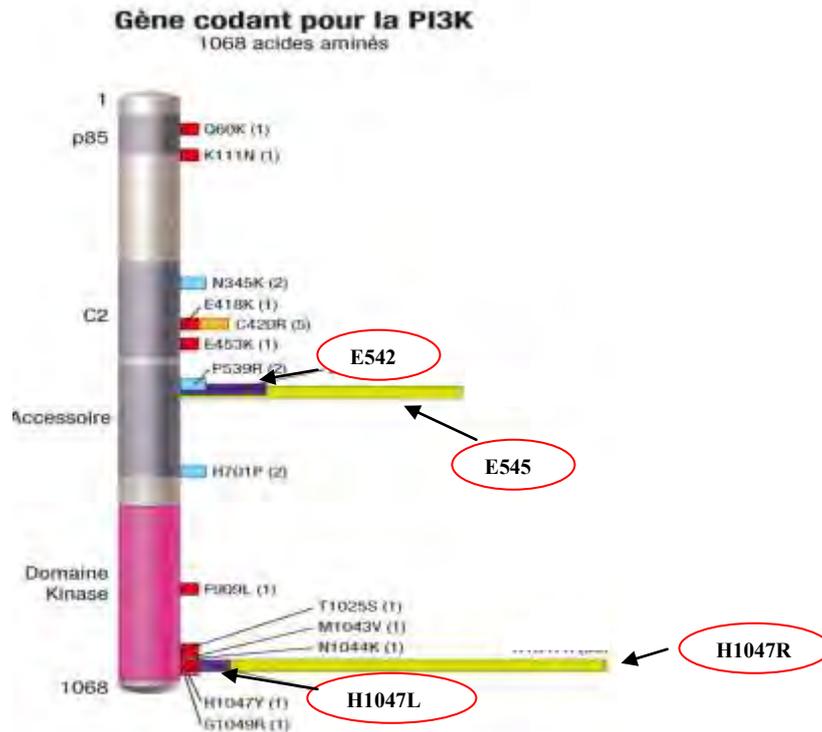
Après activation des récepteurs à activité TK, la sous-unité régulatrice p85 de PI3K se lie via son domaine SH2 à une phosphotyrosine du récepteur. La sous-unité catalytique p110 $\alpha$  quant à elle phosphoryle PIP2 en PIP3 permettant l'activation d'une cascade de phosphorylations en aval et ainsi la transduction du signal.

### V.3.1.3. Mutations du gène *PIK3CA* dans les cancers du sein

La dérégulation de la voie PI3K est un événement commun à plusieurs types de cancers. Elle peut être due soit à une inactivation de la phosphatase soit à des mutations activatrices de la sous-unité catalytique p110 $\alpha$  de PI3K (50, 52, 54, 55, 72, 73).

Des amplifications géniques, des délétions et plus récemment des mutations non sens du gène *PIK3CA* ont été mises en évidence dans de nombreux cancers notamment dans le cancer du sein ainsi que le cancer du colon, du cerveau, du foie, de l'estomac, et des poumons (74, 75).

*PIK3CA* est un gène de 34 kb, situé sur le chromosome 3 (position 3q26.3), et constitué de 20 exons codant pour 1068 acides aminés et donnant une protéine de 124 kDa (**Figure 11**) (38).



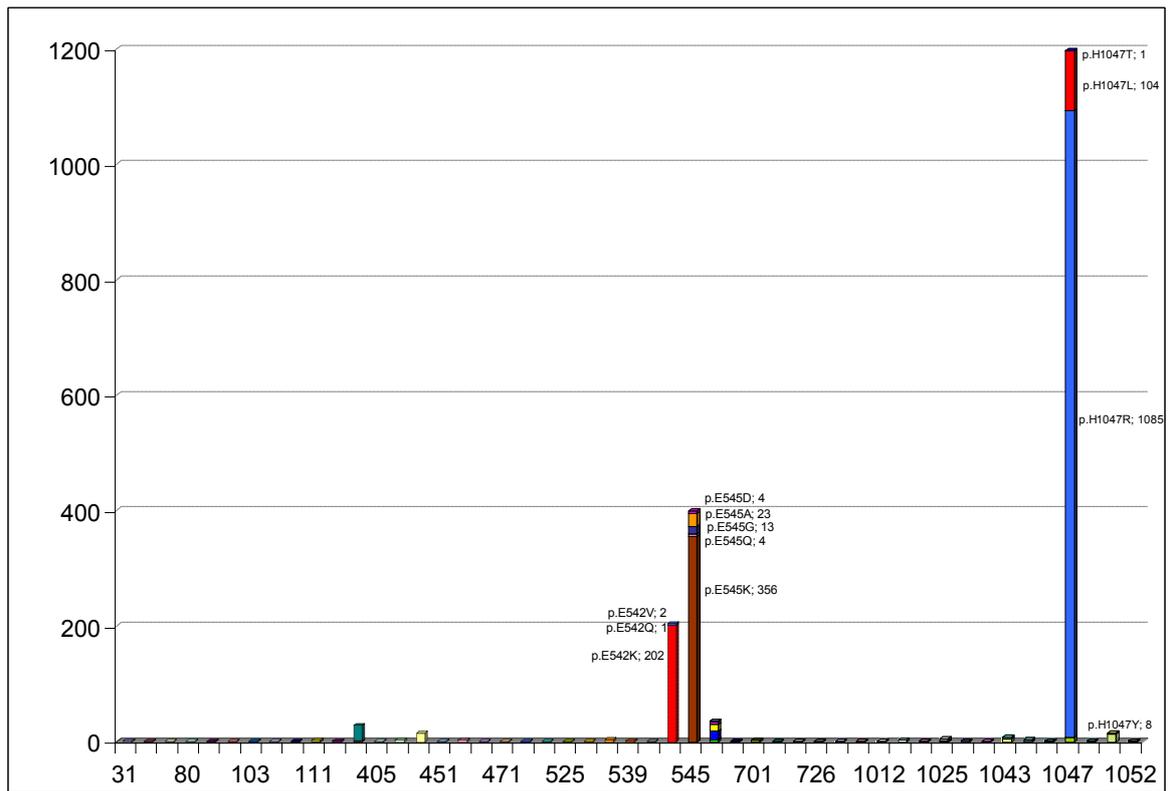
**Figure 11: Schéma du gène *PIK3CA*** (modifié d'après documents GSK Oncologie)

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

Des mutations activatrices de ce gène sont retrouvées dans 25% des cancers mammaires (50, 76, 77). Ces mutations augmentent l'activité kinase de *PIK3CA*. Il a été mis en évidence que l'activation de la voie PI3K par mutations activatrices de la sous-unité catalytique p110 $\alpha$  jouait un rôle clef dans le processus de tumorigénèse (59, 74, 78).

L'oncogène *PIK3CA* est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers du sein après les mutations du gène *P53*, retrouvé muté dans 20 à 40% des cas (52, 79).

Les principales mutations retrouvées sont localisées sur les exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* (75). Il s'agit des mutations E542K, E545K au niveau de la région hélicoïdale de l'exon 9 et H1047R et H1047L du domaine kinase de l'exon 20 (**Figure 11 et 12**). Ces mutations représentent plus de 90% des mutations retrouvées dans les tumeurs mammaires (50, 52, 72, 73, 80, 81).



**Figure 12: Répartition des différentes mutations de *PIK3CA* dans les cancers du sein (Base COSMIC) (d'après Harlé *et al.* (82)).**

La fréquence de chaque type de mutation est représentée par une barre de l'histogramme. Les mutations les plus fréquemment décrites sont sur l'exon 9 (E542K et E545K) et sur l'exon 20 (H1047L et H1047R).

Plusieurs études ont démontré l'impact de ces mutations sur la réponse aux traitements et notamment leurs implications dans le développement de résistances à certaines thérapies anticancéreuses, telles que le trastuzumab (65, 66, 69, 83-85), le lapatinib (66, 86) ou encore les anti-œstrogéniques (87-90). Ces mutations pourraient potentiellement être utilisées comme marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements. Cependant les résultats de certaines études restent contradictoires.

Ces mutations activatrices entraînent une hyperactivation de la voie PI3K par augmentation de l'activité kinase de PI3K. Ainsi les différents effecteurs de cette voie sont des cibles potentielles pour de nouvelles thérapies anticancéreuses, tels que les inhibiteurs de PI3K, de TORC1 (Target of rapamycin complex 1) ou d'AKT (91) qui pourraient être utilisés en association avec les anti-HER2 (91-94).

Certaines équipes ont montré que ces mutations étaient associées à un bon pronostic (52, 72, 75, 95) alors que d'autres mettent en évidence une corrélation avec un pronostic péjoratif (83, 96). Ces discordances peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité des séries étudiées d'une équipe

à l'autre, mais aussi par le fait que l'impact des mutations est probablement différent en fonction du type de mutation mise en cause.

Une meilleure compréhension de la signalisation cellulaire et de l'impact de ces mutations sur la pathologie mammaire est nécessaire pour permettre le développement de nouveaux traitements ciblés (52, 63).

### V.3.2. La voie RAS/RAF/MAPKinase

La voie RAS/RAF/MAPKinase est située en aval des RTK, et particulièrement en aval de l'EGFR (38). Il s'agit d'une des principales voies de prolifération cellulaire qui joue un rôle clef dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires, dont la croissance cellulaire, l'apoptose, la différenciation, l'inflammation mais aussi la réponse au stress environnemental (59, 97). Cette voie de signalisation fait intervenir de nombreuses kinases dont le recrutement conduit à l'activation de facteurs de transcription.

L'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase, situé en amont de la voie, entraîne le recrutement d'une protéine adaptatrice possédant un domaine SH2, la protéine Grb2. Cette protéine est ensuite recrutée par la protéine SOS1 (Son of sevenless homolog 1). La protéine SOS1, une fois activée, phosphoryle alors une petite protéine G, la protéine RAS. RAS entraîne alors une cascade de phosphorylation qui permet la transduction intracellulaire du signal. Elle recrute la protéine RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) qui est alors phosphorylée. RAF phosphoryle ensuite la protéine MEK (Mitogen-activated Extracellular signal regulated Kinase-activating kinase) qui phosphorylera à son tour la protéine ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase). Cette cascade de phosphorylation aboutit à l'activation de facteur de transcription, gouvernant la transcription de nombreux gènes nécessaires à la réplication de l'ADN et à la mitose (**Figure 8**) (38, 40, 98-101). Cette voie a suscité de nombreux travaux ces 20 dernières années, et tout comme pour la voie PI3K/AKT/mTOR, de nombreuses altérations oncogéniques ont été mises en évidence (38). On retrouve une activation anormale de cette voie dans de nombreux cancers et notamment dans les tumeurs du sein (101), justifiant l'intérêt d'étudier ses différents effecteurs comme des cibles potentielles de nouvelles thérapeutiques dans cette maladie.

Ces deux voies initialement décrites comme des voies de signalisation linéaires présentent en réalité de multiples points de convergence et sont interconnectées à de nombreux niveaux ce qui leur permet de se réguler mutuellement. Elles convergent notamment au niveau de la protéine RAS (**Figure 8**) (102, 103).

### V.3.2.1. La P38MAPKinase

La P38MAPkinase appartient à la famille des MAPKinases. Il existe 4 isoformes de cette phosphoprotéine, la P38  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . La P38  $\alpha$  est l'isoforme la mieux caractérisée et la plus abondante. Elle est exprimée dans la plupart des types cellulaires et présente une grande variabilité interindividuelle comparativement aux autres (104-106). Les différentes isoformes présentent une homologie de 60%. Elles diffèrent les unes des autres par leur mode d'expression et leur distribution tissulaire. Elles sont de plus activées par des kinases distinctes et entraînent l'activation de cibles spécifiques (104, 107-109). Cette famille de kinase joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de l'apoptose, ainsi que dans la réponse à l'inflammation et au stress (107, 110).

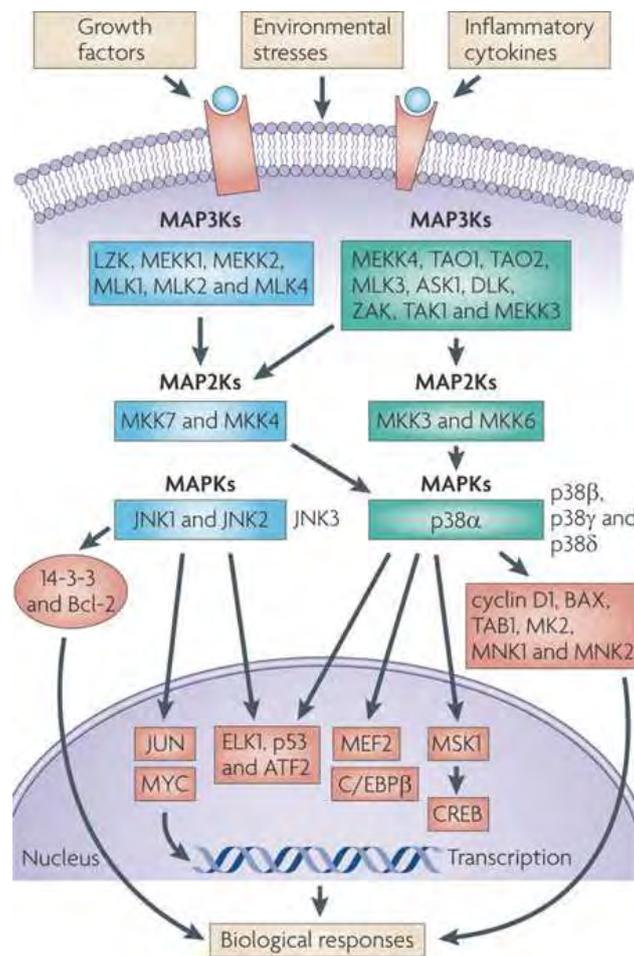
La voie de la P38MAPKinase peut être activée par divers stimuli, parmi lesquels figurent notamment de nombreux facteurs de croissances, des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des agents pathogènes. L'activation des P38MAPKinases dépend du stimulus mais également du type cellulaire (**Figure 13**) (107, 108, 111).

Cette famille peut être divisée en 2 groupes avec d'un côté la P38  $\alpha$ , et la P38  $\beta$  qui présentent 75% d'homologie et de l'autre la P38  $\delta$  et la P38 $\gamma$  qui sont homologues à 70% (104). P38 est un point de convergence de différentes voies de signalisation, son implication dans le processus de tumorigenèse est de ce fait très complexe et de plus variable selon les isoformes.

Une augmentation de l'activité de la P38MAPKinase a été mise en évidence dans plusieurs types de cancers dont notamment les cancers du sein, les cancers de la face et du cou, les lymphomes et les gliomes (106, 112). Un niveau d'expression élevé de la P38MAPKinase a été retrouvé dans certaines tumeurs mammaires et a été défini comme facteur de mauvais pronostic (106). Il a également été mis en évidence l'impact de P38 et de son niveau d'expression sur le pouvoir invasif et métastatique de la tumeur via le système du plasminogène (113). Des études démontrent, quant à elles, une corrélation entre son expression et le statut de HER2 et expliquent également son implication dans la résistance au traitement par tamoxifène (114).

On note également qu'une expression de sa forme phosphorylée est retrouvée dans 20% des cancers mammaires primaires et que cette forme est un marqueur de mauvais pronostic dans les tumeurs HER2- avec métastases ganglionnaires (115).

Bien que les mécanismes de tumorigenèse impliquant la P38 ne soient pas encore totalement élucidés, on sait que cette kinase joue un rôle fondamental dans la prolifération cellulaire ce qui justifierait le développement d'inhibiteurs de P38.



**Figure 13: La voie de signalisation des MAPKinases (d'après (112))**

La P38MAPKinase peut être activée par plusieurs MAPKinases. Il s'agit d'un point de convergence de plusieurs voies de signalisation.

## VI. Stratégie thérapeutique pour la prise en charge du cancer du sein

Le cancer du sein est un cancer très hétérogène ce qui rend sa prise en charge complexe. Le choix du traitement était à la base fonction de l'âge de la patiente, de la taille de la tumeur, et de la présence ou non d'un envahissement ganglionnaire. L'essor de la biologie moléculaire a permis de mieux caractériser les tumeurs et ainsi d'affiner leur classification. Les caractéristiques moléculaires de la tumeur font désormais partie intégrante des critères nécessaires à la décision thérapeutique et viennent s'ajouter aux paramètres cliniques et histologiques. Il existe donc un grand nombre de protocoles thérapeutiques dont le choix est fonction de la situation clinique et des caractéristiques moléculaires de la tumeur. Le développement de la médecine personnalisée avec l'apparition de nombreuses thérapies ciblées est venu renforcer l'arsenal thérapeutique déjà disponible pour le traitement de ce cancer. Les différents types de traitements du cancer du sein actuellement disponibles sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie conventionnelle utilisant les médicaments cytotoxiques, l'hormonothérapie qui représente le premier traitement ciblé utilisé dans le cancer du sein, et enfin les thérapies ciblées proprement dites comprenant les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de kinases.

### VI.1. Hormonothérapie et thérapies ciblées

#### VI.1.1. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est prescrite en cas d'expression d'un des deux récepteurs hormonaux (RH) par la tumeur (récepteurs aux œstrogènes (RE) et/ou à la progestérone (RP)). Le statut des récepteurs hormonaux est évalué par immunohistochimie (IHC) à partir d'une biopsie ou d'une pièce opératoire de la tumeur. Les cancers hormono-dépendants représentant 80% des cancers du sein, l'hormonothérapie est donc le traitement le plus répandu des carcinomes mammaires (116). Ce traitement doit être poursuivi pendant une durée de 5 ans. On distingue deux types de molécules: les anti-œstrogènes et les inhibiteurs de l'aromatase (IA).

#### VI.1.1.1. Les anti-œstrogènes

Il existe deux types d'anti-œstrogènes:

→ Les SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) qui ont pour chef de file le tamoxifène (NOLVADEX<sup>®</sup>). Ce sont des inhibiteurs compétitifs de la liaison de l'œstradiol à ses récepteurs (**Figure 14**).

Le tamoxifène est indiqué, soit en traitement adjuvant en prévention des récurrences, soit pour le traitement des formes évoluées avec progression locale et/ou métastatique, principalement chez la femme non ménopausée. Il peut cependant être prescrit chez la femme ménopausée en cas de contre-indication ou d'intolérance à un traitement par inhibiteurs de l'aromatase (IA) (117-122).

Les doses recommandées sont, pour le traitement adjuvant, de 20 mg par jour en une ou deux prises et pour le traitement des formes évoluées, de 20 à 40 mg également en une ou deux prises (122).

Nous retrouvons également le torémifène (FARESTON<sup>®</sup>) qui lui est indiqué en première intention en cas de cancer du sein métastatique hormono-sensible chez la femme ménopausée. La dose journalière recommandée est de 60 mg (123, 124).

Les effets indésirables retrouvés avec ces anti-œstrogènes sont principalement des bouffées de chaleur, des sueurs, des œdèmes, une prise de poids, des saignements vaginaux, des leucorrhées, un prurit vulvaire en rapport avec l'effet anti-œstrogène, une fatigue, un rash, des réactions allergiques, des nausées, des dépressions mais également un risque d'accidents thromboemboliques veineux et des troubles visuels (122, 124). Des cancers de l'endomètre et des sarcomes utérins ont également été recensés.

Le tamoxifène entraîne également une hypertriglycémie et des pancréatites (120, 122).

Le torémifène entraîne, quant à lui, un allongement de l'intervalle QT dose-dépendant ce qui nécessite une surveillance particulière (124).

→ Les *SERDs* (*Selective Estrogen Receptor Down regulation*) entraînent une dégradation par le protéasome des récepteurs œstrogéniques  $\alpha$  induisant l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses hormonodépendantes. La molécule commercialisée en France est le fluestrant (FASLODEX<sup>®</sup>) (121, 125).

Il s'agit d'une forme intramusculaire, indiquée en deuxième intention pour les cancers du sein localement avancés ou métastatiques chez la femme ménopausée, RE+, en cas de récurrences ou de progression pendant ou après un traitement adjuvant par un anti-œstrogène.

La posologie recommandée est de 500 mg une fois par mois avec une dose supplémentaire 2 semaines après la dose initiale. Il s'administre à raison de 2 injections consécutives de 250 mg dans le muscle fessier (une injection de chaque côté) (126).

Parmi les effets indésirables fréquemment retrouvés lors de l'administration de fluestrant, nous pouvons citer les réactions au point d'injection, l'asthénie, les nausées, l'anorexie, mais aussi des bouffées de chaleur, des accidents thromboemboliques veineux, des réactions d'hypersensibilité ainsi que des affections hépatobiliaires (126).

#### VI.1.1.2. Les inhibiteurs de l'aromatase

Ce sont des inhibiteurs sélectifs de l'aromatase. L'aromatase étant responsable de la production d'œstrogènes à partir des androgènes produits par les glandes surrénales, son inhibition permet la diminution de la synthèse œstrogénique. On distingue deux types d'inhibiteurs de l'aromatase: les inhibiteurs de l'aromatase stéroïdiens et les non stéroïdiens (**Figure 14**) (127).

Il existe un inhibiteur de l'aromatase stéroïdien, l'exemestane (AROMASINE<sup>®</sup>) et 2 non stéroïdiens, le letrozole (FEMARA<sup>®</sup>) et l'anastrozole (ARIMIDEX<sup>®</sup>) (121, 128).

→ Les inhibiteurs de l'aromatase non stéroïdiens triazolés (inhibition non compétitive): anastrozole et letrozole

Ils sont indiqués chez les femmes ménopausées présentant un cancer du sein avancé ou invasif à un stade précoce à récepteurs hormonaux positifs ou chez la femme en pré-

ménopause présentant un cancer du sein invasif à un stade précoce, RH+, précédemment traité pendant 2 ou 3 ans par le tamoxifène.

Le letrozole peut également être prescrit dans les cas de cancers avancés de la femme ménopausée, après rechute ou progression de la maladie précédemment traitée par anti-œstrogènes et également en néoadjuvant pour les cancers RH+/HER2- quand la chirurgie d'emblée n'est pas possible.

L'anastrozole s'administre par voie orale à la dose de 1 mg une fois par jour et le letrozole en une prise quotidienne de 2.5 mg au cours ou en dehors des repas (129, 130).

→ Les inhibiteurs de l'aromatase stéroïdiens (liaison covalente irréversible):  
exemestane

L'aromasine est indiqué en traitement adjuvant des cancers du sein invasifs à un stade précoce, RE+, chez les femmes ménopausées en relais d'un traitement initial de 2 à 3 ans par le tamoxifène ou en deuxième intention dans le traitement du cancer du sein avancé chez la femme ménopausée après échec d'un traitement par anti-œstrogènes.

La posologie est d'un comprimé à 25 mg une fois par jour de préférence après un repas (131).

Les inhibiteurs de l'aromatase entraînent des effets indésirables à type de bouffées de chaleur, hypersudation, sécheresse vaginale, raréfaction des cheveux, mais aussi des troubles digestifs, une asthénie, des arthralgies, des éruptions cutanées, des modifications du bilan lipidique et hépatique et des saignements vaginaux.

Les inhibiteurs de l'aromatase non stéroïdiens entraînent une diminution du taux d'œstrogène circulant aboutissant à une diminution de la densité minérale osseuse et à un risque accru de fracture (127). Un bilan ostéodensitométrique préalable est nécessaire et un traitement préventif de l'ostéoporose pourra éventuellement être mis en place.

Ils sont également responsables d'une augmentation du cholestérol total justifiant un bilan lipidique en cas de facteurs de risques cardiovasculaires (129-132).

Le **Tableau III** résume les protocoles thérapeutiques utilisés en fonction du statut ménopausal des femmes atteintes d'un cancer du sein hormonodépendant.

Tableau III: Hormonothérapie en fonction du statut ménopausal des femmes atteintes d'un cancer du sein hormonodépendant

<i>Femmes non ménopausées</i>	<i>Femmes en pré-ménopause (après aménorrhée définitive)</i>	<i>Femmes ménopausées</i>
<p><b>-Tamoxifène</b> → 5 ans</p>	<p><b>-Tamoxifène</b> → Pendant 2 ou 3 ans → Relais par inhibiteur de l'aromatase pendant 2 ou 3 ans → Cancers N+ ou N- (avec ou sans atteinte ganglionnaire) de mauvais pronostic</p>	<p><b>-Inhibiteurs de l'aromatase</b> <b>-Tamoxifène</b> pendant 2 ou 3 ans puis inhibiteur de l'aromatase pendant 2 ou 3 ans et inversement si intolérance <b>- Tamoxifène</b> pendant 5 ans suivi par inhibiteur de l'aromatase pendant 2,5 ans si N+ ou N- de mauvais pronostic</p>

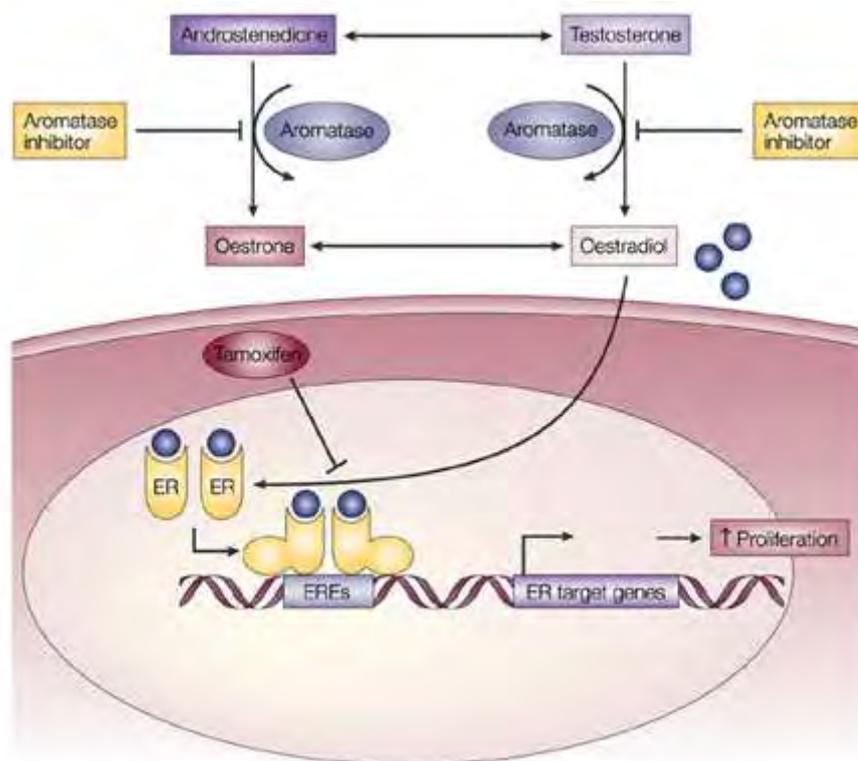
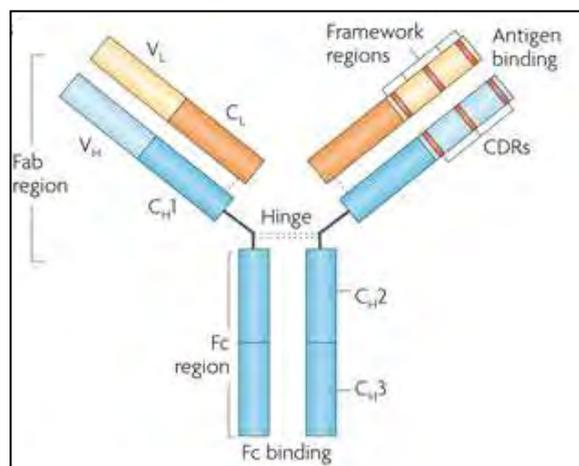


Figure 14: Mécanismes d'action des anti-œstrogènes et des inhibiteurs de l'aromatase (d'après (133))  
Les anti-œstrogènes agissent par inhibition compétitive au niveau des récepteurs aux œstrogènes tandis que les inhibiteurs de l'aromatase inhibent la synthèse des œstrogènes à partir des androgènes.

## VI.1.2. Les thérapies ciblées

### VI.1.2.1. Les anticorps monoclonaux

L'apparition des anticorps (Ac) monoclonaux est une révolution thérapeutique de la prise en charge anticancéreuse. Ils sont constitués de deux fragments Fab (Fragment antibody binding) complémentaires de l'antigène (différents d'un anticorps à l'autre) et d'un fragment constant (identique pour tous les Ac d'une même espèce) permettant la fixation sur les récepteurs membranaires (**Figure 15**). Ces Ac sont hautement spécifiques de la cible. Il existe différents types d'Ac monoclonaux utilisés en clinique. Une nomenclature internationale qui utilise des suffixes spécifiques permettant de reconnaître l'origine et la source de l'Ac, précédés d'une syllabe indiquant la cible thérapeutique a été adoptée. On distingue les anticorps murins (suffixe « omab »), les Ac chimériques (suffixe ximab), les Ac humanisés (suffixe « zumab ») et les Ac humains (suffixe « mumab ») qui ont l'avantage d'être beaucoup moins immunogènes.



**Figure 15: Structure d'un Anticorps Monoclonal de type IgG. D'après Hansel TT *et al.* (134)**

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

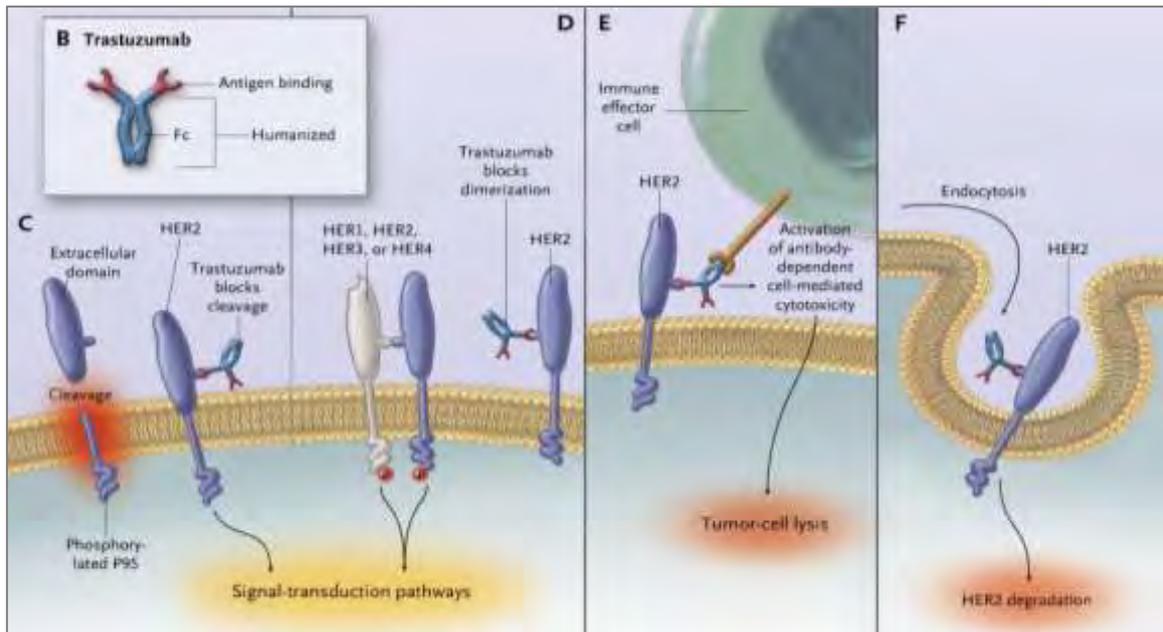
#### VI.1.2.1.2. Trastuzumab (HERCEPTIN<sup>®</sup>)

Premier traitement anti-HER2 commercialisé, le trastuzumab a obtenu son autorisation de mise sur le marché en août 2000 et marque une avancée majeure dans la prise en charge des cancers du sein surexprimant HER2.

Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé recombinant de type IgG1 (immunoglobuline G1) dirigé contre le domaine extracellulaire des récepteurs à activité tyrosine kinase HER2 (27). Il se fixe plus précisément au sous-domaine IV du domaine extracellulaire de HER2, bloquant ainsi la signalisation cellulaire en aval de ce dernier ce qui inhibe la progression du cycle cellulaire et entraîne la suppression de la signalisation anti-apoptotique des voies PI3K/AKT/mTOR (135). La diminution de l'activation des voies de signalisation en aval de ce récepteur est due à l'internalisation du récepteur et à sa dégradation par un système d'enzymes protéolytiques (136).

Le trastuzumab présente également un mécanisme d'action immunologique de type ADCC (Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity), cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (**Figure 16**). L'interaction du fragment Fc de cette IgG avec le domaine Fc $\gamma$  du récepteur des cellules immunitaires de type cellules Natural Killer (NK), monocytes, macrophages conduit à l'activation de ces cellules et donc à la lyse des cellules tumorales (48, 136-138).

Le trastuzumab possède une activité additive ou synergique avec les cytotoxiques notamment avec les sels de platine et les taxanes (27, 139).



**Figure 16: Mécanismes d'action du trastuzumab. D'après Hudis *et al.* (48)**

Le trastuzumab présente différents mécanismes d'action. Sa fixation sur HER2 inhibe l'activation des voies de signalisation en empêchant le clivage protéolytique du domaine extracellulaire de HER2 et en bloquant la dimérisation des récepteurs. Il présente également un mécanisme d'action immunologique de type ADCC.

Cet anticorps est indiqué pour le traitement des tumeurs surexprimant HER2. En situation métastatique, on l'utilise en monothérapie ou en association avec les taxanes (paclitaxel ou docetaxel), ou avec les inhibiteurs de l'aromatase selon le type de tumeur.

Il est également utilisé à un stade précoce, après la chirurgie, la chimiothérapie adjuvante (doxorubicine et cyclophosphamide en association avec un taxane) ou néoadjuvante et après la radiothérapie, ou en association avec une chimiothérapie adjuvante à base de docetaxel et carboplatine, ou avec une chimiothérapie néoadjuvante suivi d'un traitement adjuvant avec trastuzumab pour les tumeurs localement avancées ou les tumeurs mesurant plus de 2 cm de diamètre (140).

La dose de charge est de 8 mg/kg à la semaine 1 en perfusion intraveineuse (IV) de 90 minutes, puis 6 mg/kg toutes les 3 semaines pendant 60 à 90 minutes (diminution de la durée de la perfusion en fonction de la tolérance de la première administration, possibilité d'administration en 30 minutes si bonne tolérance). Le trastuzumab peut également être administré en hebdomadaire à la dose de 4 mg/kg pendant 90 minutes la première semaine puis 2 mg/kg pendant 60 minutes les semaines suivantes.

En raison d'un risque de survenue de choc anaphylactique, et d'autres événements indésirables à type d'hypersensibilité, fièvre, frissons, et d'hypertension, une surveillance de 6 heures après la première perfusion et une surveillance de 2 heures après les autres perfusions est nécessaire. Le trastuzumab est administré pendant un an soit 52 semaines ou 18 injections.

Le trastuzumab présente une toxicité cardiaque importante (hypertension artérielle, infarctus, angor), justifiant un bilan cardiaque avec notamment mesure de la fraction d'éjection ventriculaire gauche, avant toute administration, puis tous les 3 mois pendant le traitement, et tous les 6 mois après arrêt du traitement. Cette surveillance doit être poursuivie jusqu'à 24 mois après la dernière administration, ou pendant 5 ans en cas d'association aux anthracyclines en néoadjuvant. Ce médicament peut également être responsable de troubles pulmonaires à type de bronchospasme ou de dyspnée (140).

L'arrivée sur le marché de cette thérapie ciblée a considérablement amélioré la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein surexprimant HER2 en améliorant de façon significative la survie sans progression et la survie globale des patientes et donc le pronostic associé à ces tumeurs (48).

Dans certains cas, on constate cependant un échappement au traitement par trastuzumab, du notamment à la présence de mutations activatrices du gène *PIK3CA* au niveau des voies de signalisation (77, 141, 142). Ces mutations sont responsables d'une hyperactivation de la voie PI3K en aval des récepteurs entraînant une diminution de l'efficacité du trastuzumab.

Une formulation sous-cutanée du trastuzumab a récemment été développée, permettant de réduire la durée de l'administration et d'améliorer le confort des patientes. Cette forme sous-cutanée contient une hyaluronidase qui en hydrolysant transitoirement l'acide hyaluronique, va permettre de diminuer la viscosité de la matrice sous cutanée et donc permet l'administration d'un volume plus important et facilite la diffusion systémique du produit. L'étude HANNAH a montré la non infériorité du trastuzumab sous-cutané (SC) par rapport au trastuzumab intraveineux (IV) (143). La solution de trastuzumab SC est prête à l'emploi. Ce produit devra être administré toutes les 3 semaines à la dose fixe de 600 mg/5 ml quelque soit le poids de la patiente. L'injection devra être réalisée en 2 à 5 minutes dans la cuisse (en alternant de côté à chaque injection). Une surveillance d'au moins 6 heures sera nécessaire lors de la première administration et une surveillance de 2 heures pour les administrations suivantes (144).

#### VI.1.2.1.3. Pertuzumab (PERJETA®)

Le pertuzumab est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 ciblant un épitope spécifique du récepteur HER2, impliqué dans le processus de dimérisation des récepteurs. Sa fixation empêche l'hétérodimérisation ligand-dépendante d'HER2 avec les autres récepteurs de la famille HER et notamment sa dimérisation avec HER3. Ceci entraîne alors l'inhibition des voies de signalisation RAS/RAF/MAPKinase et PI3K/AKT/mTOR ce qui conduit à un arrêt de la prolifération cellulaire et à l'apoptose. Ce mécanisme d'action est complémentaire de celui du trastuzumab qui se fixe sur un épitope différent de HER2. Leur association entraîne donc un double blocage du récepteur (**Figure 17**).

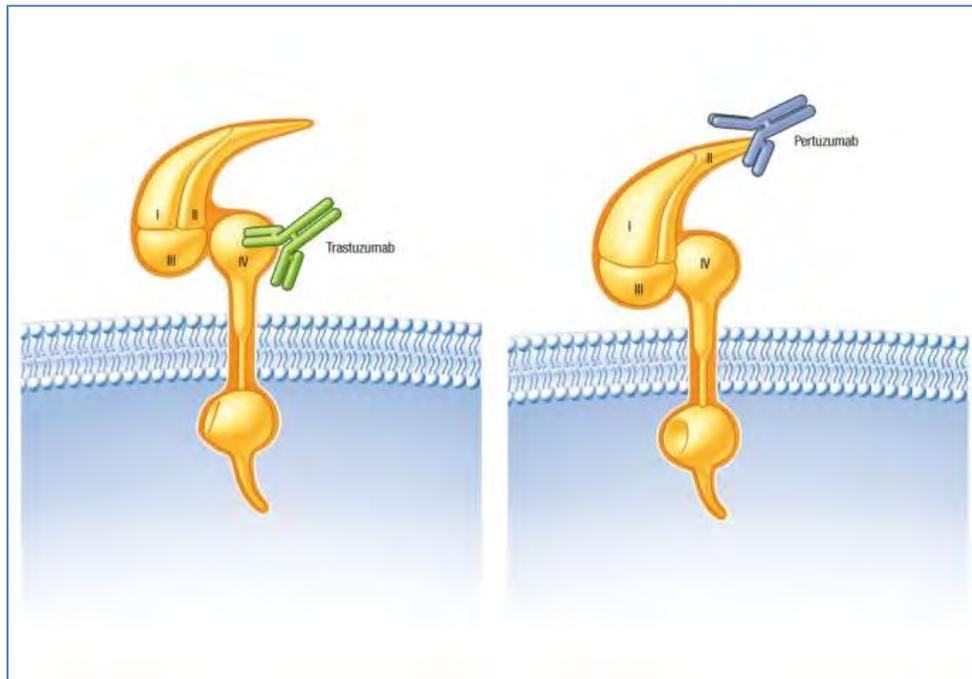
Le pertuzumab, tout comme le trastuzumab présente également un mécanisme d'action immunologique de type ADCC, cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (137, 145).

Le pertuzumab a obtenu son AMM en mars 2013 suite aux résultats de l'étude de phase III CLEOPATRA, étude randomisée, multicentrique, en double aveugle contrôlée, comparant l'efficacité de l'association placebo/trastuzumab/docétaxel à celle de l'association pertuzumab/trastuzumab/docétaxel chez des patientes présentant un cancer du sein métastatique ou localement récidivant non résécable, HER2+, qui a mis en évidence une amélioration statistiquement significative de la survie sans progression (gain de 6,1 mois) dans le groupe traité avec le pertuzumab (146, 147).

Le pertuzumab doit être administré à la dose de charge de 840 mg en perfusion intraveineuse de 60 minutes suivie toutes les 3 semaines d'une perfusion de 30 à 60 minutes à la dose d'entretien de 420 mg. Au cours de la première administration, une surveillance d'une heure après la perfusion est nécessaire, pour les administrations ultérieures la surveillance sera de 30 à 60 minutes après l'arrêt de la perfusion. Les médicaments doivent être administrés de façon séquentielle, le pertuzumab avant ou après le trastuzumab et le docétaxel après l'administration des 2 anticorps monoclonaux.

Les principaux effets indésirables dus à la prise de pertuzumab sont les diarrhées, l'alopécie, les neutropénies fébriles, des réactions d'hypersensibilité (syndrome de relargage des cytokines), des mucites, ainsi que des réactions à la perfusion. L'ajout du pertuzumab entraîne également un risque d'exacerbation des neutropénies induites par le docétaxel mais aussi des dysfonctions ventriculaires gauches et moins fréquemment des pneumopathies interstitielles.

L'ajout du pertuzumab à l'association trastuzumab + docetaxel n'a cependant pas montré de surtoxicité majeure par rapport au trastuzumab associé seul au docetaxel (148, 149).

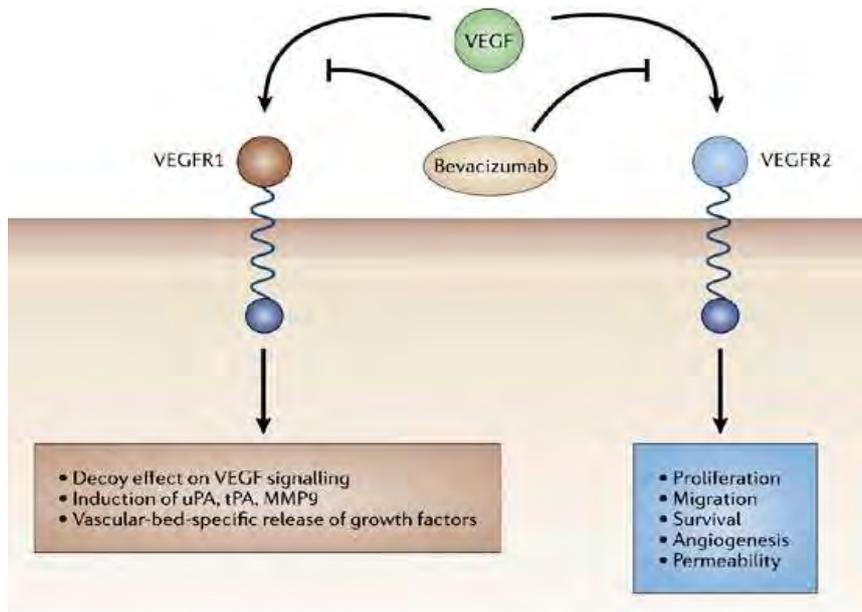


**Figure 17: Sites de fixation du trastuzumab et du pertuzumab (D'après documents GSK Oncologie)**  
Le trastuzumab se lie au domaine IV du domaine extracellulaire du récepteur HER2 alors que le pertuzumab se lie au domaine II.

#### VI.1.2.1.4. Bévacicumab (AVASTIN®)

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal recombinant humanisé anti-VEGF. Il inhibe la fixation du VEGF à ses récepteurs FLT-1 (FMS-like Tyrosine kinase-1 ou VEGFR-1) et KDR (Kinase insert Domain protein Receptor ou VEGFR-2) au niveau des cellules endothéliales et a donc une action anti-angiogénique (**Figure 18**). Il est indiqué dans le traitement de première ligne du cancer du sein métastatique en association au paclitaxel ou au docetaxel. Cet anticorps monoclonal a obtenu son AMM pour le traitement du cancer du sein en mars 2007.

Il est également indiqué en première ligne, en association à la capécitabine dans le traitement des cancers du sein métastatiques pour lesquels un traitement incluant des taxanes ou des anthracyclines ne peut être envisagé. Les patientes ayant reçu un traitement à base de taxanes et d'anthracyclines en situation adjuvante au cours des 12 derniers mois ne peuvent recevoir un traitement associant le bévacizumab à la capécitabine (150, 151).



**Figure 18: Mécanisme d'action du Bévaccizumab. D'après (152)**

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal recombinant humanisé anti-VEGF. Il agit en inhibant la fixation de VEGF à ses récepteurs.

Le bévacizumab doit être administré à la dose de 10 mg/kg une fois toutes les 2 semaines ou à la dose de 15 mg/kg, une fois toutes les 3 semaines, en perfusion intraveineuse. La dose initiale doit être administrée en perfusion intraveineuse de 90 minutes. La durée de la perfusion pourra être réduite à 60 minutes puis à 30 minutes pour les autres administrations si aucun problème de tolérance n'est observé. Le débit de perfusion sera adapté à la tolérance. Le bévacizumab doit être administré après les cytotoxiques.

Comme toute substance active, cette molécule présente des effets indésirables. Les plus fréquemment rencontrés sont des perforations gastro-intestinales, des hémorragies, des thromboembolies artérielles, ainsi que des leuconéutropénies, des cas d'hypertension artérielle, une protéinurie, un retard de cicatrisation, et des insuffisances cardiaques congestives.

Un traitement ne pourra être débuté en cas d'hypertension artérielle non contrôlée et d'antécédents cardio-vasculaires datant de moins de 6 mois. Avant tout traitement, il est nécessaire de vérifier que la protéinurie est inférieure à 2 g/ 24H et qu'il n'y a pas de signe hémorragique. En raison du risque hémorragique, un délai de 28 jours au moins entre une chirurgie et le début du traitement devra être respecté ainsi qu'un délai de 10 jours entre l'arrêt d'un traitement par anticoagulants ou par aspirine à une dose supérieure à 325 mg/j (150).

#### VI.1.2.1.5. T-DM1: trastuzumab emtansine (KADCYLA®)

Le T-DM1 résulte de la conjugaison du trastuzumab à un composé cytotoxique, inhibiteur de la polymérisation des microtubules dérivé de la maytansine, le DM1. Les 2 molécules sont associées par un agent de liaison (agent de liaison+DM1= emtansine) (**Figure 19**). Le T-DM1 se lie aux récepteurs HER2 à la surface de la cellule cancéreuse, il est ensuite internalisé par un mécanisme d'endocytose et relargue le DM1 à l'intérieur de la cellule par dégradation lysosomale. Le DM1 se lie aux microtubules et inhibe leur polymérisation, ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire (**Figure 20**). L'intérêt de cette association est d'améliorer l'efficacité du traitement en conjuguant l'activité ciblée anti-HER2 du trastuzumab à un effet cytotoxique de type antiméiotique, tout en limitant la toxicité. L'effet cytotoxique touche spécifiquement les cellules tumorales surexprimant HER2 et épargne les cellules saines contrairement à un traitement cytotoxique standard.

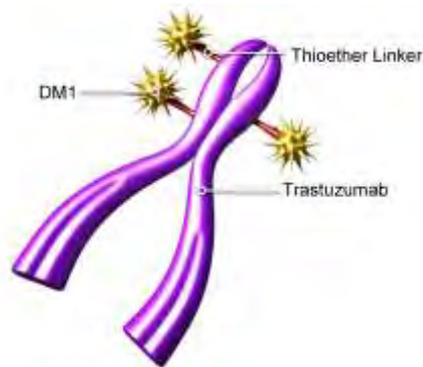
L'étude multicentrique randomisée de phase III, EMILIA, comparant l'efficacité et la toxicité du T-DM1 à celles de l'association capécitabine-lapatinib chez des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+, localement avancé, non résecable, métastatique, traitées en première ligne par trastuzumab associé à un taxane, a mis en évidence une efficacité supérieure (amélioration de la médiane de la survie sans progression de 3,2 mois et de la médiane de la survie globale de 5,8 mois) et une toxicité moins importante du T-DM1(153).

Le T-DM1 est indiqué, depuis novembre 2013, en monothérapie chez les patientes présentant un cancer du sein HER2+, localement avancé, non résecable ou métastatique, ayant précédemment reçu un traitement à base de trastuzumab et de taxane, séparément ou en association.

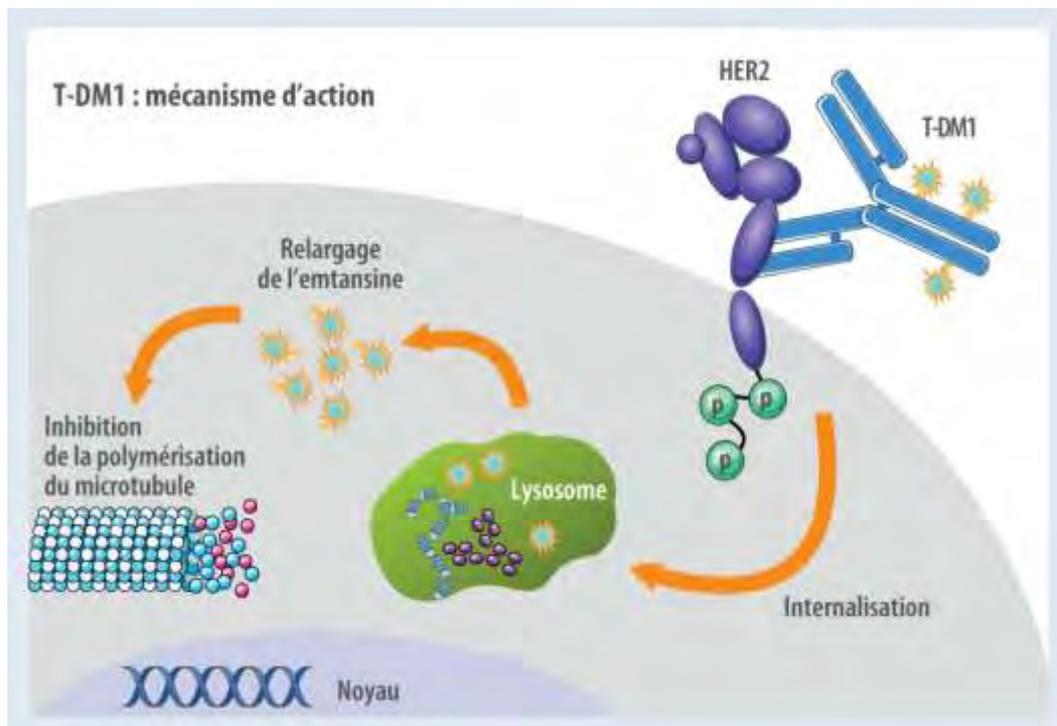
La posologie recommandée est de 3,6 mg/kg en perfusion IV toutes les 3 semaines jusqu'à progression ou survenue d'une toxicité inacceptable. La première injection se fera en une perfusion de 90 minutes avec une surveillance pendant au moins 90 minutes après la fin de la perfusion (surveillance de la survenue d'éventuels effets indésirables à type de fièvre, frissons, réactions liées à la perfusion). Si cette première administration est bien tolérée, les suivantes pourront se faire en 30 minutes avec une surveillance de 30 minutes à partir de la fin de la perfusion. Un kit d'urgence doit être mis à disposition lors de l'administration.

La prise de T-DM1 peut entraîner une toxicité pulmonaire à type de pneumopathie interstitielle diffuse, une hépatotoxicité avec élévation des transaminases et de la bilirubine, justifiant la nécessité d'une surveillance hépatique avant l'initiation du traitement et avant

chaque administration. Il est également responsable d'une toxicité cardiaque, avec diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche nécessitant un bilan cardiaque avant tout traitement et une surveillance régulière tout au long de celui-ci. Le T-DM1 est de plus embryotoxique et foetotoxique. D'autres effets indésirables à type de nausées, fatigue, réaction d'hypersensibilité, réaction à la perfusion, thrombocytopénie, neuropathie périphérique ont également été rapportés (154).



**Figure 19: T-DM1: Trastuzumab couplé à un agent cytotoxique (D'après Illustration Roche Pharma).**  
Le T-DM1 est constitué de trastuzumab conjugué (à l'aide d'un agent de liaison) à un composé cytotoxique dérivé de la maytansine, le DM1.



**Figure 20: Mécanisme d'action du T-DM1 (D'après Pierga *et al.*).**

Le T-DM1 se fixe au récepteur HER2. Suite à cette liaison, le T-DM1 est internalisé par le biais du récepteur. Il y a ensuite une dégradation lysosomale conduisant à la libération intracellulaire de l'emtansine qui va alors exercer son effet antimétabolique.

### VI.1.2.3. Les inhibiteurs de kinase

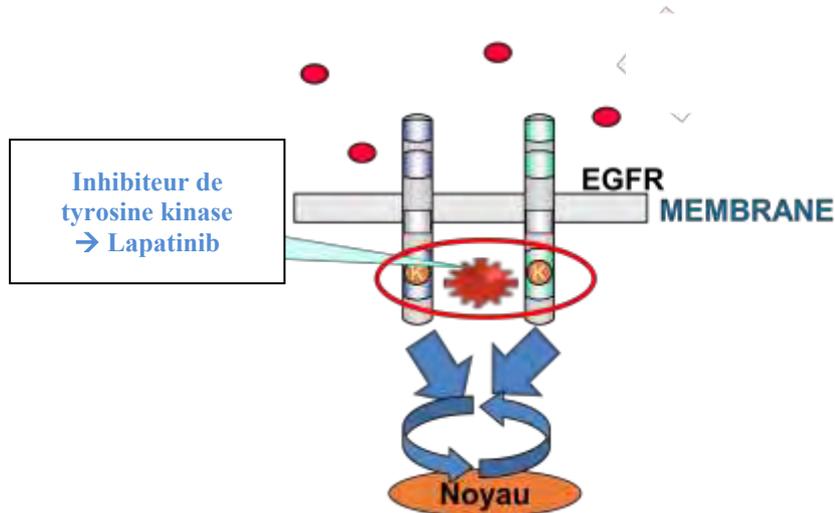
Les inhibiteurs de kinase sont de petites molécules inhibant l'activité TK des récepteurs par compétition avec l'ATP. Ils entraînent l'inhibition intracellulaire de la phosphorylation de la tyrosine et donc l'inhibition de la transduction du signal en aval. Ces molécules sont spécifiques de leurs cibles.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

#### VI.1.2.3.1. Lapatinib (TYVERB<sup>®</sup>)

Le lapatinib est un double inhibiteur de tyrosine kinase qui se fixe sur les sites intracellulaires des récepteurs HER1 et HER2. Cette fixation lentement réversible bloque la phosphorylation et donc l'activation des récepteurs entraînant l'inhibition de la signalisation cellulaire située en aval et notamment la signalisation dépendante des voies RAS/RAF/MAPKinase et PI3K/AKT/mTOR (**Figure 21**) (155, 156). Le lapatinib entraîne également une régulation négative de la survivine ainsi que de la protéine XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), qui sont toutes deux des protéines inhibant l'apoptose. L'inhibition de la survivine se fait via la voie PI3K (157).

Le lapatinib est indiqué en association avec la capécitabine dans le traitement du cancer du sein avancé ou métastatique surexprimant HER2, en deuxième intention après un traitement par anthracycline associée à un taxane et au trastuzumab. Il est également utilisé en association avec un inhibiteur de l'aromatase chez la femme ménopausée présentant un cancer du sein RH+ pour lequel la chimiothérapie n'est pas envisagée. Il peut enfin être associé au trastuzumab en situation métastatique, pour les tumeurs en progression, RH- traitées précédemment par le trastuzumab associé à une chimiothérapie (158).

Ce médicament garde une activité significative sur les lignées de cellules tumorales exposées au trastuzumab, suggérant une absence de résistance croisée entre ces deux molécules (65).



**Figure 21: Mécanisme d'action du Lapatinib (D'après cours Harlé. A.)**

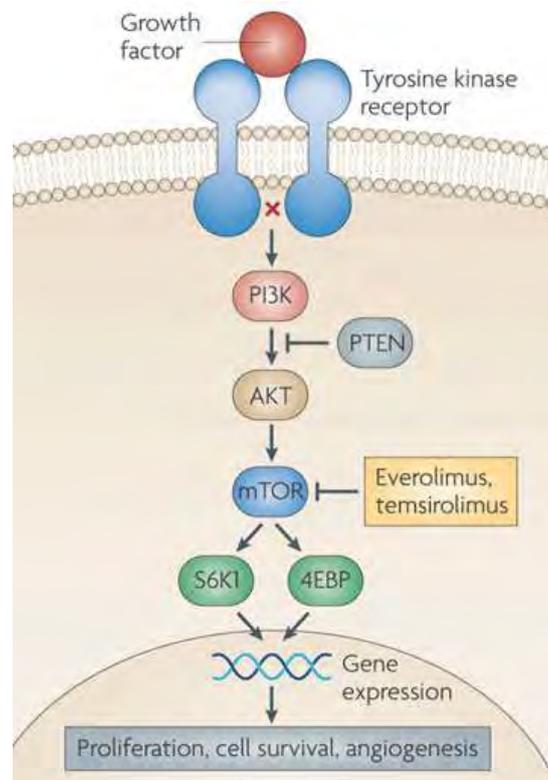
Le lapatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase se fixant sur les sites intracellulaires des récepteurs HER1 et HER2 bloquant ainsi l'activation des récepteurs et donc la signalisation cellulaire en aval.

Le lapatinib s'administre par voie orale à la posologie de 1 250 mg (soit 5 comprimés) lorsqu'il est associé à la capécitabine, à la posologie de 1 000 mg (soit 4 comprimés) en association au trastuzumab et enfin à la posologie de 1 500 mg (soit 6 comprimés) lorsqu'il est associé à un inhibiteur de l'aromatase. Quelque soit l'association, il s'administre toujours en une prise par jour, en continu et en dehors des repas. Au vu de sa toxicité, la prise de lapatinib nécessite un bilan cardiaque ainsi qu'un bilan hépatique. Cette molécule est également responsable de diarrhées et d'une toxicité cutanée à type de rash, de sécheresse et de syndrome mains-pieds.

Il est de plus métabolisé par le cytochrome P450 3A4 et entraîne de nombreuses interactions médicamenteuses (158).

#### VI.1.2.3.2. Everolimus (AFINITOR®)

L'évérolimus ou le 40-O-(2-hydroxyéthyl)-rapamycine est un analogue de la rapamycine, molécule initialement développée comme antifongique et immunosuppresseur avant que ses propriétés anti-prolifératives ne soient découvertes (159). Il s'agit d'un inhibiteur sélectif de la protéine mTOR, une sérine thréonine kinase située en aval de la voie PI3K/AKT/mTOR (160, 161), et impliquée dans la progression des cellules de la phase G1 à la phase S. Il cible spécifiquement le complexe de transduction du signal mTOR-Raptor1 (mTORC1). Son activité antiproliférative provient de sa fixation à l'immunophiline FKBP-12 (FK506-binding protein 12). Le complexe FKBP-12/Evérolimus se lie alors à mTOR et bloque la transduction du signal en aval de mTOR (**Figure 22**). L'évérolimus possède des propriétés anti-tumorales et antiangiogéniques. Il permet l'inhibition de la prolifération et de la croissance cellulaire, la diminution de l'angiogenèse tumorale et inhibe le métabolisme cellulaire (162, 163). Des études ont mis en évidence que les inhibiteurs de mTOR étaient actifs sur les cellules résistantes au trastuzumab (141, 164).



**Figure 22: Mécanisme d'action de l'évérolimus. D'après (165)**

L'évérolimus est un inhibiteur sélectif de la sérine thréonine kinase mTOR. L'évérolimus se lie à FKBP-12 formant un complexe qui inhibe le m-TOR complex-1(m-TORC-1) entraînant le blocage de la signalisation cellulaire en aval.

Cette molécule initialement indiquée dans le cancer du rein avancé ainsi que dans les tumeurs neuroendocrines d'origine pancréatique a obtenu le 3 avril 2013 une extension d'AMM. Elle est depuis indiquée également dans le cancer du sein avancé avec récepteurs hormonaux positifs, HER2-, en association avec l'exemestane, chez les femmes ménopausées sans atteinte viscérale symptomatique des récidives ou progression de la maladie et précédemment traitées par un inhibiteur non-stéroïdien de l'aromatase (extension d'AMM suite aux résultats de l'étude BOLERO 2 montrant une augmentation significative de la survie sans progression dans le bras de traitement évérolimus + exemestane comparativement au bras exemestane seul) (166).

L'Évérolimus est administré par voie orale, en une prise de 10 mg le matin, à jeun ou après un repas sans matières grasses.

Sa prise peut entraîner des pneumopathies non infectieuses, une insuffisance rénale aiguë, et exposer, en raison de ses propriétés immunosuppressives, à un risque accru d'infections. La surveillance de l'apparition d'éventuels signes d'infections est nécessaire. En cas de syndrome infectieux, une prise en charge médicamenteuse doit être rapidement mise en place et l'arrêt temporaire ou définitif de l'évérolimus est envisagé. Des réactions d'hypersensibilité ont été répertoriées.

Cette molécule expose également à un risque d'ulcérations buccales à type de stomatites, d'aphtes et de mucites et entraîne un retard de cicatrisation (166).

Les différents mécanismes d'action des molécules précédemment citées sont représentés dans la **figure 23**.

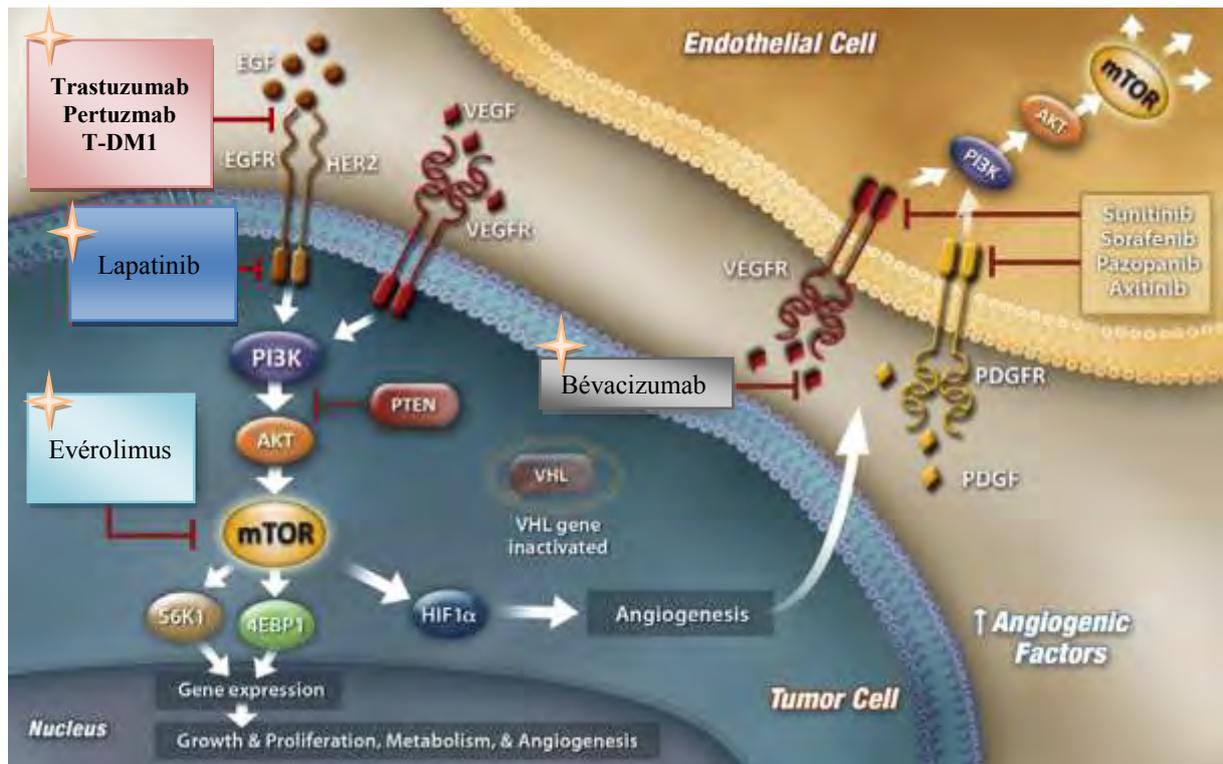


Figure 23: Schéma récapitulatif des mécanismes d'action des thérapies ciblées (✦) utilisées dans la prise en charge du cancer du sein. modifié d'après (167)

Le schéma représente le site d'action des anticorps monoclonaux anti-HER2 au niveau du domaine extracellulaire du récepteur HER2 (trastuzumab, pertuzumab, et T-DM1), l'inhibition de mTOR par l'évérolimus, l'action intracellulaire du lapatinib au niveau du dimère HER2/HER1 et l'action anti-VEGF du bévacizumab.

## VII. Mécanismes de résistance aux thérapies ciblées

### VII.1. Trastuzumab

Lors du traitement par trastuzumab, on constate une résistance primaire dans 60 à 70% des cas en monothérapie et dans 30 à 50% des cas en association. En situation métastatique, on observe fréquemment l'apparition d'un échappement thérapeutique au bout d'un an environ (168).

De nombreuses études ont décrit divers mécanismes pouvant contribuer au développement de résistance. Il a notamment été mis en évidence une forme tronquée de HER2, p95HER2 qui empêche la liaison du trastuzumab à son récepteur. Le lapatinib est une alternative pour contourner cette résistance, son mécanisme d'action étant intracellulaire, il reste actif sur cette forme tronquée. La résistance peut être également due à l'activation de voies de signalisation alternatives telles que la voie de l'IGF1 (Insulin Growth Factor1) (existence d'un cross-talk avec HER2) ou la voie médiée par HER3.

Des études ont également mis en évidence une résistance due à un encombrement stérique empêchant l'interaction du trastuzumab avec le récepteur HER2 (encombrement dû à la protéine de surface MUC4 (membrane-associated glycoprotein mucin 4) (138, 169).

Des altérations de la voie PI3K/AKT/mTOR par mutations activatrices du gène *PIK3CA* ou par perte d'expression de PTEN entraînant une hyperactivation de la voie sont également à l'origine de résistance (170). La combinaison du trastuzumab à d'autres molécules telles que les inhibiteurs de mTOR ou des inhibiteurs de PI3K pourrait éventuellement permettre de contourner cette résistance (136, 137).

## VII.2. Lapatinib

Des résistances au lapatinib ont également été caractérisées. Il a été mis en évidence que le dysfonctionnement de la voie PI3K, par perte d'expression de PTEN ou par mutations activatrices de *PIK3CA* conduisait à une résistance au lapatinib (94).

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

### VII.3. Anti-œstrogènes

On assiste également au développement de résistance aux thérapies anti-œstrogéniques et plus particulièrement au tamoxifène.

Les résistances aux anti-œstrogènes peuvent être primaires ou acquises. Elles peuvent être dues à une altération de la signalisation des récepteurs aux œstrogènes (par perte d'expression ou mutations des récepteurs), ou consécutives à l'amplification de HER2, ou encore dues à l'activation d'autres voies de signalisation. Les mécanismes expliquant cette résistance ne sont pas encore totalement élucidés cependant il a été mis en évidence que les voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase pouvaient médier la résistance aux anti-œstrogènes. Il existe un cross-talk entre les voies PI3Kinase et la voie des RE. L'hyperactivation de la voie PI3K/AKT entraîne une résistance aux anti-œstrogènes en favorisant l'activité transcriptionnelle ligand indépendante des RE. L'hyperactivation de la voie peut être due soit à des mutations activatrices de *PIK3CA* soit à une perte d'expression de PTEN. Elle entraîne la phosphorylation par AKT et P70S6K des RE ce qui augmente la transcription des RE. Ceci pourrait justifier l'utilisation combinée des anti-œstrogènes et des inhibiteurs de mTOR ou des anti-œstrogènes et des inhibiteurs de PI3K (88).

Concernant la voie des MAPKinases, il a été mis en évidence que la P38  $\gamma$  était activée en présence de tamoxifène, entraînant le recrutement d'une signalisation des RE non classique et ayant pour conséquence une augmentation de la sensibilité des cellules aux œstrogènes et donc une diminution de l'efficacité du tamoxifène (175). P38 pourrait donc être un marqueur prédictif de la réponse au traitement et un marqueur pronostique potentiel dans les cancers du sein (176). Ceci pourrait justifier l'utilisation des anti-œstrogènes couplés à des inhibiteurs de P38.

## VIII. Biomarqueurs moléculaires et cancer du sein

Un biomarqueur se définit comme "une caractéristique mesurée objectivement et évaluée comme indicateur de processus physiologique ou pathologique ou de l'action des médicaments". Il peut être déterminé par des méthodes anatomopathologiques, biochimiques ou par des techniques de biologie moléculaire. Il existe différents types de biomarqueurs dont notamment les biomarqueurs diagnostiques mettant en évidence un état pathologique, les biomarqueurs pronostiques ainsi que les biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement et de sa tolérance (177).

La détermination de nouveaux biomarqueurs est un objectif majeur en oncologie et permettrait d'identifier des cibles potentielles pour le développement de nouvelles thérapies ciblées. L'utilisation de ces biomarqueurs permet d'optimiser les critères utiles à la personnalisation des prescriptions. Le développement de la médecine personnalisée basée sur les caractéristiques moléculaires de chaque tumeur a pour but d'obtenir une efficacité optimale des traitements tout en maintenant une toxicité contrôlée. La détermination et l'évaluation de ces biomarqueurs sont nécessaires pour comprendre la complexité des phénomènes biologiques mis en jeu dans l'oncogenèse et l'évolution tumorale. Une meilleure connaissance de ces mécanismes permettrait de mieux appréhender et d'anticiper les mécanismes de résistance aux traitements et d'améliorer ainsi la prise en charge personnalisée en évitant aux patients de recevoir des traitements parfois toxiques et inefficaces. Il est donc indispensable d'établir des corrélations clinico-biologiques et d'identifier des marqueurs moléculaires permettant de prédire la réponse aux thérapies ciblées.

**PARTIE II**  
**PARTIE EXPÉRIMENTALE**

**Étude de nouveaux biomarqueurs tumoraux et détermination de leurs impacts sur la réponse aux thérapies ciblées dans le traitement du cancer du sein**

## I. Objectifs de l'étude

Le but de l'étude était d'étudier certains biomarqueurs tumoraux tels que le statut mutationnel du gène *PIK3CA* ou encore le niveau d'expression de certaines phosphoprotéines intervenant dans les voies de signalisation impliquées dans l'oncogenèse mammaire afin d'établir des corrélations clinico-biologiques et de déterminer leur signification clinique et leur intérêt théranostique dans la prise en charge du cancer du sein.

## II. Matériels et Méthodes

### II.1. Détermination du statut mutationnel du gène *PIK3CA* par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

#### II.1.1. Patients

Cent quarante neuf échantillons de tumeurs primaires de cancer du sein infiltrant ont été analysés pour cette étude. Ces tumeurs proviennent de patientes diagnostiquées entre 2008 et 2009, traitées à l'Institut de Cancérologie de Lorraine (ICL), et incluses rétrospectivement dans cette étude. Conformément à la réglementation en vigueur, les patientes ont fait part de leur non-opposition à l'utilisation de leurs prélèvements de tumeurs.

L'analyse est faite sur une résection de la tumeur primaire, fixée à l'AFA (alcool, formol et acide acétique) et incluse en bloc de paraffine, conservée dans la tumorotheque de l'ICL. La pièce analysée est représentative de la tumeur étudiée.

#### II.1.2. Qualification des prélèvements

Une coupe de 5 µm d'épaisseur est effectuée au microtome (HM 330, Microm GmbH, Walldorf, Allemagne) à partir du bloc tumoral. La coupe contenant le tissu tumoral est ensuite placée sur une lame de verre, sur laquelle de l'albumine glycerinée (préparée extemporanément) est préalablement déposée. Cette lame est ensuite déposée sur une platine chauffante (Slide Drying Bench, Thermo Scientific, St Herblain, France) pour que la coupe s'étire sur la lame. Le surplus d'albumine glycerinée est éliminé et la lame est laissée jusqu'à séchage complet sur la platine. L'échantillon à étudier peut alors être coloré à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) pour son analyse histopathologique afin de localiser une zone tumorale contenant au moins 20% de cellules tumorales.

Cette zone est alors entourée au marqueur directement sur la lame par le médecin anatomopathologiste, ce qui permet de procéder à la macrodissection de cette zone. Des coupes de 10  $\mu\text{m}$  sont alors réalisées à l'aide d'un microtome (entre 6 à 10 coupes) (**Figure 24**). La partie macrodissequée est récupérée et placée dans un tube RNase DNase free (SafeSeal Microcentrifuge Tubes, Sorenson Biosciences, Salt Lake City, UT) pour procéder à l'extraction de l'ADN tumoral.



A: Comparaison du bloc et de la lame HES



B: Macrodissection de la zone tumorale



C: Réalisation des coupes à l'aide du microtome

**Figure 24: Qualification du prélèvement et macrodissection de la tumeur, réalisées à l'Unité de Biologie des Tumeurs de l'ICL.** Les photos ci-dessus représentent la comparaison du bloc de tumeur et de la lame HES (A), la macrodissection (B) et enfin la réalisation des coupes à l'aide du microtome (C).

### II.1.3. Extraction d'ADN

Dans chacun des tubes contenant les copeaux de tissu tumoral en paraffine, 1 mL de toluène (VWR BDH Prolabo, Fontenay Sous Bois, France) est ajouté. Le toluène a pour rôle de dissoudre la paraffine. Le tube est ensuite centrifugé 2 minutes à 20 000 tours/min à température ambiante (Centrifugeuse Jouan MR23i, Thermo Scientific). Après centrifugation, le surnageant est éliminé et 1 mL d'éthanol absolu (VWR BDH Prolabo) est ajouté pour précipiter l'ADN. Le tube est alors centrifugé une nouvelle fois (2 minutes à 20 000 tours/min). Le surnageant est ensuite éliminé par prélèvement direct à l'aide d'une pipette puis par évaporation 10 minutes à 37°C (Bioblock Scientific 92617, Barnstead Thermolyne, Dubuque, IA). L'ADN est ensuite extrait par élution à l'éthanol à l'aide du kit QIA amp DNA FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded) tissue kit (QIAGEN® GmbH, Hilden, Allemagne) selon le protocole du fabricant. Au final, 100 µL d'ADN sont récupérés (**Figure 25**).

### II.1.4. Dosage d'ADN

La quantité d'ADN présente dans le tissu tumoral est évaluée par méthode spectrophotométrique (Bio-Photometer, Eppendorf, Hambourg, Allemagne) (**Figure 25**). Une première mesure à 260 nm, longueur d'onde d'absorption maximale des acides nucléiques, est effectuée afin d'estimer la quantité d'ADN présente dans la solution. On considère qu'une unité d'absorbance correspond à 50 ng/µL d'ADN double brin. Deux mesures sont ensuite réalisées, à 280 et 320 nm, correspondant respectivement à la longueur d'onde d'absorption maximale des protéines et des ARN. On calcule ensuite le rapport  $(\text{Absorbance à } 260\text{nm} - \text{Absorbance à } 320\text{nm}) / (\text{Absorbance à } 280\text{nm} - \text{Absorbance à } 320\text{nm})$ . Le rapport calculé doit être compris entre 1,8 et 2. Si le rapport est supérieur à 2, on considère que l'échantillon d'ADN est probablement contaminé par des ARNs. Si le rapport est inférieur à 1,8, on considère alors que l'échantillon est probablement contaminé par des protéines. La présence d'ARN ou de protéines en trop grande quantité peut être responsable d'interférences lors des étapes de PCR, c'est pourquoi l'échantillon doit être purifié à nouveau.



## II.1.6. La PCR-HRM

La méthode de PCR-HRM (Polymerase Chain Reaction - High Resolution Melting) est utilisée pour détecter la présence de mutations sur l'exon 9 ou sur l'exon 20 du gène *PIK3CA*. Cette technique n'est pas spécifique d'une mutation particulière, ce qui permet de détecter toutes les mutations présentes sur ces exons. La technique PCR-HRM consiste en la mise en œuvre d'une PCR classique, nécessitant du  $MgCl_2$ , des amorces spécifiques et une Taq Polymerase, suivie d'une phase de fusion haute résolution. La PCR-HRM et l'interprétation des résultats sont réalisés avec le système Light Cycler<sup>®</sup> 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne). Au cours de la PCR, une sonde fluorescente, le RESOLIGHT va venir s'intercaler entre les ADN double brins produits lors de la réaction. La fluorescence est détectable tant que l'ADN n'est pas dénaturé. L'ADN se dénature avec la température et cette température de dénaturation est une fonction linéaire du pourcentage de guanine et de cytosine présent dans le brin étudié (Coefficient de Chargaff). Des courbes de fusion sont ainsi obtenues. En comparant le profil de fusion de l'échantillon étudié avec le profil de fusion de témoins mutés (ADN extrait de cellules MCF7 pour l'exon 9 et HT-116 pour l'exon 20) et d'un témoin non muté (ADN de cellules MDA-MB 231) il est possible de connaître le statut mutationnel de l'ADN extrait de la tumeur étudiée. L'interprétation des courbes obtenues est réalisée manuellement pour chaque échantillon à l'aide du logiciel Light Cycler SW (v. 1.5.0.39, Roche Diagnostics GmbH). Cette technique permet la détection d'ADN tumoral avec une sensibilité de 5% pour les mutations de l'exon 9 et de 10% pour les mutations de l'exon 20 (50).

Les échantillons d'ADN dilués sont déposés sur des plaques de 384 puits (Roche Diagnostics GmbH). Vingt microgrammes d'ADN sont amplifiés dans un volume final de 20  $\mu$ l. Chaque puits contient 18  $\mu$ L de mix. Ce mix est constitué de 10  $\mu$ l de Master mix (Light Cycler 480 HRM Master, Roche Diagnostics), de 2,8  $\mu$ l de  $MgCl_2$  à la concentration de 25 mM, d'eau et 1  $\mu$ l d'amorces sens et anti-sens nécessaires à la réaction de PCR. Deux microlitres d'échantillon à analyser sont ensuite placés dans chacun des puits. Chaque échantillon est passé en duplicate, par conséquent, deux puits sont nécessaires pour la réaction testant les mutations de l'exon 9 et deux puits sont nécessaires aux réactions testant les mutations de l'exon 20.

L'analyse dure approximativement 70 minutes quel que soit le nombre d'échantillons analysés. Le programme consiste en une phase de pré-incubation à 95°C de 10 minutes, puis une phase d'amplification par PCR (45 cycles constitués de 10 secondes à 95°C, un passage de 60°C à 54°C en 15 secondes puis 10 secondes à 72°C) puis la phase d'HRM (1 minute à 95°C, 1 minute à 40°C puis un passage de 65°C à 95°C par paliers de 0,02°C par seconde). Enfin le programme se termine par une phase de refroidissement de 10 minutes à 40°C (Figure 26) (178, 179).

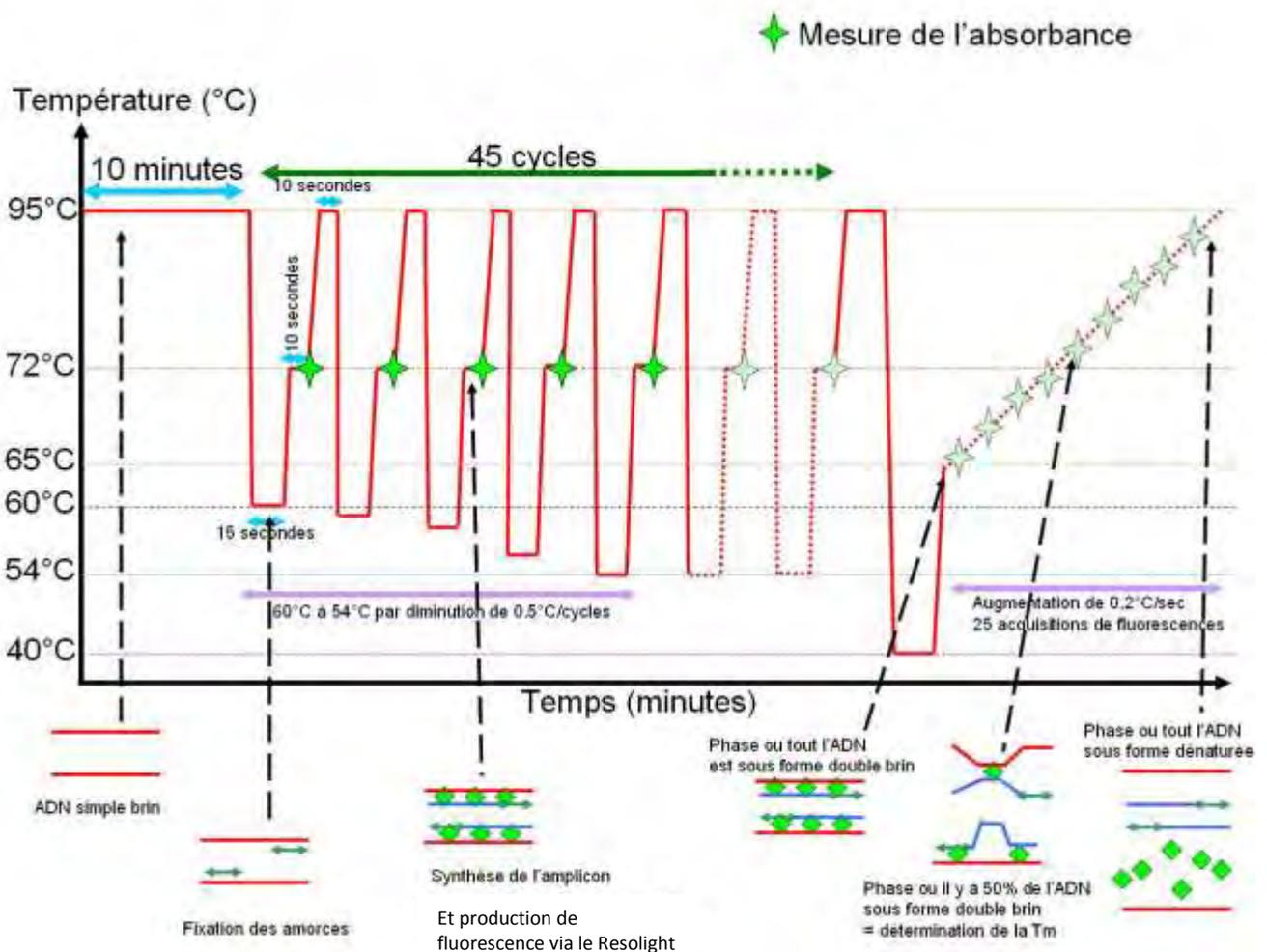


Figure 26: Principe de la PCR-HRM (D'après Lozano.N, LP GMC, UBT).

Le schéma représente les différentes phases de la PCR-HRM: la phase de PCR classique avec la synthèse des amplicons suivie de la phase de fusion haute résolution pendant laquelle l'augmentation de la température par palier de 0.02C par seconde entraine la cassure des doubles brins d'ADN et donc la diminution de la fluorescence.

### II.1.7. La PCR-ARMS Scorpion

La PCR-ARMS-Scorpion (Amplification Refractory Mutational System) est une technique visant à identifier de manière spécifique certaines mutations en utilisant des amorces ARMS. Ces amorces sont dessinées de telle manière que le dernier nucléotide présent sur cette amorce correspond à la mutation. Cette technologie utilise la *Taq* DNA (Deoxyribonucléic acid) Polymerase qui est une enzyme extrêmement sensible aux mésappariements des bases. Ainsi, si la moindre mutation sur l'allèle spécifique est présente, l'amplification ne pourra avoir lieu, ce qui permettra une amplification sélective des séquences mutées.

Cette technique utilise en complément des amorces Scorpion. Ces amorces en forme d'épingle possèdent un fluorochrome qui émet une fluorescence détectable lorsqu'il est excité et un quencher qui permet d'absorber la fluorescence émise par le fluorochrome, lorsqu'ils sont très proches l'un de l'autre (**Figure 27**).



**Figure 27: Schéma d'une amorce Scorpion. (D'après Lozano.N, LP GMC, UBT)**

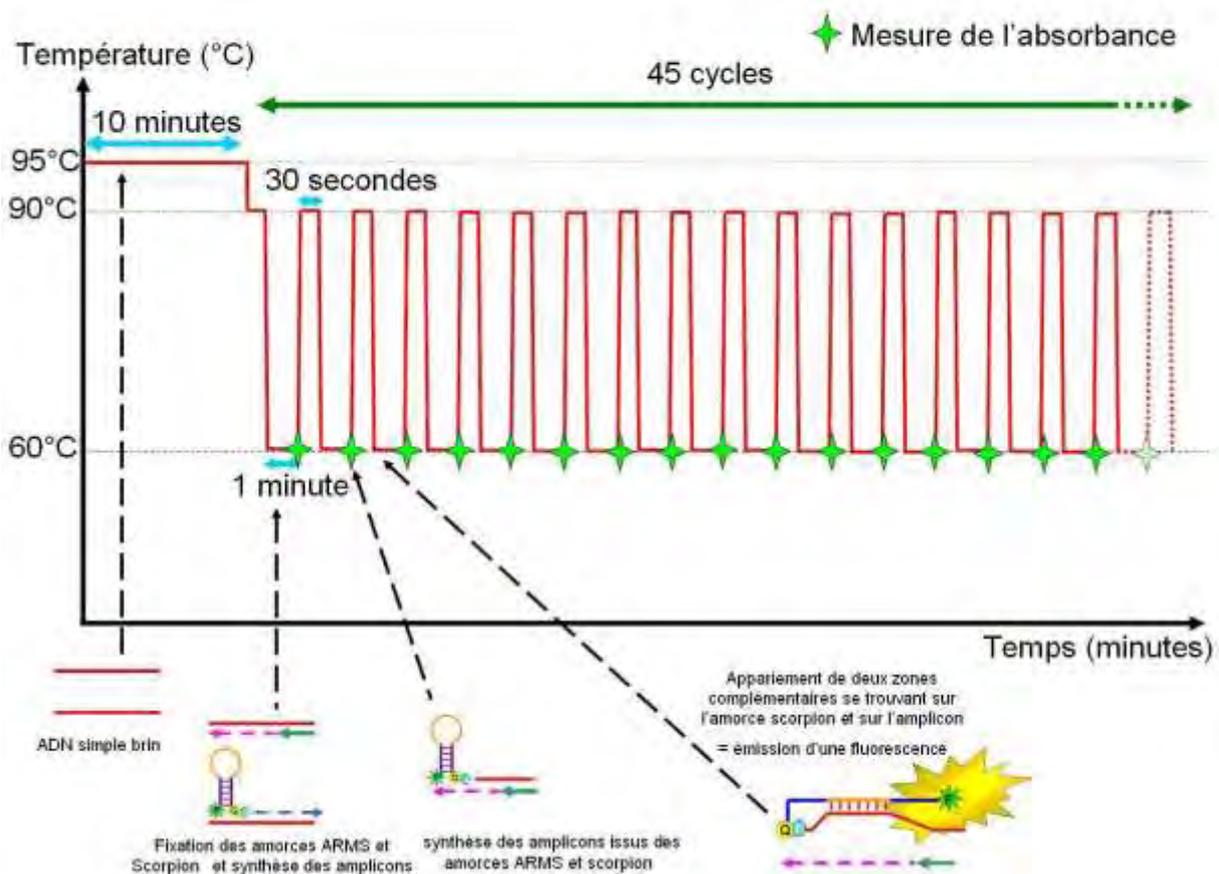
Les amorces Scorpion sont constituées d'un fluorochrome F, d'un quencher Q (molécule qui absorbe la fluorescence du fluorochrome F lorsqu'il est proche de celui-ci), d'un bloqueur B, molécule empêchant la réplication de la boucle de l'amorce par la *Taq* polymérase.

Cette amorce possède également un bloqueur empêchant l'enzyme utilisée de répliquer la boucle de cette amorce. Cette boucle possède une particularité importante, celle d'être complémentaire d'une zone de l'amplicon néosynthétisé. Cette complémentarité engendre l'éloignement du quencher et du fluorochrome, ce qui permet alors l'apparition d'une fluorescence que l'on pourra mesurer. En combinant les amorces ARMS et Scorpion il est donc possible de détecter la présence ou non de mutations spécifiques (**Figure 28**).

On obtient ainsi des courbes d'amplification. La comparaison du profil des courbes d'amplification des échantillons étudiés avec celui des courbes des témoins mutés (ADN de

cellules Cal51 pour la mutation E542K, ADN de cellules MCF-7 pour la mutation E545K, ADN de cellules HCT116 pour la mutation H1047R et ADN de cellules SUM159PT pour la mutation H1047L) et non muté (ADN de cellules MDA-MB 231) permet de déterminer le statut mutationnel de l'échantillon analysé. Tout comme pour la PCR-HRM, l'interprétation des résultats est réalisée manuellement pour chaque échantillon à l'aide du logiciel Light Cycler SW (v. 1.5.0.39, Roche Diagnostics GmbH). En raison de son mode de fonctionnement particulier, cette PCR possède une sensibilité de détection élevée, de l'ordre de 1% (180).

On réalise 4 mix pour chaque mutation. Pour chaque échantillon, on utilise 0,06 µl de Hot Diamond Taq polymerase (eurogentec, Angers, France), 2 µl de reaction buffer 10X (Eurogentec), 3,2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Eurogentec), 0,4 µl de (désoxyribonucléotide triphosphate) dNTP à 10Mm, de l'eau, 0,8 µl d'amorces ARMS à 6.25 µM et 0,8 µl d'amorces Scorpion à 6,25 µM (ATD Bio, Southampton, United Kingdom). Dix-huit microlitres de mix sont ajoutés et 2 µl d'échantillon ont été utilisés pour l'analyse (180).



**Figure 28: Principe de la PCR-ARMS Scorpion. (D'après Lozano.N, LP GMC, UBT)**

La PCR-ARMS utilise 2 types d'amorces: les amorces ARMS et les amorces Scorpion. C'est une technique de PCR qui est spécifique d'une mutation particulière.

### II.1.8. Interprétation statistique des résultats

La concordance des résultats obtenus par les méthodes étudiées pour l'étude des mutations de *PIK3CA* est analysée par le test kappa (k) de Fleiss. On calcule ainsi un coefficient k représentatif de l'homogénéité des résultats obtenus par les deux méthodes. Plus k est proche de 1 et plus la concordance entre les méthodes est grande. A l'inverse, un k inférieur à 0.5 sera synonyme d'une mauvaise concordance entre les méthodes. L'objectif de notre étude est de comparer les résultats obtenus en analysant par les deux méthodes les 149 échantillons sélectionnés. Nous considérerons que les deux méthodes donnent des résultats significativement comparables si le kappa calculé est supérieur à 0,8. Un test du  $\chi^2$  a ensuite été réalisé pour comparer nos résultats à ceux de la littérature.

Les résultats des mutations ont ensuite été corrélés aux paramètres cliniques et pathologiques tels que l'âge des patientes au diagnostic, le type histologique, le grade SBR, mais aussi aux caractéristiques moléculaires des tumeurs telles que le statut des récepteurs hormonaux (récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone) et le statut HER2. Ces données ont été collectées lors de l'étude des dossiers patients. Les corrélations ont été calculées à l'aide d'un test du  $\chi^2$  et d'un test de Fisher. La limite de significativité était de  $p < 0,05$ .

## II.2. Étude du niveau d'expression des phosphoprotéines des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase

### II.2.1. Patients

Quarante-cinq échantillons de tumeurs congelées de cancers du sein infiltrants canaux ont été analysés. Les échantillons proviennent de la tumorotheque de l'Institut. Il s'agit de tumeurs de patientes diagnostiquées et traitées en 2006 à l'ICL. Ces patientes ont fait part de leur non opposition à l'utilisation de ces échantillons pour la recherche. L'âge médian au diagnostic était de 56.3 ans (entre 28 et 91 ans). Ces échantillons ont été prélevés pendant la chirurgie et congelés immédiatement après dans de l'azote liquide à -80°C. On peut noter qu'aucune des patientes n'avaient reçu de traitement néoadjuvant de chimiothérapie ou d'hormonothérapie. Le poids moyen des échantillons était de 15,2 mg. A partir de ces prélèvements, une coupe au cryostat a été réalisée puis une lame avec une coloration HES. Un médecin anatomopathologiste a ensuite déterminé le pourcentage tumoral de la coupe. Un minimum de 50% de matériel tumoral était nécessaire pour permettre la détermination du niveau d'expression des phosphoprotéines par la technique Bioplex<sup>®</sup> Protein Array (BPA) (Bioplex ; Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### II.2.2. Extraction des protéines

Les échantillons de tumeurs ont d'abord été broyés pendant 15 minutes avec des billes en acier (Qiagen, Courtaboeuf, France), puis ont ensuite été exposés pendant 10 secondes à une solution de lyse (Cell Lysis Kit, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) contenant une anti-protéase, le phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF). Le mélange a ensuite été centrifugé à 4 500 tours pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines a été recueilli et congelé à -80°C jusqu'à l'analyse. Avant d'être analysé par la technique BPA, la concentration en protéine de chaque extrait a été déterminée en utilisant un kit de dosage colorimétrique (kit basé sur la technique de Lowry à 690 nm, et ajusté à 250 pg / ml) (181).

### II.2.3. Technique d'analyse BPA

La technique BPA permet la détection et la quantification de multiples analytes (protéines, peptides ou acides nucléiques) dans un volume d'échantillon unique et à partir d'une petite quantité de tissu (15 à 20 mg). Il s'agit d'une technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sur microbilles en suspension, identifiées par un code couleur spécifique avec une détection fluorimétrique. L'analyse est réalisée en microplaques de 96 puits. Elle détermine de façon semi-quantitative précise et simultanée le niveau d'expression de multiples phosphoprotéines intervenant dans les voies de signalisation. Il existe 100 types de microbilles qui diffèrent dans leur couleur de fluorescence permettant la détection de 100 molécules différentes à la fois.

Cette technique se divise en plusieurs étapes. Au départ, les microbilles de polystyrène en suspension portent l'anticorps primaire spécifique du biomarqueur. Lorsque l'on ajoute les échantillons, il y a fixation des biomarqueurs sur les anticorps primaires. Les anticorps secondaires biotinylés se fixent alors aux anticorps primaires. On ajoute ensuite dans chaque puits de la streptavidine phycoérythrine (PE) qui se fixe à la biotine et qui permet l'émission de fluorescence. Un échantillon du mélange réactionnel final est aspiré par le détecteur. La détection de la fluorescence se fait à l'aide d'un système optique comprenant deux lasers (un vert et un rouge). Le premier laser (rouge) identifie le biomarqueur présent sur la bille via le code couleur de la bille correspondante, le second laser (vert) détermine quant à lui la concentration en biomarqueur (**Figure 29**). Le système de détection effectue un minimum de 150 mesures par analyte à raison de 100 mesures par minute.

Une fois extraites, les protéines sont ensuite transférées dans une plaque 96 puits et diluées dans une solution tampon de 25 microlitres. Nous avons utilisé des billes portant des anticorps dirigés contre les protéines P38MAPKinase, phospho-P38MAPKinase (p-P38MAPKinase), phospho-AKT (p-AKT), phospho-GSK3 (p-GSK3) (Glycogene synthase kinase 3 $\beta$ ), phospho-P70S6K (p-P70S6K), phospho-MEK1 (p-MEK1), et phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2).

Le mélange de billes est ajouté dans chaque puits et incubé pendant une nuit à 37°C. Après cette incubation, la plaque est lavée puis les anticorps biotinylés sont ajoutés ce qui permet la fixation des protéines cibles.

On ajoute ensuite la solution de streptavidine-phycoérythrine. Un contrôle positif constitué de protéines extraites de lignées cellulaires de cancer du sein MCF7, surexprimant HER, est ensuite ajouté dans chaque série. On procède ensuite à l'analyse par la technique BPA (181).

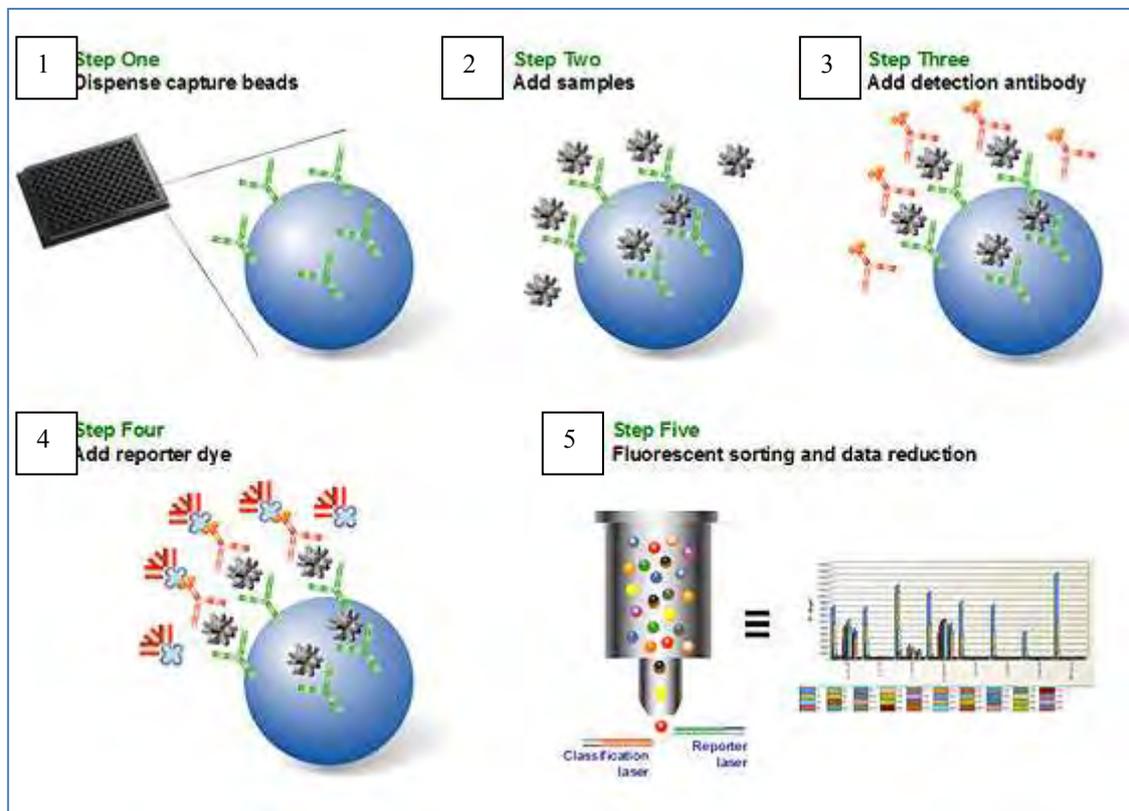


Figure 29: Les différentes étapes de l'analyse par technique BPA. (D'après Site internet Bio-Rad)

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

#### II.2.4. Analyse des résultats

Les analyses ont été réalisées en triplicate. Nous avons ensuite calculé la moyenne des valeurs des intensités de fluorescence. La valeur était considérée comme significative lorsque le ratio signal/bruit était supérieur à 3.

L'analyse statistique des résultats a été effectuée par un test de Wilcoxon à l'aide du logiciel R ( $p < 0,05$ ). Les niveaux d'expression des phosphoprotéines ont ensuite été corrélés avec certaines données cliniques telles que l'âge des patientes, la taille des tumeurs, le grade SBR mais également avec les caractéristiques moléculaires des tumeurs (statut RH, statut HER2). Ces données ont été collectées lors de l'étude des dossiers des patientes.

### III. Résultats

#### III.1. Résultats de l'étude des mutations du gène *PIK3CA*

##### III.1.1. Détermination du statut mutationnel du gène *PIK3CA* avec deux techniques de PCR-temps réel.

Sur les 149 échantillons analysés, uniquement 102 ont donné des résultats interprétables à la fois par PCR-HRM et par PCR-ARMS. Vingt-huit échantillons présentent des mutations du gène *PIK3CA* par PCR-HRM soit 27,5% et 23 par PCR-ARMS soit 22,5%.

Sur les 28 échantillons mutés en HRM, 13 (46,4%) présentent une mutation de l'exon 9 et 15 (53,6%) une mutation de l'exon 20.

Sur les 23 échantillons pour lesquels on retrouve une mutation par PCR-ARMS, 9 sont mutés sur l'exon 9 (39,1%) dont 6 présentant une mutation E542K (26,1%) et 3 une mutation E545K (13%). 14 présentent une mutation de l'exon 20 dont 10 portant une mutation H1047R (43,5%) et 4 une mutation H1047L (17,4%).

Quelque soit la technique, aucun échantillon n'a présenté à la fois une mutation sur l'exon 9 et sur l'exon 20. Les résultats de l'étude du statut mutationnel du gène *PIK3CA* déterminé par les 2 techniques de PCR sont résumés dans le **Tableau IV (Annexe 2)**.

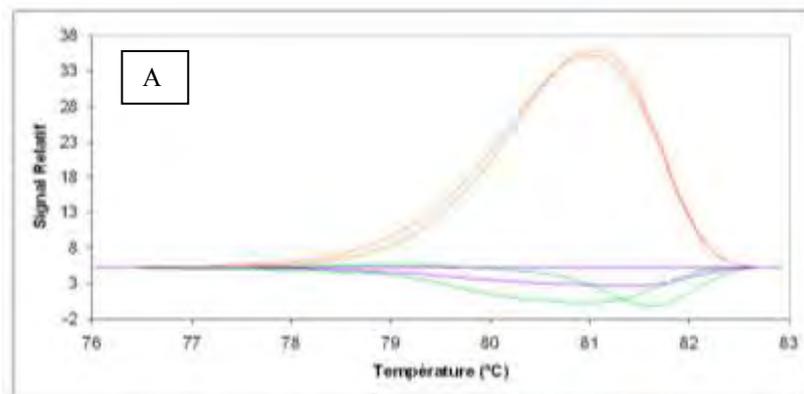
Tableau IV: Mutations du gène *PIK3CA* détectées par PCR-HRM et PCR-ARMS

<b>Exon/position de la substitution</b>	<b>Mutations</b>	<b>Nombre d'échantillons</b>	<b>% relatif</b>	<b>% total</b>
<b>PCR-ARMS</b>				
<b>Exon 9</b>				
c.1624G→A	E542K	6	26.1	5.9
c.1633G→A	E545K	3	13.0	2.9
<b>Exon 20</b>				
c.3140A→G	H1047R	10	43.5	9.8
c.31401→T	H1047L	4	17.4	3.9
<b>Total</b>		23	100.0	22.5
<b>PCR-HRM</b>				
<b>Exon 9</b>				
		13	46.4	12.8
<b>Exon 20</b>				
		15	53.6	14.7
<b>Total</b>		28	100.0	27.5

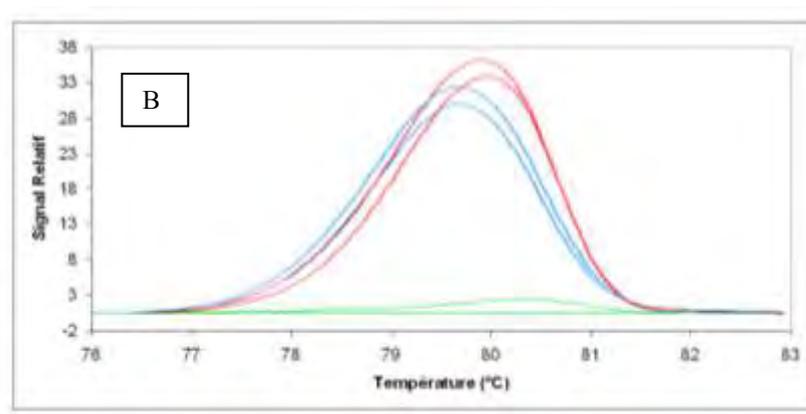
Le statut mutationnel du gène *PIK3CA* des échantillons étudiés a été déterminé en analysant le profil des courbes de fusion obtenues par PCR-HRM (**Figure 30**), ainsi que le profil des courbes d'amplification obtenues par PCR-ARMS (**Figure 31**).

Ces courbes permettent de visualiser si l'exon étudié (exon 9 ou 20) est muté.

Lorsque le profil des courbes de l'échantillon est proche du témoin non muté, l'échantillon est non muté, à l'inverse lorsque les courbes obtenues pour l'échantillon ont une allure analogue à celles obtenues avec le témoin muté, on peut conclure que l'échantillon est porteur d'une mutation sur l'exon étudié.



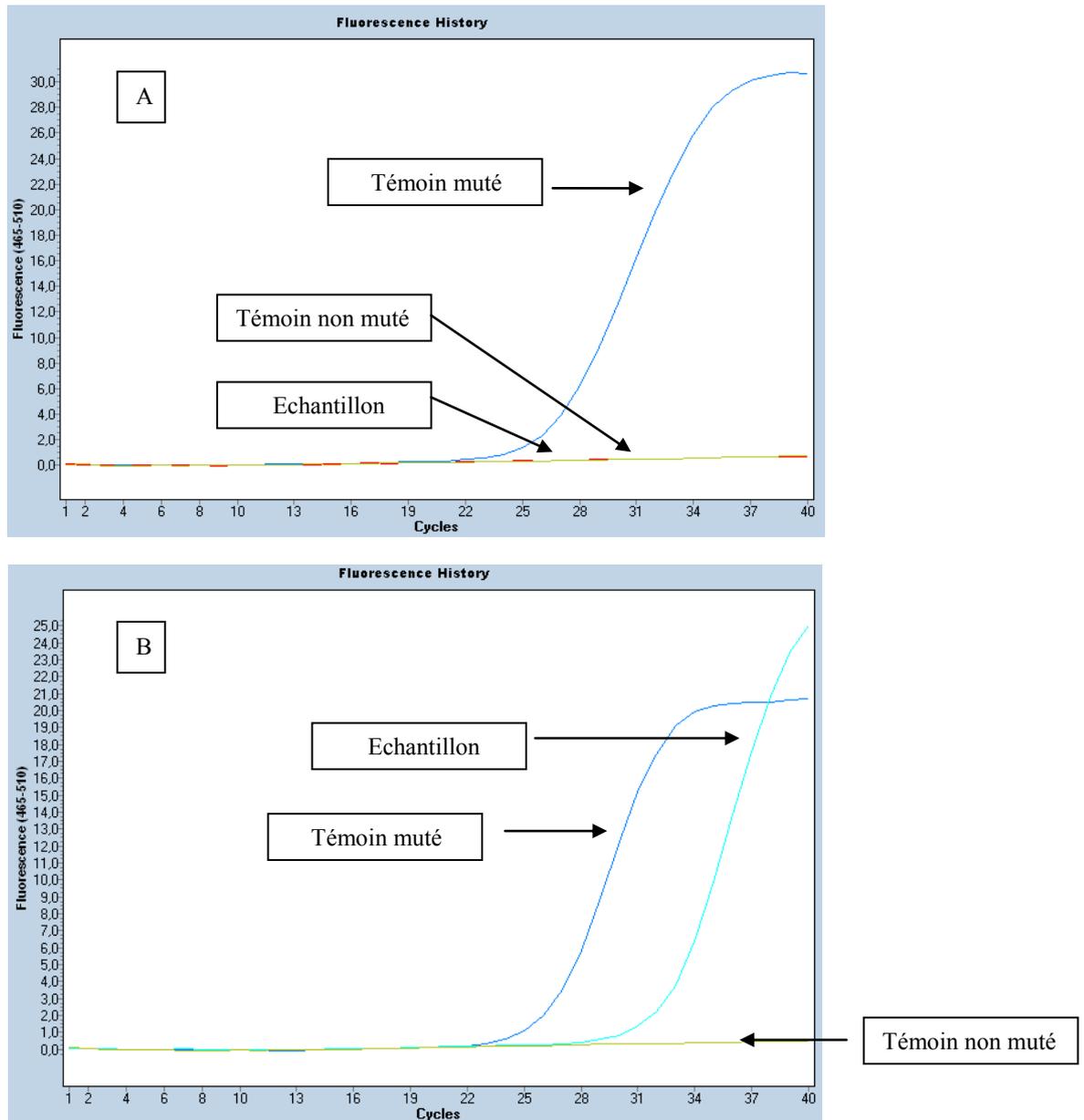
--> Orange: Témoin muté, Violet: Témoin non muté, Vert: Patient



--> Vert: Témoin non muté, Rouge: Témoin muté, Bleu: Patient

**Figure 30: Profils des courbes de fusion obtenues par PCR-HRM.**

Exemple de profil d'une courbe de fusion d'un échantillon ne portant pas de mutation du gène *PIK3CA* (A).  
Exemple de profil d'une courbe de fusion d'un échantillon portant une mutation du gène *PIK3CA* (B).



**Figure 31: Profil des courbes d'amplification obtenues par PCR-ARMS**

Le statut mutationnel du gène *PIK3CA* est déterminé par comparaison des profils des courbes d'amplification obtenues par PCR-ARMS. La figure 31.A représente une courbe d'amplification d'un échantillon non muté et la figure 31.B une courbe d'amplification d'un échantillon présentant une mutation du gène *PIK3CA*.

La concordance des résultats obtenus par les deux techniques a été mesurée en utilisant le Kappa de Fleiss. Le kappa calculé est de 0,845 ( $p < 0,001$ ).

Les résultats trouvés avec les deux techniques sont donc statistiquement comparables. Ces résultats sont résumés dans le **Tableau V (Annexe 2)**.

**Tableau V: Concordance des mutations détectées par les deux techniques de PCR temps réel**

	<i>PCR-HRM</i>		
	Muté	Non muté	total
<b><i>PCR-ARMS</i></b>			
<b>Nombre d'échantillons</b>			
Muté	22	1	23
Non muté	6	73	79
Total	28	74	102

### III.1.2. Etude des paramètres clinico-biologiques des tumeurs

#### III.1.2.1. Relation entre le statut mutationnel du gène *PIK3CA* déterminé par PCR-HRM et les caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des tumeurs

Cent dix-huit échantillons ont été analysés par PCR-HRM. Des mutations des exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* ont été détectées dans 30 échantillons (27,5%). Aucune relation statistiquement significative n'a été mise en évidence entre le statut mutationnel du gène *PIK3CA* et l'âge des patientes, le type histologique des tumeurs, le statut des récepteurs hormonaux, le statut HER2, ni avec les 4 sous types suivants: HER2+/HR+, HER2+/HR-, HER2-/RH+ et HER2-/RH-.

La présence de mutations du gène *PIK3CA* a été comparée au grade SBR des tumeurs ( $p=0,050$ ). Un taux plus faible de mutations a été détecté dans les tumeurs de haut grade avec notamment moins de mutations de l'exon 9 dans les tumeurs de grade III ( $P=0,025$ ).

Les mutations de l'exon 9 sont retrouvées plus fréquemment dans les tumeurs de grade SBRI contrairement aux mutations de l'exon 20 qui elles sont plus fréquemment retrouvées dans les tumeurs de grade II et III.

Les résultats sont résumés dans le **Tableau VI (Annexe 2)**.

**Tableau VI: Corrélation entre le statut mutationnel du gène *PIK3CA* déterminé par PCR-HRM et les caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des tumeurs**

	<b>Nombre de patients (%)</b>			<b>P-value</b>
	<b>Total/classe</b>	<b>Non muté <i>PIK3CA</i></b>	<b>Muté <i>PIK3CA</i></b>	
<b>Total</b>	118 (100.0)	88 (72.5)	30 (27.5)	
<b>Age au diagnostic</b>				
≤50	36 (30.5)	26 (72.2)	10 (27.8)	0.873
>50	82 (69.5)	62 (75.6)	20 (24.4)	
<b>Type histologique</b>				
Canalaire	102 (86.4)	73 (71.6)	29 (28.4)	0.137
Lobulaire	15 (12.7)	14 (93.3)	1 (6.7)	
Autres	1 (0.8)	1 (100.0)	0 (0.0)	
<b>Statut des récepteurs aux œstrogènes (RE)</b>				
RE+	94 (81.7)	71 (75.5)	23 (24.5)	0.910
RE-	21 (19.3)	15 (71.4)	6 (28.6)	
<b>Statut des récepteurs à la progestérone (RP)</b>				
RP+	74 (64.3)	57 (77.0)	17 (23.0)	0.603
RP-	41 (35.7)	29 (70.7)	12 (29.3)	
<b>Statut HER2</b>				
HER2+	12 (10.4)	9 (75.0)	3 (25.0)	1.000
HER2-	103 (89.6)	77 (74.8)	26 (25.2)	
<b>Statut des Récepteurs Hormonaux (RH)</b>				
RH+	95 (82.3)	72 (75.8)	23 (24.2)	0.796
RH-	20 (27.7)	14 (70.0)	6 (30.0)	
<b>Statut RE/HER2</b>				
HER2+/HR+	8 (7.0)	7 (87.5)	1 (12.5)	0.575
HER2-/HR+	87 (7.6)	65 (74.7)	22 (25.3)	
HER2+/HR-	4 (3.5)	2 (50.0)	2 (50.0)	
HER2-/HR-	16 (13.9)	12 (75.0)	4 (25.0)	
<b>Grade SBR</b>				
I	14 (11.9)	8 (57.1)	6 (42.9)	0.050
II	56 (47.5)	39 (69.6)	17 (30.4)	
III	48 (40.7)	41 (85.4)	7 (14.6)	

### III.1.2.2. Relation entre le statut mutationnel du gène *PIK3CA* déterminé par PCR-ARMS et les caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des tumeurs

Cent-quarante-neuf échantillons de tumeurs ont été analysés par PCR-ARMS. Des mutations du gène *PIK3CA*, exon 9 et 20 ont été détectées dans 27 échantillons (18,1%). Aucune relation statistiquement significative n'a été mise en évidence entre le statut mutationnel du gène *PIK3CA* et l'âge des patientes, le type de tumeur, le statut des récepteurs hormonaux, le statut HER2, et les 4 sous-types HER2+/RH+, HER2+/RH-, HER2-/RH-, et HER2-/RE-.

Comme pour la PCR-HRM, nous retrouvons uniquement une relation entre le statut mutationnel du gène *PIK3CA* et le grade SBR des tumeurs ( $P=0,004$ ) avec un taux de mutation plus faible dans les tumeurs de haut grade. On constate que les mutations des exons 9 et 20 sont moins fréquentes dans les tumeurs de grade SBR III ( $P=0,009$ ). Les mutations de l'exon 9 ont été retrouvées de façon prédominante dans les tumeurs de grade I (5/7), tandis que les mutations de l'exon 20 ont été plus fréquemment observées dans les tumeurs de grade SBR II et III (13/20).

Les résultats sont résumés dans le **Tableau VII (Annexe 2)**.

**Tableau VII: Corrélation entre le statut mutationnel du gène *PIK3CA* déterminé par PCR-ARMS et les caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires des tumeurs**

	Total/classe	Nombre de patients (%)		P-value
		Non muté <i>PIK3CA</i>	Muté <i>PIK3CA</i>	
Total	149 (100.0)	122 (81.9)	27 (18.1)	
<b>Age au diagnostic</b>				
≤50	48 (30.5)	36 (72.2)	12 (27.8)	0.202
>50	101 (69.5)	86 (75.6)	15 (24.4)	
<b>Type histologique</b>				
Canalaire	127 (85.2)	102 (71.6)	25 (28.4)	0.521
Lobulaire	19 (12.8)	17 (93.3)	2 (6.7)	
Autres	3 (2.0)	2 (66.7)	1 (33.3)	
<b>Statut des récepteurs aux œstrogènes (RE)</b>				
RE+	113 (81.7)	93 (75.5)	20 (24.5)	0.981
RE-	30 (19.3)	24 (71.4)	6 (28.6)	
<b>Statut des récepteurs à la progestérone (RP)</b>				
RP+	88 (64.3)	71 (77.0)	17 (23.0)	0.823
RP-	55 (35.7)	46 (70.7)	9 (29.3)	
<b>Statut HER2</b>				
HER2+	19 (10.4)	16 (75.0)	3 (25.0)	1.000
HER2-	124 (89.6)	101 (74.8)	23 (25.2)	
<b>Statut des Récepteurs Hormonaux (RH)</b>				
RH+	115 (82.3)	95 (75.8)	20 (24.2)	0.823
RH-	28 (27.7)	22 (70.0)	6 (30.0)	
<b>Statut RE/HER2</b>				
HER2+/HR+	13 (7.0)	12 (87.5)	1 (12.5)	0.593
HER2-/HR+	102 (7.6)	83 (74.7)	19 (25.3)	
HER2+/HR-	6 (3.5)	4 (50.0)	2 (50.0)	
HER2-/HR-	22 (13.9)	18 (75.0)	4 (25.0)	
<b>Grade SBR</b>				
I	14 (11.9)	7 (57.1)	7 (42.9)	0.004
II	67 (47.5)	55 (69.6)	12 (30.4)	
III	64 (40.7)	56 (85.4)	8 (14.6)	

### III.2. Résultats de l'étude du niveau d'expression des phosphoprotéines des voies PI3Kinase et MAPKinase

#### III.2.1. Recueil des caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs

Les caractéristiques des tumeurs sont résumées dans le tableau ci-après (*Tableau VIII*) (*Annexe 3*).

**Tableau VIII: Caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs de sein infiltrantes canalaies**

<u>Caractéristiques des tumeurs</u>	Nombre de patientes (%)
<u>Nombre total de patientes</u>	45 (100%)
<u>Age (Années)</u>	
≤50	13 (28.9)
51-69	24 (53.3)
≥70	8 (17.8)
<u>Taille de la tumeur (mm)</u>	
T1 (10-20)	16 (35.6)
T2 (21-50)	26 (57.8)
T3 (>51)	3 (6.7)
<u>Grade SBR</u>	
SBR II	11 (24.4)
SBR III	34 (75.6)
<u>Statut des RH</u>	
ER+	29 (64.4)
ER-	16 (35.6)
PR+	18 (40.0)
PR-	27 (60)
<u>Statut HER2</u>	
HER2+	15 (33.3)
HER2-	30 (66.7)
<u>Tumeurs (HER2-/RE-/RH-)</u>	10 (22.2)

### III.2.2. Corrélation entre le niveau d'expression des phosphoprotéines et les caractéristiques cliniques et moléculaires des tumeurs

Les résultats sont présentés sous forme de box-plots (**Figure 32, 33, 34**), illustrant la valeur médiane (barre centrale), le premier et le troisième quartiles représentés respectivement par le bas et le haut de la boîte et les valeurs minimales et maximales (barre du haut et barre du bas).

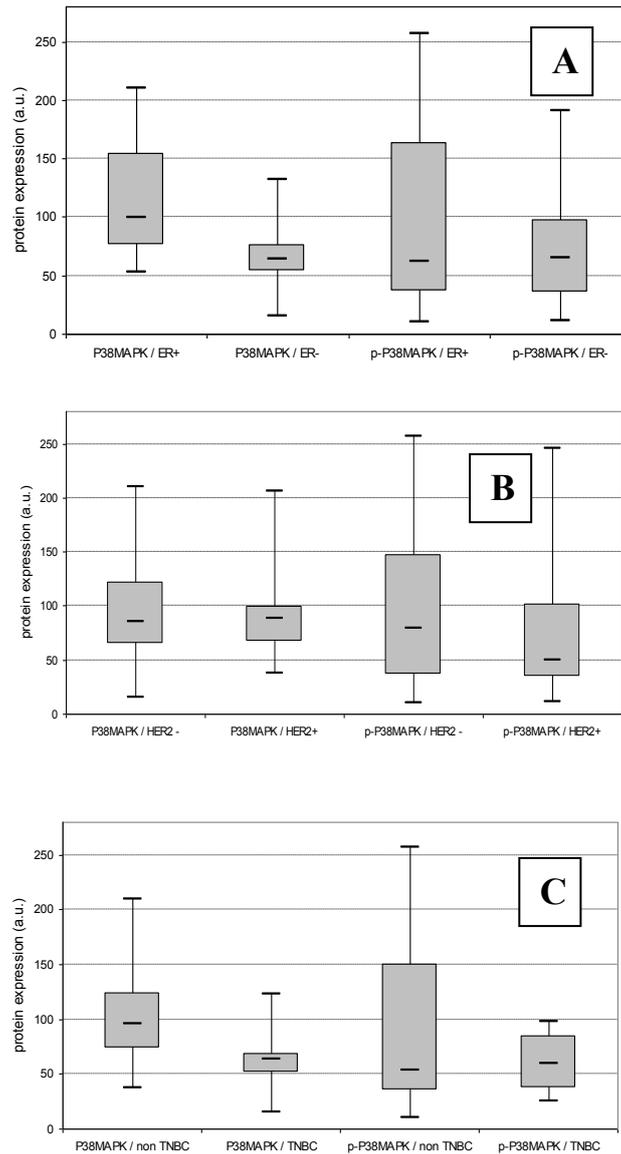
#### **P38MAPKinase**

On a représenté le niveau d'expression de P38MAPKinase et de p-P38MAPKinase en fonction du statut des récepteurs œstrogéniques (**Figure 32A**) puis en fonction du statut HER2 des tumeurs (**Figure 32B**) et enfin en fonction du statut triple négatif des tumeurs (**Figure 32C**).

La P38MAPKinase et la p-P38MAPKinase sont exprimées dans la quasi-totalité des tumeurs analysées. On retrouve en effet une expression de ces protéines dans 44 échantillons soit dans 98% des tumeurs analysées.

On constate que leur niveau d'expression est significativement supérieur dans les tumeurs RE+ ( $P=0,0016$ ). Le statut HER2+ n'a quant à lui aucune influence sur le niveau d'expression de P38MAPKinase et de p-P38MAPKinase. La P38MAPKinase et sa forme phosphorylée ont en revanche une faible expression dans les tumeurs triple-négatives mais cette baisse d'expression n'est pas statistiquement significative.

Le taux de phosphorylation (ratio p-P38MAPKinase/P38MAPKinase) n'est pas statistiquement différent en fonction du type de tumeurs ou du grade SBR.



**Figure 32: Expression de P38MAPK et de p-P38MAPK en fonction du type de tumeurs**

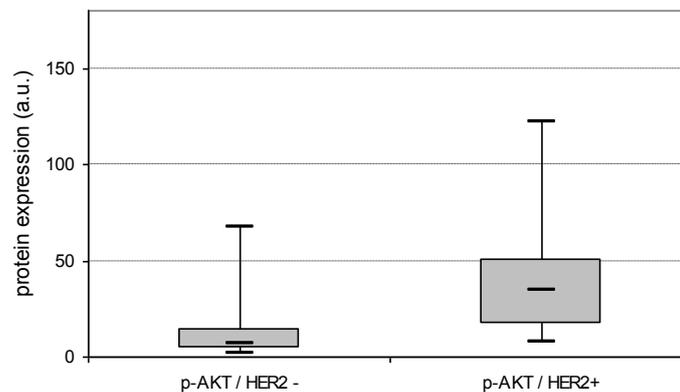
La figure 32A représente le niveau d'expression de la P38MAPK et de la p-P38MAPK en fonction du statut des récepteurs œstrogéniques des tumeurs, la figure 32B leurs niveaux d'expression en fonction du statut HER2 des tumeurs et enfin la figure 32C représente leurs niveaux d'expression en fonction du statut triple-négatif des tumeurs (Annexe 3).

## p-AKT et p-ERK

Une expression significative de p-AKT et de p-ERK a été mise en évidence dans respectivement 33 échantillons analysés soit 73% et 17 échantillons soit 38%.

### ➤ p-AKT

L'expression de p-AKT est significativement supérieure dans les tumeurs HER2+ ( $p=0,0048$ ) (**Figure 33**). Aucune autre différence significative du niveau d'expression des phosphoprotéines n'a été mise en évidence en fonction du statut des récepteurs hormonaux, du statut triple-négatif ou encore en fonction du grade histopronostique des tumeurs.

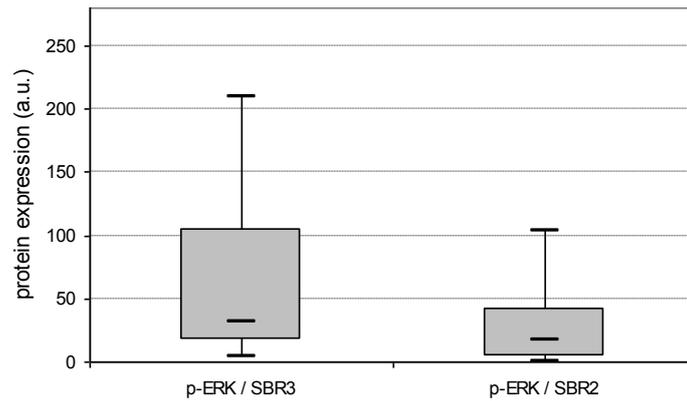


**Figure 33: Niveau d'expression de p-AKT en fonction du statut HER2 des tumeurs.**

La box-plot met en évidence un niveau d'expression de p-AKT supérieur dans les tumeurs mammaires HER2+ (**Annexe 3**).

### ➤ p-ERK

L'expression de p-ERK est significativement supérieure dans les tumeurs de grade III ( $P=0,0235$ ) (**Figure 34**). En revanche, aucune différence significative de son expression n'a été mise en évidence en fonction du statut RE, HER2 ou TN.



**Figure 34: Niveau d'expression de p-ERK en fonction du grade SBR des tumeurs.**

La box-plot met en évidence un niveau d'expression de p-ERK supérieur dans les tumeurs de grade histopronostique SBR III (**Annexe 3**).

### **p-MEK1, p-GSK3 $\beta$ , p-S6K**

Une expression significative des formes phosphorylées de MEK1, GSK3 $\beta$  et S6K a été respectivement détectée dans 39 échantillons (87%), 31 (69%), et 37 (82%). Mais aucune relation statistiquement significative n'a été mise en évidence entre ces formes phosphorylées et les statuts RE, TN, HER2 ou le grade SBR.

## IV. Discussion

### IV.1. Statut mutationnel du gène *PIK3CA*

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur de la voie PI3K/AKT/mTOR dans l'oncogenèse mammaire et l'impact des mutations du gène *PIK3CA* dans l'apparition de résistances aux traitements. Les recherches actuelles ont pour but de déterminer les valeurs prédictive et pronostique de ces mutations mais également d'identifier des corrélations clinico-biologiques afin de mieux comprendre leurs impacts sur les tumeurs mammaires. Ces différents paramètres pourraient justifier l'intérêt de leur détection en génétique tumorale et leur utilisation comme cible thérapeutique.

Dans la présente étude, les mutations des exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* ont été déterminées par deux techniques de PCR temps réel, la PCR-HRM, PCR de fusion haute résolution, et la PCR-ARMS qui elle est une PCR spécifique d'allèle.

Le statut mutationnel n'a pas pu être déterminé pour l'ensemble des échantillons analysés, certaines analyses ayant donné des résultats ininterprétables. La présence de résultats ininterprétables s'explique par le fait que certains échantillons présentaient un ADN de mauvaise qualité. Cette mauvaise qualité peut être causée par un certain nombre de paramètres et plus particulièrement par tout ce qui concerne le traitement pré-analytique des échantillons. Le temps d'ischémie chaude (temps entre le début de l'intervention chirurgicale et la ligature des derniers vaisseaux), et le temps d'ischémie froide (temps entre la ligature des derniers vaisseaux et l'arrivée de la pièce au laboratoire d'anatomopathologie) influencent la qualité des analyses de biologie moléculaire. Ils peuvent notamment être responsables d'une fragmentation des ADNs et d'une dégradation des ARNs messagers (182). Le temps de fixation, la température de la paraffine utilisée pour l'inclusion en bloc sont autant de paramètres qui impactent la qualité de l'ADN, d'où l'importance d'une standardisation de la phase pré-analytique pour assurer la qualité des acides nucléiques extraits.

Pour cette étude, les pièces ont été fixées à l'AFA. Ce fixateur n'est maintenant plus utilisé et l'ensemble des pièces est actuellement fixé au formol conformément aux recommandations de l'INCa et de l'AFAQAP (Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et cytologie Pathologiques). Le formol permet de conserver des acides nucléiques de meilleure qualité par rapport à l'AFA qui, de par son acidité, fragmente les ADN. La phase de qualification du bloc est elle aussi importante et influe sur la quantité d'ADN tumoral recueillie (183, 184).

Les fréquences des mutations retrouvées sont de 27,5% par technique HRM et de 22,5% par technique ARMS. Les résultats de l'analyse du statut mutationnel du gène *PIK3CA* obtenus avec les 2 techniques de PCR sont comparables entre eux et sont également comparables avec ce qui a précédemment été décrit dans la littérature (entre 18 et 40% de mutations). Ils sont aussi en accord avec les données de la base COSMIC (78, 185-187). Nous avons toutefois retrouvé des discordances entre les 2 techniques pour 6 échantillons soit 5,9% des cas.

Cinq échantillons ont présenté une mutation sur l'exon 9 et un échantillon une mutation sur l'exon 20 avec la technique HRM mais pas avec la technique ARMS. Cette discordance s'explique par le principe même de l'analyse ARMS. Cette technique utilise des amorces spécifiques des 4 principales mutations du gène *PIK3CA*, ce qui permet de détecter de manière exclusive les mutations E545K, E542K, H1047R et H1047L. Aucune autre mutation en dehors de ces 4 dernières n'est recherchée (180). La technique de PCR-HRM quant à elle, est non spécifique d'une mutation particulière et permet l'analyse des mutations d'un exon complet. Cette technique permet donc de détecter toutes les mutations sur les exons étudiés, sans toutefois être capable de les identifier. L'analyse des échantillons discordants par une technique de séquençage pourrait venir confirmer cela et permettrait la caractérisation des mutations non détectées par la PCR-ARMS.

La sélectivité de la technique de PCR-ARMS pourrait donc être un inconvénient dans le cas où d'autres mutations que les 4 recherchées se révélaient être de mauvais pronostic ou discriminantes pour le choix d'un traitement de thérapie ciblée. D'après la base COSMIC, 10% des mutations du gène *PIK3CA* se situent en dehors des 4 hotspots précédemment décrits (52).

Concernant la recherche de relations clinico-biologiques, notre étude établit une relation entre grade histopronostique SBR et mutations *PIK3CA*. On retrouve d'avantage de mutations de l'exon 9 dans les tumeurs de grade SBR I alors que les mutations de l'exon 20 sont plus nombreuses dans les grades SBR II, III (50). À ce jour, seules quelques études ont mis en avant une relation entre grade SBR et mutations du gène *PIK3CA*. Certaines ont tout comme notre étude mis en évidence une fréquence de mutations plus élevée dans les tumeurs de bas grade (52, 72) alors que d'autres ont démontré l'inverse (95).

Aucune autre relation statistiquement significative entre présence de mutations du gène *PIK3CA* et les autres critères cliniques et histopathologiques étudiés n'a été mis en évidence.

Certaines études ont montré un taux plus élevé de mutations chez les patientes les plus âgées, alors que d'autres ont montré l'inverse (52, 63, 185).

Concernant le type histologique, des études ont mis en évidence une fréquence de mutations plus élevée dans les tumeurs lobulaires tandis que d'autres en trouvaient davantage dans les tumeurs canalaire (52, 63, 72, 95). Nos résultats ne montrent, quant à eux, aucune différence significative entre les 2. Cependant, la population étudiée ne comprenait que peu de tumeurs lobulaires, 15/118 pour la population analysée par HRM et 19/149 pour celle analysée par PCR-ARMS, ce qui peut entraîner un biais dans les résultats.

Les corrélations entre les mutations *PIK3CA* et les statuts des récepteurs hormonaux et HER2 sont également discutées car les nombreuses études réalisées à ce sujet montrent des discordances. Certaines ont établi des corrélations entre statut hormonal ou statut HER2+ et présence de mutations (52, 63, 72, 95) alors que d'autres telles que la nôtre n'ont mis en évidence aucun lien entre ces différents paramètres.

D'autres études ont évalué la valeur pronostique des mutations du gène *PIK3CA* dans le cancer du sein. Bien que cette valeur pronostique soit controversée, une méta-analyse récente de Dumont et son équipe réalisée sur plus de 2500 cas issus de 12 études différentes et indépendantes a mis en évidence que la présence de mutations du gène *PIK3CA* était associée à un pronostic favorable chez les femmes ménopausées présentant des cancers surexprimant les récepteurs aux œstrogènes et portant une mutation située sur le domaine kinase de la sous-unité p110 $\alpha$  (188).

La valeur pronostique des mutations de l'exon 9 par rapport à celle de l'exon 20 est elle aussi controversée. Les travaux de Barbareschi et son équipe ont mis en évidence que les mutations de l'exon 9 étaient associées à un plus mauvais pronostic que celles de l'exon 20 (63) tandis que Lai et son équipe démontrent l'inverse (185).

Des travaux ont également mis en évidence une diminution de la survie chez les patientes atteintes d'un cancer HER2+ et portant une mutation sur l'exon 20 du gène *PIK3CA* (189). Cependant ces résultats sont peu significatifs compte tenu du caractère rétrospectif de l'étude et surtout de la faible population sur laquelle elle a été réalisée. Ils n'ont de plus jamais été confirmés par d'autres études.

Certaines études ont elles montrés que les mutations de *PIK3CA* étaient un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du sein invasifs (190). Quant aux travaux de Cizkova et son équipe,

ils ne montrent aucune différence significative de survie entre les patientes porteuses d'une mutation de l'exon 9 et celles porteuses d'une mutation de l'exon 20 dans le cas de cancer métastatique (52).

Les nombreux travaux concernant les mutations de ce gène démontrent que le statut mutationnel de *PIK3CA* a effectivement un impact sur les cancers du sein, cependant les discordances importantes des résultats témoignent de la complexité de l'implication de ce gène dans les processus d'oncogenèse et souligne l'importance de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régissant les cancers mammaires.

La discordance des résultats peut s'expliquer par un certains nombres de paramètres. D'une part, les essais sont souvent réalisés sur un nombre limité de patients ce qui ne permet pas toujours d'avoir des résultats significatifs et représentatifs de la population, d'autre part, les techniques de détection sont différentes d'une étude à l'autre et présentent donc des sensibilités de détections différentes ce qui peut expliquer les différences observées. De plus, le cancer du sein est un cancer très hétérogène d'un point de vue histologique mais surtout moléculaire ce qui rend complexe la détermination de l'impact de ces mutations. À cela s'ajoute le fait qu'il existe des mutations très diverses de ce gène qui n'ont probablement pas le même impact biologique et clinique sur les tumeurs ce qui pourrait être à l'origine de ces différences.

Des études récentes ont mis en évidence l'implication des mutations du gène *PIK3CA* dans la résistance à certains traitements dont notamment le traitement par trastuzumab, lapatinib ou encore par anti-œstrogènes ou inhibiteurs de mTOR (52, 69, 84, 88, 90, 191-194). Le statut mutationnel de *PIK3CA* pourrait servir de marqueur prédictif de la réponse au traitement par thérapies ciblées actuellement utilisées et pourrait ainsi devenir un critère de choix pour la décision thérapeutique. La dérégulation de la voie PI3Kinase, que ce soit par mutations activatrices de *PIK3CA* ou par perte d'expression de PTEN, représente donc une cible potentielle pour le développement de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses et pour pallier les résistances aux thérapeutiques déjà existantes. De nombreux inhibiteurs de PI3Kinase sont actuellement à l'étude afin d'évaluer l'impact du ciblage direct de cette kinase sur la réponse aux traitements. Certaines études portent sur des inhibiteurs ciblant l'ensemble des PI3Kinases (pan-inhibiteurs) (56) ou sur des inhibiteurs ciblant spécifiquement une isoforme de PI3Kinase (195). D'autres essais thérapeutiques étudient l'impact d'un double blocage de la voie de signalisation en associant des inhibiteurs de PI3K à des inhibiteurs de

mTOR (91, 196). Bien qu'une activité antiproliférative des inhibiteurs de PI3K ait été mise en évidence, elle reste cependant limitée notamment en monothérapie dans les cancers du sein métastatiques, ce qui laisse penser que d'autres mécanismes moléculaires compensent l'inhibition de cette kinase et influencent l'efficacité des traitements. Des études ont montré que les 2 voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase sont interconnectées au niveau de multiples points de convergence, notamment au niveau de la protéine RAS, et peuvent se réguler par des boucles de rétrocontrôle expliquant les mécanismes d'échappement aux traitements. Ces deux voies ont la capacité de se réguler l'une et l'autre, ainsi le blocage de l'une peut entraîner l'activation de l'autre et donc la diminution de l'effet anti-tumoral (103). Le cross-talk entre ces 2 voies de signalisation a été souligné avec l'étude des inhibiteurs spécifiques de PI3K pour lesquels un impact sur ERK a été mis en évidence (197, 198). La découverte de ces mécanismes confirme l'intérêt d'une approche combinatoire des traitements afin d'obtenir un blocage complet de ces voies de signalisation et éviter l'activation de mécanismes compensatoires.

#### IV.2. Expression des phosphoprotéines des voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase

Dans la série d'échantillons étudiée, nous avons comparé l'expression de P38MAPKinase et de sa forme phosphorylée p-P38MAPKinase, dans des échantillons de tumeurs mammaires en fonction des statuts RE, HER2+ et du grade SBR dans le but d'établir des corrélations entre ces différents paramètres et de mieux comprendre l'implication de la P38MAPKinase dans la cancérogenèse mammaire.

La P38MAPKinase et sa forme phosphorylée sont exprimées dans la quasi totalité des échantillons analysés (98% des échantillons) ce qui concorde avec les résultats d'autres études qui montraient une expression de 100% pour P38MAPKinase et 89% pour p-P38MAPKinase en Western Blot et 70% en immunohistochimie (176).

Nous avons mis en évidence un niveau d'expression plus élevé de la P38MAPKinase dans les tumeurs RE+ que dans les tumeurs RE-, ce qui est en accord avec les données précédemment publiées (106, 114, 199). P38 semble avoir un impact sur les mécanismes moléculaires régissant les tumeurs hormono-dépendantes et pourrait être impliqué dans les mécanismes de résistances à certaines thérapies endocrines et notamment au tamoxifène. Des études ont en effet mis en évidence une corrélation entre le niveau d'expression de la P38MAPKinase et la résistance au tamoxifène dans les tumeurs surexprimant les récepteurs hormonaux (200, 201). Une augmentation du niveau d'expression de sa forme phosphorylée a également été mise en évidence dans les tumeurs résistantes au tamoxifène (114, 200). Ceci est dû à une interaction entre la P38MAPKinase et les voies des récepteurs œstrogéniques impliquées dans les mécanismes de prolifération et de développement tumoral. Il existe deux voies d'activation des récepteurs œstrogéniques: une voie classique transcriptionnelle ou génomique directe et une voie non génomique membranaire. Concernant la voie classique génomique œstrogénique, les RE $\alpha$  agissent comme des facteurs de transcription ligand-dépendant et régulent l'expression des gènes intervenant notamment dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. Les RE peuvent également réguler la transcription des gènes sur des sites promoteurs non ERE (Estrogen responsive element) spécifiques par un mode d'action "non classique" en interagissant avec d'autres facteurs de transcription ou avec des protéines co-activatrices (202) aboutissant à la transcription génomique. La voie non génomique, quant à elle, est une voie de signalisation stéroïdienne initiée à la membrane.

Cette voie est médiée par une forme particulière de RE situé au niveau de la membrane plasmique (203) et est indépendante de la fonction de transcription des RE (204).

Les anti-œstrogènes provoquent la suppression de la voie classique des RE (répression des fonctions génomiques de la voie classique des RE par le tamoxifène) et entraînent alors une activation de P38MAPKinase provoquant un "Switch" vers la voie non classique. La détermination de l'expression de la P38MAPKinase dans les cancers du sein pourrait ainsi représenter une nouvelle approche pour prédire la résistance à l'hormonothérapie. L'inhibition de P38 pourrait, elle, permettre de rétablir la sensibilité aux anti-œstrogènes (175).

Plusieurs études ont également mis en évidence un phénomène de résistance au tamoxifène dans les tumeurs surexprimant HER2. La surexpression de HER2+ favoriserait la phosphorylation des RE et permettrait l'activation de la voie des œstrogènes même en présence de tamoxifène (205). Ces mécanismes expliquent pourquoi les tumeurs RE+ et HER2+ répondent moins bien au tamoxifène que les autres.

De nombreux inhibiteurs de P38 sont actuellement en cours d'évaluation comme potentiels nouveaux traitements anticancéreux. Il y a notamment le RWJ67657, un inhibiteur de P38 évalué sur des modèles précliniques de carcinomes mammaires résistants au tamoxifène. Les résultats ont montré une diminution significative de P38 après exposition au RWJ67657 ainsi qu'une diminution des effets biologiques de cette MAPKinase notamment une diminution de l'activation de la voie des RE. Cet inhibiteur de P38 semble être prometteur pour le traitement des tumeurs résistantes au tamoxifène (201).

D'autres études ont quant à elles mis en évidence une corrélation entre l'augmentation de la phosphorylation de la P38MAPKinase, la résistance au trastuzumab et le pouvoir invasif dans les tumeurs HER2+. Dans des cellules cancéreuses mammaires HER2+, résistantes au trastuzumab, une augmentation du niveau d'expression de p-P38 a été détectée et l'inhibition de cette kinase a permis la restauration de la sensibilité au trastuzumab (206).

Notre étude n'a quant à elle mis en évidence aucune relation entre le statut HER2+ et l'expression de P38MAPkinase et de p-P38MAPkinase mais a en revanche démontré un niveau d'expression de P38 significativement plus faible dans les tumeurs triple-négatives que dans les autres types de tumeurs. Ces résultats devraient cependant être reconsidérés en étudiant spécifiquement le rôle et le comportement de chaque isoforme. En effet, il est important de distinguer les isoformes car il a été mis en évidence qu'elles pouvaient présenter

des actions différentes voire antagonistes (207) . Les dernières études montrent que l'isoforme  $\gamma$  joue un rôle important dans les tumeurs triple-négatives. Cette isoforme est corrélée au phénotype métastatique et "basal-like" (208). Elle joue notamment un rôle dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (208) et a un impact sur la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de topoisomérases (209). La stimulation du gène de la topoisomérase II $\alpha$  par la P38MAPKinase  $\gamma$  contribue à augmenter le niveau de la topoisomérase II et améliorerait l'efficacité des inhibiteurs de topoisomérases II (175).

Dans les cancers du sein, l'expression de la P38MAPKinase a précédemment été décrite comme un facteur de mauvais pronostic et corrélée au pouvoir invasif des tumeurs (114, 115, 176, 210). La voie de la P38MAPKinase régule positivement l'expression de uPA (urokinase-type plasminogen activator) qui permet la dégradation de la matrice extracellulaire et augmente alors le pouvoir invasif et métastatique des tumeurs. Ceci suggère que des inhibiteurs de P38 pourraient être utiles dans les tumeurs invasives (113, 211). Des niveaux d'expression plus élevés de p-P38 et de uPA ont été retrouvés dans des cellules à haut pouvoir métastatique (211). Des études visant à bloquer la prolifération des tumeurs en inhibant la P38MAPKinase ont mis en évidence que son inhibition bloquait la prolifération et particulièrement concernant les tumeurs RE- et P53 mutées. Cette découverte est intéressante pour les tumeurs agressives triple-négatives, P53 mutées, pour lesquelles les traitements actuels ont une efficacité limitée (105).

Il a également été mis en évidence que la P38 régulait la dégradation des RE  $\alpha$  par le protéasome. La P38 phosphoryle les RE et la protéine SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2). Ce qui permet l'ubiquitination des RE par SKP2 permettant leurs dégradations par le protéasome. Des études ont notamment montré un taux élevé de SKP2 dans les tumeurs agressives et RE-. L'utilisation d'inhibiteurs de P38 pourrait également dans ce contexte être utile pour inhiber l'ubiquitination par SKP2 et donc la dégradation par le protéasome des RE et pourrait restaurer la sensibilité aux thérapies endocrines (212).

Concernant maintenant l'étude de p-ERK et de p-AKT, nous avons retrouvé une expression de la phosphoprotéine p-ERK dans 73% des tumeurs analysées, ce qui est concordant avec les données précédemment publiées (69 et 96 %) (176, 213, 214). On constate de plus que son expression est plus importante dans les tumeurs de haut grade (grade SBR III) tout comme d'autres études qui mettent en évidence un lien entre l'activation de ERK et la prolifération des cancers (215).

Une expression de p-AKT a quant à elle été détectée dans 38% des échantillons analysés, et son niveau d'expression est plus important dans les tumeurs HER2+. Ceci corrobore les résultats d'autres études (214).

Pour finir, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre l'expression de p-AKT, p-ERK, P38MAPKinase et p-P38MAPKinase que ce soit dans la population totale ou dans les sous populations RE+, HER2+ ou triple-négatives, ce qui est en accord avec la littérature.

L'ensemble de ces données montre l'implication majeure des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase dans la cancérogenèse mammaire et témoigne de la complexité des mécanismes mis en jeu. Les résultats confirment plus particulièrement l'existence d'une corrélation entre la P38MAPKinase et les tumeurs hormono-dépendantes ce qui concorde avec son implication probable dans le développement de résistance au traitement par tamoxifène. Il reste cependant de nombreux mécanismes à élucider pour comprendre l'implication de chacun de ces effecteurs dans la tumorigenèse mammaire.

## V. Conclusion et perspectives

Cette étude met en avant l'importance des voies de signalisation cellulaire dans la cancérogenèse mammaire et la complexité des mécanismes mis en jeu. La détermination du statut mutationnel du gène *PIK3CA* et du niveau d'expression de la P38MAPKinase pourrait être intéressante pour affiner la caractérisation moléculaire des tumeurs et prédire la réponse aux thérapies ciblées. L'utilisation de ces biomarqueurs pourrait permettre d'optimiser les critères utiles à la personnalisation des prescriptions et ainsi améliorer l'efficacité des thérapies ciblées.

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

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

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

Les perspectives de ce travail sont l'élaboration d'une étude prospective sur l'évaluation du statut mutationnel de *PIK3CA* et la détermination du niveau d'expression des phosphoprotéines des voies de signalisation sur une population plus importante, mais également l'évaluation de la réponse au traitement par thérapies ciblées sur cette population. La connaissance des voies de signalisation reste actuellement l'un des objectifs majeurs pour continuer à améliorer l'efficacité des traitements et comprendre la complexité des mécanismes régissant l'oncogenèse.

## ANNEXES

### Annexe 1: La classification TNM des cancers du sein

<b>Classification TNM</b>	
<b>T : Taille de la tumeur primitive</b>	
<b>Tx</b>	Détermination de la tumeur primitive impossible
<b>T0</b>	Pas de signe de tumeur primitive (non palpable)
<b>Tis</b>	Carcinome <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumeur < 2cm dans sa plus grande dimension T1mic : micro-invasion $\leq 0.1$ cm T1a : Tumeur > 0.1cm et $\leq 0.5$ cm T1b : Tumeur > 0.5cm et $\leq 1$ cm T1c : Tumeur > 1cm et $\leq 2$ cm
<b>T2</b>	Tumeur > 2 cm et $\leq 5$ cm
<b>T3</b>	Tumeur > 5cm
<b>T4</b>	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique (côtes, m. intercostaux, grand dentelé) (a) ou à la peau (b) T4a : extension à la paroi thoracique T4b : œdème y compris la « peau d'orange » ou ulcération cutanée du sein, ou nodules de perméation cutanés limités au même sein T4c : 4a et 4b
<b>N: Node, présence ou non d'une atteinte ganglionnaire</b>	
<b>Nx</b>	Impossibilité d'apprécier l'atteinte ganglionnaire
<b>N0</b>	Absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional
<b>N1</b>	Ganglions axillaires de niveau I et II homolatéraux mobiles
<b>N2</b>	Métastases dans un ou plusieurs ganglions axillaires de niveau I et II homolatéraux fixés ou confluents ou dans un ou plusieurs ganglions mammaires internes homolatéraux cliniquement détectables en l'absence de métastase ganglionnaire axillaire cliniquement évidente N2a : Métastases dans un ou plusieurs ganglions axillaires fixés entre eux ou à d'autres structures N2b : Métastases cliniquement détectables uniquement dans les ganglions mammaires internes et en l'absence de métastase ganglionnaire axillaire cliniquement décelable
<b>N3</b>	Métastases dans les ganglions sous-claviculaires homolatéraux (niveau III) avec ou sans envahissement ganglionnaire axillaire (niveau I et II) ou métastase ganglionnaire interne mammaire homolatérale cliniquement détectable en présence de métastase axillaire (niveau I et II) cliniquement évidente ou métastases ganglionnaires sous claviculaires homolatérales avec ou sans envahissement ganglionnaire axillaire ou mammaire interne  N3a : Métastase ganglionnaire sous-claviculaire N3b : Métastase ganglionnaire mammaire interne et axillaire N3c : Métastase ganglionnaire sus-claviculaire
<b>M : Présence ou absence de métastase</b>	
<b>Mx</b>	Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
<b>M0</b>	Absence de métastase à distance
<b>M1</b>	Présence de métastase à distance

## Annexe 2

ONCOLOGY REPORTS

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

ALEXANDRE HARLÉ<sup>1,3</sup>, MAËVA LIGNÉ<sup>1,3</sup>, NICOLAS LOZANO<sup>1</sup>, MARIE HUSSON<sup>1</sup>,  
VALENTIN HARTER<sup>2</sup>, PASCAL GENIN<sup>1,3</sup> and JEAN-LOUIS MERLIN<sup>1,3</sup>

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

Received November 1, 2012; Accepted December 7, 2012

DOI: 10.3892/or.2013.2229

**Abstract.** Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) are essential for cell signaling, proliferation, differentiation and survival. The catalytic subunit of PI3K, encoded by the *PIK3CA* oncogene, is mutated in 18–45% of breast carcinomas. These mutations, involved in tumorigenic processes, activate the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Resistance to anti-human epidermal growth factor receptor hormonal or anti-PI3K therapies have been described in breast carcinomas bearing activation of the PI3K signaling pathway. The present study reports the evaluation of *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations in 149 invasive breast cancer cases using a validated PCR high resolution melting assay (PCR-HRM). An amplification refractory mutation system (PCR-ARMS) using allele-specific scorpion primers was used to detect hotspot mutations in exons 9 (c.1624G→A and c.1633G→A) and 20 (c.3140A→G and c.3140A→T) in 118 tumor specimens. No correlation was observed with age at diagnosis, histological type, hormone receptor and HER2 status. *PIK3CA* exon 9 and 20 mutations were found to be related to Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade with a lower rate of mutations and a higher frequency of exon 9 mutations in SBR1 and exon 20 mutations in SBR1/II tumors. No difference was observed in the incidence rates of the two different mutations screened for each exon in any subcategory. A statistically significant correlation was found between PCR-HRM and PCR-ARMS ( $r = -0.845$ ,  $P = 0.001$ ). PCR-ARMS was found to be more sensitive than PCR-HRM (sensitivity 9.5 and 5–10% of mutated DNA, respectively). We propose that PCR-HRM and PCR-ARMS can be combined for the cost-effective routine clinical identification of *PIK3CA* mutations for the purpose of personalizing therapy for invasive breast cancers.

#### Introduction

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

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

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

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

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

Table 1. Relationship between the *PIK3CA* mutation status analyzed using PCR-HRM and main standard clinicopathological and biological characteristics of the breast cancer cases.

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

<sup>a</sup>χ<sup>2</sup> or Fisher's exact test. <sup>b</sup>Information available for 115 patients. <sup>c</sup>HER2 (3+) by immunohistochemistry or FISH-positive; <sup>d</sup>HR<sup>+</sup>, ER<sup>+</sup> and/or PR<sup>+</sup>; HR<sup>-</sup>, ER<sup>-</sup> and PR<sup>-</sup>. <sup>e</sup>Scarff-Bloom-Richardson classification. <sup>f</sup>Refers to the total population. <sup>g</sup>Refers to the population of each category.

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

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

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

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

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

	Total/class	No. of patients (%)		P value <sup>a</sup>
		<i>PIK3CA</i> wild-type	<i>PIK3CA</i> mutated	
Total	149 (100.0)	122 (81.9)	27 (18.1)	
Age at diagnosis (years)				0.202
≤50	48 (30.5)	36 (72.2)	12 (27.8)	
>50	101 (69.5)	86 (75.6)	15 (24.4)	
Tumor histology				0.521
Ductal	127 (85.2)	102 (71.6)	25 (28.4)	
Lobular	19 (12.8)	17 (93.3)	2 (6.7)	
Others	3 (2.0)	2 (66.7)	1 (33.3)	
Estrogen receptor (ER) <i>a</i> status <sup>b</sup>				0.981
Positive	113 (81.7)	93 (75.5)	20 (24.5)	
Negative	30 (19.3)	24 (71.4)	6 (28.6)	
Progesterone receptor (PR) status <sup>b</sup>				0.823
Positive	88 (64.3)	71 (77.0)	17 (23.0)	
Negative	55 (35.7)	46 (70.7)	9 (29.3)	
HER2 status <sup>b</sup>				1.000
Positive <sup>c</sup>	19 (10.4)	16 (75.0)	3 (25.0)	
Negative	124 (89.6)	101 (74.8)	23 (25.2)	
Hormone receptor (HR) status <sup>b,d</sup>				0.823
Positive	115 (82.3)	95 (75.8)	20 (24.2)	
Negative	28 (27.7)	22 (70.0)	6 (30.0)	
Combined HER and HR status <sup>e</sup>				0.893
HER2 <sup>+</sup> /HR <sup>+</sup>	13 (7.0)	12 (87.5)	1 (12.5)	
HER2 <sup>+</sup> /HR <sup>-</sup>	102 (77.6)	83 (74.7)	19 (25.3)	
HER2 <sup>-</sup> /HR <sup>+</sup>	6 (3.5)	4 (50.0)	2 (50.0)	
HER2 <sup>-</sup> /HR <sup>-</sup>	22 (13.9)	18 (75.0)	4 (25.0)	
SBR grade <sup>f</sup>				0.004
I	14 (11.9)	7 (57.1)	7 (42.9)	
II	67 (47.5)	55 (69.6)	12 (30.4)	
III	64 (40.7)	56 (85.4)	8 (14.6)	

<sup>a</sup> $\chi^2$  or Fisher's test. <sup>b</sup>Information available for 141 patients. <sup>c</sup>HER2 (1+) by immunohistochemistry or FISH-positive. <sup>d</sup>HR<sup>+</sup>, ER<sup>+</sup> and/or PR<sup>+</sup>; HR<sup>-</sup>, ER<sup>-</sup> and PR<sup>-</sup>. <sup>e</sup>Scarf-Bloom-Richardson classification. <sup>f</sup>Refers to the total population. <sup>g</sup>Refers to the population of each category.

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

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

#### Patients and methods

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

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

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

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

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

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

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

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

## Results

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

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

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

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

Sample no.	Sample DNA concentration (ng/ $\mu$ l)	PCR-HRM		PCR-ARMS	
		Test result	Mutation result	Test result	Mutation result
1	33.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
2	61.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
3	95.9	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A>G
4	64.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
5	105.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
6	164.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
7	71.1	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624C>A
8	69.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
9	95.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
10	39.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
11	68.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
12	<b>60.7</b>	<b>Mutation detected</b>	<b>Exon 9</b>	<b>Mutation not detected</b>	N/A
13	62.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
14	108.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
15	<b>162.7</b>	<b>Mutation detected</b>	<b>Exon 9</b>	<b>Mutation not detected</b>	N/A
16	319.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
17	<b>321.4</b>	<b>Mutation detected</b>	<b>Exon 20</b>	<b>Mutation not detected</b>	N/A
18	109.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
19	146.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
20	201.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
21	199.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
22	224.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
23	35.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
24	201.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
25	175.8	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140T>T
26	104.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
27	211.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
28	662.0	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1633G>A
29	457.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
30	223.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
31	199.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
32	68.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
33	122.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
34	232.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
35	352.4	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140T>T
36	155.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A>G
37	75.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
38	486.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
39	164.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
40	304.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
41	<b>124.4</b>	<b>Mutation detected</b>	<b>Exon 9</b>	<b>Mutation not detected</b>	N/A
42	291.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
43	206.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
44	67.6	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1633G>A
45	96.4	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A>G
46	26.9	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140T>T
47	99.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
48	<b>41.4</b>	<b>Mutation detected</b>	<b>Exon 9</b>	<b>Mutation not detected</b>	N/A
49	127.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
50	184.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
51	86.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
52	499.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A

Table III. Continued.

Sample no.	Sample DNA concentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	PCR-HRM		PCR-ARMS	
		Test result	Mutation result	Test result	Mutation result
53	188.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
54	140.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
55	357.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
56	252.5	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A>G
57	211.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
58	213.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
59	230.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A>G
<b>60</b>	<b>227.3</b>	<b>Mutation detected</b>	<b>Exon 9</b>	<b>Mutation not detected</b>	<b>N/A</b>
61	729.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
62	144.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
63	202.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
64	45.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
65	154.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
66	301.8	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140T>T
67	178.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
68	151.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
69	543.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
70	70.3	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G>A
71	179.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
72	202.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
73	244.9	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1653G>A
74	130.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
75	256.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
<b>76</b>	<b>90.2</b>	<b>Mutation not detected</b>	<b>N/A</b>	<b>Mutation detected</b>	<b>c.1624G&gt;A</b>
77	302.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
78	138.8	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
79	117.0	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
80	130.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
81	120.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
82	149.4	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
83	221.2	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A>G
84	107.8	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G>A
85	166.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
86	277.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
87	111.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
88	81.1	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
89	170.2	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
90	252.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
91	127.9	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A>G
92	102.3	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
93	111.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
94	306.6	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
95	96.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A>G
96	88.7	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
97	122.6	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A>G
98	222.9	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
99	194.4	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G>A
100	44.5	Mutation not detected	N/A	Mutation not detected	N/A
101	185.3	Mutation detected	Exon 20	Mutation detected	c.3140A>G
102	127.3	Mutation detected	Exon 9	Mutation detected	c.1624G>A

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nucleotide change	Protein change	Sensitivity (%)	DNA quantity (ng)
<b>PCR-HRM</b>			
Exon 9			
	Not available	5	1.0
Exon 20			
	Not available	0	2.0
<b>PCR-ARMS</b>			
Exon 9			
c.1624G>A	E542K	0.5	0.8
c.1633G>A	E545K	0.5	0.8
Exon 20			
c.3140A>G	H1047R	0.5	0.8
c.3140A>T	H1047L	0.5	0.8

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

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

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

## Discussion

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

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

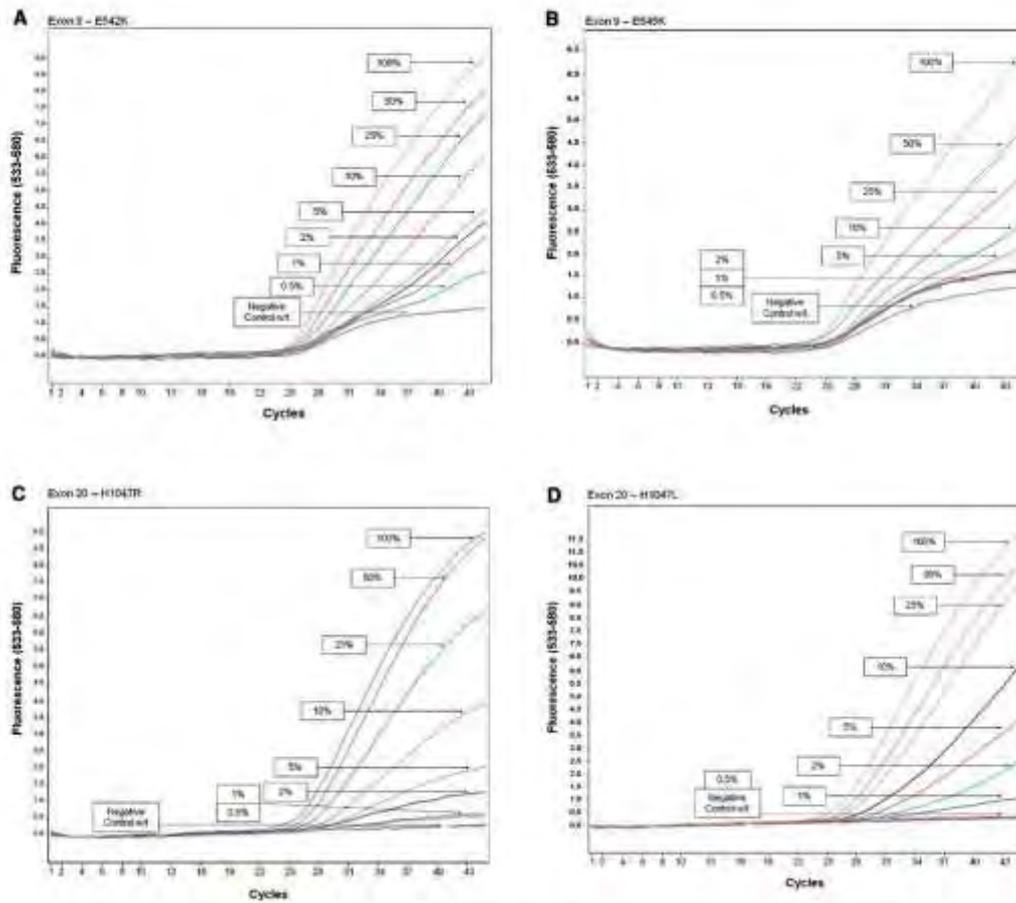


Figure 1. Sensitivity results for (A) E542K, (B) E545K, (C) H1047R and (D) H1047L mutations using PCR-A RMS

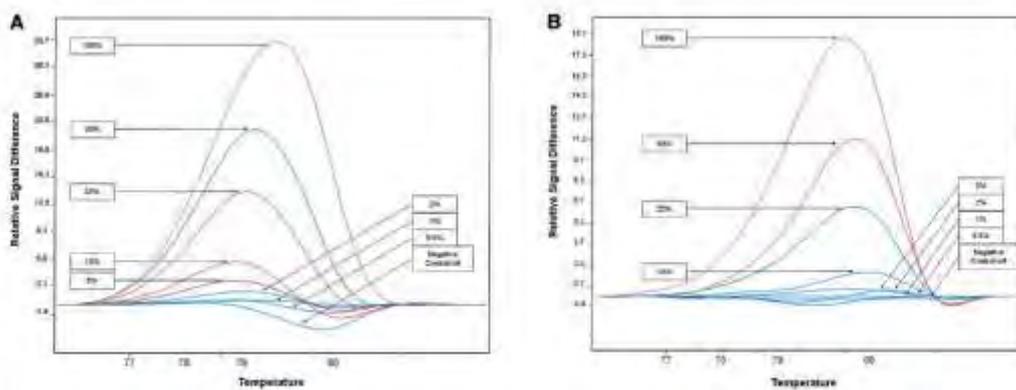


Figure 2. Sensitivity results for (A) exon 9 and (B) exon 20 mutations using PCR-HRM

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Acknowledgements

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

#### References

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

3. Tokunaga E, Oki E, Egashira A, *et al.* Deregulation of the Akt pathway in human cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 8: 2735-2008.
4. McAuliffe PF, Meric-Bernstam F, Mills GB and Gonzalez-Angulo AM. Deciphering the role of PI3K/Akt/mTOR pathway in breast cancer biology and pathogenesis. *Clin Breast Cancer* 10: S59-S65 2010.
5. Wang L, Zhang Q, Zhang J, *et al.* PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC Cancer* 11: 248 2011.
6. Jiang BH and Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 102: 19-65 2009.
7. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, *et al.* The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 3: 772-775 2004.
8. Karakas B, Bachman KE and Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer* 94: 435-459 2006.
9. Dhalluin J, Le C, Sliwkil A, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt1 mutations occur early in breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 120: 409-418 2009.
10. Orlando L, Selwynne P, Fedele P, *et al.* Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer Treat Rev* 36: S67-S71 2010.
11. Miller TW, Balko JM and Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol* 29: 4452-4461 2011.
12. Abramson Y and Arteaga CL. New strategies in HER2-overexpressing breast cancer: many combinations of targeted drugs available. *Clin Cancer Res* 17: 952-958 2011.
13. Ma CX, Crowder RJ and Ellis MJ. Importance of PI3 kinase pathway in response/resistance to aromatase inhibitors. *Steroids* 76: 750-752 2011.
14. Raza E, Bobos M, Kotoula V, *et al.* Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast* 128: 447-456 2011.
15. Dive B, Migninello J, Gutierrez MC, *et al.* Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositide 3-kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol* 29: 166-173 2011.
16. Esteve FJ, Guo H, Zhang S, *et al.* PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol* 177: 1647-1656 2010.
17. Baselga J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 21: 6136-60 2011.
18. Garrett JT and Arteaga CL. Resistance to HER2 directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol Ther* 11: 793-800 2011.
19. Tanaka H, Yoshida M, Tamamura H, *et al.* The selective class I PI3K inhibitor GDC132799 targets human cancers harboring oncogenic PIK3CA mutations. *Clin Cancer Res* 17: 3272-3281 2011.
20. Dan S, Okamura M, Mukai Y, *et al.* ZSTK474, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, induces G1 arrest of the cell cycle in vivo. *Eur J Cancer* 48: 936-943 2012.
21. Bibeau F, Frugier B, Denmel A, Sabourin JC and Bousserie-Michet F. Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer: The pathologist's point of view. *Bull Cancer* 96: S15-S22 2009 (in French).
22. Vorkas PA, Pountouridou N, Agelaki S, Kroupis C, Georgoulas V and Liakidou ES. PIK3CA hotspot mutation scanning by a novel and highly sensitive high-resolution small amplicon melting analysis method. *J Mol Diagn* 12: 697-704 2010.
23. Board RE, Thelwell NJ, Raweio PF, *et al.* Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA. *Chin Chem* 54: 757-760 2008.
24. Dumont AG, Dumont SN and Trent JC. The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. *Clin J Cancer* 31: 327-334 2012.
25. Barbàreschi M, Battista F, Folloni L, *et al.* Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 13: 6064-6069 2007.
26. Lai YL, Mau BL, Cheng WH, Chen HM, Chu HH and Tzen CY. PIK3CA exon 20 mutation is independently associated with a poor prognosis in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol* 15: 1064-1069 2008.
27. Leras E, Causas L, Gallardo A, *et al.* Exon 20 PIK3CA mutations decrease survival in aggressive (HER2 positive) breast carcinomas. *Vichows Arch* 453: 133-139 2008.
28. Cizkova M, Susini A, Vaher S, *et al.* PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res* 14: R28 2012.
29. Aleksandarany MA, Rakha EA, Ahmed MA, *et al.* PIK3CA expression in invasive breast cancer: a biomarker of poor prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 122: 45-53 2009.
30. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, *et al.* Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 64: 7678-7681 2004.
31. Levine DA, Bogomolny F, Yee CL, *et al.* Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* 11: 2875-2878 2005.
32. Maron A, Yarad M, Carrasco D, *et al.* PIK3CA mutations in *in situ* and invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 70: 5674-5678 2010.
33. Wu G, Xing M, Mambo E, *et al.* Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 7: R809-R816 2005.
34. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, *et al.* PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 15: 5049-5059 2009.
35. Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tanaka Y, Monden M and Nagnebi S. Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. *Clin Cancer Res* 13: 408-414 2007.
36. Ellis MJ, Lin L, Crowder R, *et al.* Phosphatidylinositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 119: 379-390 2010.
37. Perez-Tanorio G, Alkhori L, Olsson B, *et al.* PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* 13: 3577-3584 2007.
38. Baker CL, Vaughn CP and Samowitz WS. A PIK3CA pyrosequencing based assay that excludes pseudogene interference. *J Mol Diagn* 14: 56-60 2012.
39. Tsagavelou D, Lecomte T, Pages JC, *et al.* Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 30: 3520 2012.

## Annexe 3

ONCOLOGY REPORTS

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

JEAN-LOUIS MERLIN<sup>1,2,3</sup>, ALEXANDRE HARLÉ<sup>1,2,3</sup>, MAËVA LION<sup>1,2,3</sup>,  
CAROLE RAMACCI<sup>1</sup> and AGNÈS LEROUX<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biopathology, Institut de Cancérologie de Lorraine, 54519 Vandœuvre les Nancy,

<sup>2</sup>Université de Lorraine, Faculty of Pharmacy, 54001 Nancy,

<sup>3</sup>CNRS UMR 7039 CRAN, 54506 Vandœuvre les Nancy, France

Received May 29, 2013; Accepted June 28, 2013

DOI: 10.3892/or.2013.2645

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

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

#### Introduction

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

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

*Correspondence to:* Professor Jean-Louis Merlin, Institut de Cancérologie de Lorraine, 6 Avenue de Bourgogne, CS30519, 54519 Vandœuvre les Nancy, France  
E-mail: jlmerlin@nancy.umcancer.fr

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

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

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

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

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

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

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

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

## Materials and methods

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

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

Immunohistochemistry (BenchMark Ventana) was used to detect estrogen and progesterone receptor expression and HER2 overexpression as part of the routine clinical diagnostics using polyclonal antibody A-485 (Dako, Trappes, France) immunostaining of HER2 and monoclonal antibodies 6F11 and Pg112 (both from Novocastra, Leica Microsystems, Nanterre, France) for determination of estrogen and progesterone expression, respectively.

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

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

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

## Results

**Immunohistochemistry.** The breast cancer tumor characteristics are summarized in Table 1. The ER status as determined by immunohistochemistry was positive in 29 patients (64%) and negative in 16 patients (36%). Progesterone receptor (PR) status was positive in 18 patients (40%) and negative in 27 patients (60%). Fifteen tumors (33%) were HER2<sup>+</sup> and 30 tumors (67%) were HER2<sup>-</sup>. Ten (22%) tumors were triple-negative breast cancers (TNBCs), i.e. ER, PR and HER2<sup>-</sup>.

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

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

Table 1. Patient demographics and tumor characteristics

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

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

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

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

## Discussion

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

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

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

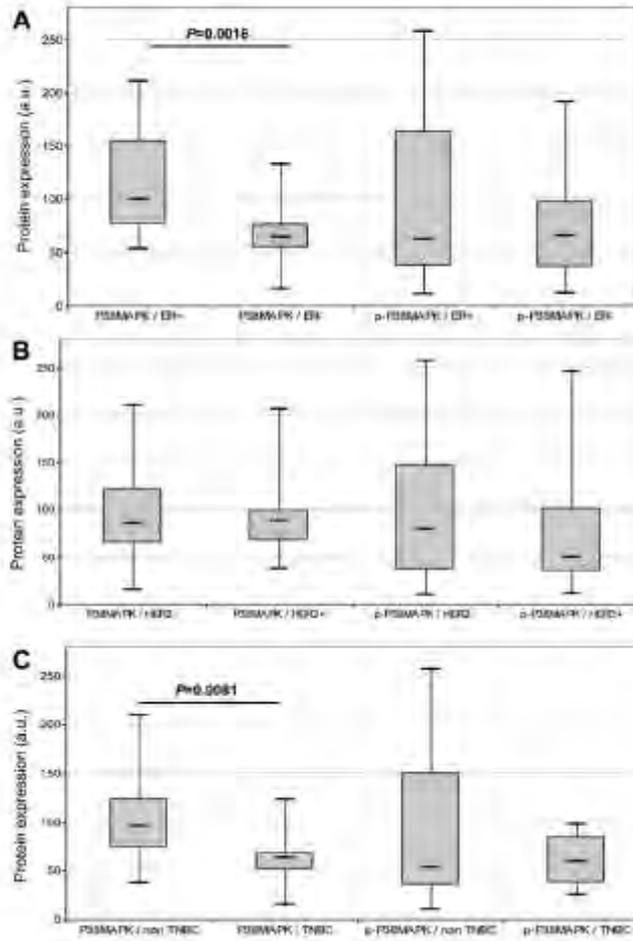


Figure 1 Expression of P19 MAPK and its phosphorylated form (p-P19 MAPK) in clinical specimens of invasive breast cancer. The results are presented as box-and-whisker plots illustrating the median (central bar), 1st and 3rd quartiles (bottom and top of the grey box), minimum and maximum values (lower and upper bars). Expression in (A) estrogen-positive (ER+) and ER-negative (ER-) tumors, (B) HER2-positive (HER2+) and HER2-negative (HER2-) tumors, (C) triple-negative breast cancer (TNBC) and non-TNBC.

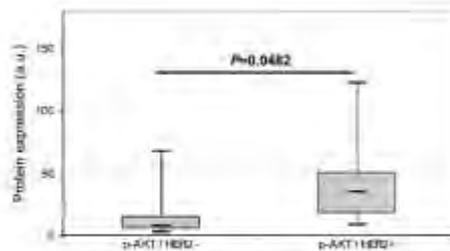


Figure 2 Expression of phosphorylated-AKT (p-AKT) in HER2-positive (HER2+) and HER2-negative (HER2-) tumors. The results are presented as box-and-whisker plots illustrating the median (central bar), 1st and 3rd quartiles (bottom and top of the grey box), minimum and maximum values (lower and upper bars).

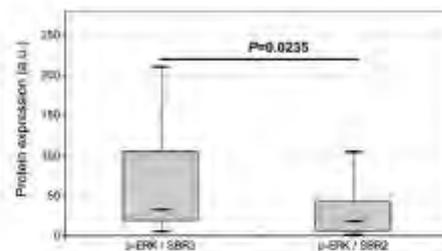


Figure 3 Expression of phosphorylated-ERK1/2 (p-ERK) in SBR grade 2 (SBR2) and grade 3 (SBR3) tumors. The results are presented as box-and-whisker plots illustrating the median (central bar), 1st and 3rd quartiles (bottom and top of the grey box), minimum and maximum values (lower and upper bars).

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

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

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

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

In this context, although we did not observe any inverse relationship between HER2 and p-P38 MAPK expression, our results revealed that expression of P38 MAPK was significantly lower in TNBCs than in the other tumor subtypes. This may be reconsidered if a more specific approach of selective inhibition of P38 MAPK isoforms can be envisaged, as recent preclinical studies have demonstrated the important role played by the P38 MAPK  $\gamma$  isoform in TNBCs in relation with its marked induction of cell cycle arrest in the G2/M phase (29) and its effect on the cellular sensitivity to topoisomerase II inhibitors (30). Stimulation of topoisomerase II gene expression by P38 MAPK $\gamma$  may contribute to increased topoisomerase II levels and enhanced antitumor activity of topoisomerase II inhibitors (24), therefore opening the field for the investigation of selective inhibitors of the P38 MAPK  $\gamma$  isoform in combination with chemotherapy.

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

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

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

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

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

In conclusion, P38 MAPK expression and activation are frequently observed in breast carcinoma and appear to be positively associated with the expression of the ER. Our results confirm the capability of breast cancer cells to activate P38 MAPK-mediated stress mechanisms and that P38 MAPK may represent a biological target for ER<sup>+</sup> breast cancer. The frequent concomitant activation of P38MAPK, ERK and AKT indicates that breast tumor growth involves the activation of multiple signaling pathways, probably explaining the multiple mechanisms by which tumor cells develop resistance. Control of tumor growth should therefore entail the inhibition of all signaling pathways by combining multiple targeted therapies either in concomitant or in sequential use.

#### Acknowledgements

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

#### References

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90, 2011
- Baselga J, Campone M, Finnert M, *et al*: Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 366: 520-529, 2012
- Maemura M, Iino Y, Kribushi Y, Yukawa T and Morishita Y: Mitogen-activated protein kinase cascade in breast cancer. *Oncology* 57 (Suppl 2): 37-44, 1999
- Ono S and Han J: The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12: 1-13, 2000
- Frigo DE, Basu A, Nierth-Simpson EN, *et al*: p38 mitogen-activated protein kinase stimulates estrogen mediated transcription and proliferation through the phosphorylation and potentiation of the p60 coactivator glucocorticoid receptor-interacting protein 1. *Mol Endocrinol* 20: 971-983, 2006

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

## Références Bibliographiques

1. *Les cancers en France en 2013*. Collection Etat des lieux et des connaissances, ouvrage collectif édité par l'INCa, Boulogne-Billancourt. janvier 2014.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013 [18/12/2013]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
3. Binder-Foucard F, Belot A, Delafosse P, Remontet L, Woronoff AS, Bossard N. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1- Tumeurs solides Saint-Maurice (Fra): Institut de veille sanitaire. 2013:122.
4. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010;12(4):207.
5. *Les traitements des cancers du sein*. collection Guides patients Cancer info, INCa. octobre 2013.
6. Anatomie du sein, cancer du sein, INCa. 2010 [16/09/2013]. Available from: <http://www.e-cancer.fr>.
7. Green AR, Powe DG, Rakha EA, Soria D, Lemetre C, Nolan CC, et al. Identification of key clinical phenotypes of breast cancer using a reduced panel of protein biomarkers. *Br J Cancer*. 2013;109(7):1886-94.
8. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
9. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.

10. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8418-23.
11. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10393-8.
12. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:127.
13. Van 't Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
14. Belkacemi Y, Penault-Llorca F, Gligorov J, Azria D. The use of breast cancer subtype classification to predict local and distant recurrence. A review. *Cancer Radiother*. 2008;12(6-7):577-83.
15. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:96.
16. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(8):790-800.
17. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*. 2014;465(1):1-14.
18. Guiu S, Michiels S, Andre F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol*. 2012;23(12):2997-3006.
19. Delgallo WD, Rodrigues JR, Bueno SP, Viero RM, Soares CT. Cell blocks allow reliable evaluation of expression of basal (CK5/6) and luminal (CK8/18) cytokeratins and smooth muscle actin (SMA) in breast carcinoma. *Cytopathology*. 2010;21(4):259-66.

20. Loi S, Sotiriou C, Haibe-Kains B, Lallemand F, Conus NM, Piccart MJ, et al. Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Med Genomics*. 2009;2:37.
21. Tran B, Bedard PL. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Res*. 2011;13(6):221.
22. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
23. Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E, et al. Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. *J Clin Oncol*. 2014;32(25):2794-803.
24. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3271-7.
25. Cottu P, Vincent-Salomon A. Les carcinomes triple-négatifs du sein: aspects moléculaires, morphologiques et cliniques. *La lettre du Sénologue* N°50. Décembre 2010.
26. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):412-24.
27. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-92.
28. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957;11(3):359-77.
29. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.

30. Oncolor, Réseau Régional de Cancérologie Lorraine, Carol, Réseau Régional de Cancérologie Alsace, OncoBourgogne, Réseau de Cancérologie Bourgogne, et al. Référentiel interrégional (Alsace, Bourgogne, Franche-Comté et Lorraine) de prise en charge du cancer du sein 2012: Oncolor; 2012.
31. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, Van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast. 2012.
32. Weigelt B, Peterse JL, Van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(8):591-602.
33. Martins D, Beca F, Schmitt F. Metastatic breast cancer: mechanisms and opportunities for cytology. *Cytopathology*. 2014;25(4):225-30.
34. Sihto H, Lundin J, Lundin M, Lehtimäki T, Ristimäki A, Holli K, et al. Breast cancer biological subtypes and protein expression predict for the preferential distant metastasis sites: a nationwide cohort study. *Breast Cancer Res*. 2011;13(5):R87.
35. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008;68(9):3108-14.
36. Lacey JV, Jr., Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang SC, Leitzmann MF, et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer*. 2009;9:84.
37. Les facteurs de risque du cancer du sein, INCa. 2013 [29/09/2013]. Available from: <http://www.e-cancer.fr>.
38. Robert J. *Signalisation cellulaire et cancer*. Paris, France: Springer-Verlag. 2010.
39. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):361-70.
40. De Cremoux P, Robert J. Cell signalling and cancer: characterisation of therapeutic targets. *Pathol Biol (Paris)*. 2012;60(4):217-22.

41. Lahiry P, Torkamani A, Schork NJ, Hegele RA. Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):60-74.
42. Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle.* 2004;3(10):1221-4.
43. Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med.* 2007;13(12):527-34.
44. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(5):341-54.
45. Hynes NE, Horsch K, Olayioye MA, Badache A. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8(3):151-9.
46. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(2):177-84.
47. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):127-37.
48. Hudis CA. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med.* 2007;357(1):39-51.
49. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006;7(8):606-19.
50. Harle A, Lion M, Lozano N, Husson M, Harter V, Genin P, et al. Analysis of PIK3CA exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: correlation with clinicopathological criteria. *Oncol Rep.* 2013;29(3):1043-52.
51. McAuliffe PF, Meric-Bernstam F, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Deciphering the role of PI3K/Akt/mTOR pathway in breast cancer biology and pathogenesis. *Clin Breast Cancer.* 2010;10 Suppl 3:S59-65.
52. Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ERalpha, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res.* 2012;14(1):R28.

53. Brunner-Kubath C, Shabbir W, Saferding V, Wagner R, Singer CF, Valent P, et al. The PI3 kinase/mTOR blocker NVP-BEZ235 overrides resistance against irreversible ErbB inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;129(2):387-400.
54. Gonzalez-Angulo AM, Blumenschein GR, Jr. Defining biomarkers to predict sensitivity to PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(4):313-20.
55. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(8):627-44.
56. Bendell JC, Rodon J, Burris HA, de Jonge M, Verweij J, Birle D, et al. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2012;30(3):282-90.
57. Coutte L, Dreyer C, Sablin MP, Faivre S, Raymond E. [PI3K-AKT-mTOR pathway and cancer]. *Bull Cancer.* 2012;99(2):173-80.
58. Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer.* 2011;2(3):261-74.
59. Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene.* 2007;26(9):1338-45.
60. Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM. The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):751-9.
61. Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol.* 2001;14(7):672-6.
62. Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(4):289-301.
63. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, Cotrupi S, Barassi F, Del Grammastro M, et al. Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2007;13(20):6064-9.

64. Boyault S, Drouet Y, Navarro C, Bachelot T, Lasset C, Treilleux I, et al. Mutational characterization of individual breast tumors: TP53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132(1):29-39.
65. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu MF, Chamness GC, Wong H, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol.* 2011;29(2):166-73.
66. Wang L, Zhang Q, Zhang J, Sun S, Guo H, Jia Z, et al. PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC Cancer.* 2011;11:248.
67. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 2004;6(2):117-27.
68. Pandolfi PP. Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment. *N Engl J Med.* 2004;351(22):2337-8.
69. Razis E, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Kalofonos HP, Pavlakis K, et al. Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(2):447-56.
70. Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, et al. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer.* 2006;94(2):247-52.
71. Kechagioglou P, Papi RM, Provatopoulou X, Kalogera E, Papadimitriou E, Grigoropoulos P, et al. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Res.* 2014;34(3):1387-400.
72. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(16):5049-59.

73. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer*. 2006;94(4):455-9.
74. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, Cummins JM, Delong L, Cheong I, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*. 2005;7(6):561-73.
75. Perez-Tenorio G, Alkhorri L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjold B, Rutqvist LE, et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(12):3577-84.
76. Liu P, Cheng H, Santiago S, Raeder M, Zhang F, Isabella A, et al. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms. *Nat Med*. 2011;17(9):1116-20.
77. Rexer BN, Chanthaphaychith S, Dahlman K, Arteaga CL. Direct inhibition of PI3K in combination with dual HER2 inhibitors is required for optimal antitumor activity in HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2014;16(1):R9.
78. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(8):772-5.
79. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65(7):2554-9.
80. Dunlap J, Le C, Shukla A, Patterson J, Presnell A, Heinrich MC, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;120(2):409-18.
81. Mangone FR, Bobrovnitshaia IG, Salaorni S, Manuli E, Nagai MA. PIK3CA exon 20 mutations are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(11):1285-90.

82. Harle A, Lion M, Lozano N, Merlin JL. Clinical, diagnostic significance and theranostic interest of PIK3CA gene mutations in breast cancer. *Bull Cancer*. 2013;100(10):947-54.
83. Cizkova M, Dujaric ME, Lehmann-Che J, Scott V, Tembo O, Asselain B, et al. Outcome impact of PIK3CA mutations in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab. *Br J Cancer*. 2013;108(9):1807-9.
84. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol*. 2010;177(4):1647-56.
85. Jensen JD, Knoop A, Laenkholm AV, Grauslund M, Jensen MB, Santoni-Rugiu E, et al. PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol*. 2012;23(8):2034-42.
86. Abramson V, Arteaga CL. New strategies in HER2-overexpressing breast cancer: many combinations of targeted drugs available. *Clin Cancer Res*. 2011;17(5):952-8.
87. Orlando L, Schiavone P, Fedele P, Calvani N, Nacci A, Rizzo P, et al. Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2010;36 Suppl 3:S67-71.
88. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4452-61.
89. Ma CX, Crowder RJ, Ellis MJ. Importance of PI3-kinase pathway in response/resistance to aromatase inhibitors. *Steroids*. 2011;76(8):750-2.
90. Loi S, Michiels S, Baselga J, Bartlett JM, Singhal SK, Sabine VS, et al. PIK3CA genotype and a PIK3CA mutation-related gene signature and response to everolimus and letrozole in estrogen receptor positive breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(1):e53292.
91. Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, et al. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res*. 2008;68(19):8022-30.

92. Barbareschi M, Cuorvo LV, Girlando S, Bragantini E, Eccher C, Leonardi E, et al. PI3KCA mutations and/or PTEN loss in Her2-positive breast carcinomas treated with trastuzumab are not related to resistance to anti-Her2 therapy. *Virchows Arch.* 2012;461(2):129-39.
93. Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):224.
94. Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res.* 2008;68(22):9221-30.
95. Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Monden M, Noguchi S. Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2 Pt 1):408-14.
96. Li SY, Rong M, Grier F, Iacopetta B. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;96(1):91-5.
97. Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012;66(2):105-43.
98. Avruch J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1150-60.
99. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007;26(22):3279-90.
100. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2008;60(3):261-310.
101. Maemura M, Iino Y, Koibuchi Y, Yokoe T, Morishita Y. Mitogen-activated protein kinase cascade in breast cancer. *Oncology.* 1999;57 Suppl 2:37-44.

102. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(6):320-8.
103. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(8):935-46.
104. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(8):1358-75.
105. Chen L, Mayer JA, Krisko TI, Speers CW, Wang T, Hilsenbeck SG, et al. Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009;69(23):8853-61.
106. Merlin JL, Harle A, Lion M, Ramacci C, Leroux A. Expression and activation of P38 MAP kinase in invasive ductal breast cancers: correlation with expression of the estrogen receptor, HER2 and downstream signaling phosphorylated proteins. *Oncol Rep.* 2013;30(4):1943-8.
107. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* 2000;12(1):1-13.
108. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005;15(1):11-8.
109. New L, Han J. The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trends Cardiovasc Med.* 1998;8(5):220-8.
110. Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res.* 2009;11(5):209.
111. Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer.* 2013;4(9-10):342-59.
112. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):537-49.

113. Tang L, Han X. The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(2):179-82.
114. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol.* 2005;23(11):2469-76.
115. Esteva FJ, Sahin AA, Smith TL, Yang Y, Pusztai L, Nahta R, et al. Prognostic significance of phosphorylated P38 mitogen-activated protein kinase and HER-2 expression in lymph node-positive breast carcinoma. *Cancer.* 2004;100(3):499-506.
116. Harrell JC, Dye WW, Allred DC, Jedlicka P, Spoelstra NS, Sartorius CA, et al. Estrogen receptor positive breast cancer metastasis: altered hormonal sensitivity and tumor aggressiveness in lymphatic vessels and lymph nodes. *Cancer Res.* 2006;66(18):9308-15.
117. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(3):205-13.
118. Jordan VC, Brodie AM. Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids.* 2007;72(1):7-25.
119. Swaby RF, Sharma CG, Jordan VC. SERMs for the treatment and prevention of breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8(3):229-39.
120. Jordan VC. Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(1):46-53.
121. Pietras RJ. Biologic basis of sequential and combination therapies for hormone-responsive breast cancer. *Oncologist.* 2006;11(7):704-17.
122. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit NOLVADEX®. Paris, France, 2013.
123. Zhou WB, Ding Q, Chen L, Liu XA, Wang S. Toremifene is an effective and safe alternative to tamoxifen in adjuvant endocrine therapy for breast cancer: results of four randomized trials. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(3):625-31.
124. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit FARESTON® Paris, France, 2013.

125. Yeh WL, Shioda K, Coser KR, Rivizzigno D, McSweeney KR, Shioda T. Fulvestrant-induced cell death and proteasomal degradation of estrogen receptor alpha protein in MCF-7 cells require the CSK c-Src tyrosine kinase. *PLoS One*. 2013;8(4):e60889.
126. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit FASLODEX®. Paris, France, 2013.
127. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(24):2431-42.
128. Campos SM. Aromatase inhibitors for breast cancer in postmenopausal women. *Oncologist*. 2004;9(2):126-36.
129. Vidal: résumé des caractéristiques du produit ARIMIDEX®. Paris, France, 2013.
130. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit FEMARA®. Paris, France 2013.
131. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit EXEMESTANE®. Paris, France, 2013.
132. Schiavon G, Smith IE. Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2014;16(2):206.
133. Johnston SR, Dowsett M. Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(11):821-31.
134. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(4):325-38.
135. Gemmete JJ, Mukherji SK. Trastuzumab (herceptin). *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32(8):1373-4.
136. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol*. 2007;18(6):977-84.
137. Baselga J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 7:vii36-40.

138. Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006;3(5):269-80.
139. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol.* 2005;23(19):4265-74.
140. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit Herceptin®. Paris, France 2013.
141. Barnett CM. Everolimus: targeted therapy on the horizon for the treatment of breast cancer. *Pharmacotherapy.* 2012;32(4):383-96.
142. Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM, Menard S, Balsari A. Activity and resistance of trastuzumab according to different clinical settings. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(3):212-7.
143. Ismael G, Hegg R, Muehlbauer S, Heinzmann D, Lum B, Kim SB, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of (neo)adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive, clinical stage I-III breast cancer (HannaH study): a phase 3, open-label, multicentre, randomised trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(9):869-78.
144. HERCEPTIN® sous-cutanée: Avis de la Commission de la Transparence du 2 Avril 2014, HAS. 2014 [12/05/2014]. Available from: [www.has-sante.fr/](http://www.has-sante.fr/).
145. McCormack PL. Pertuzumab: a review of its use for first-line combination treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. *Drugs.* 2013;73(13):1491-502.
146. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol.* 2010;28(7):1138-44.
147. Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(2):109-19.
148. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit PERJETA®. Paris, France 2013.

149. PERJETA® 420 mg: Avis de la Commission de la Transparence 24 Juillet 2013, HAS, 2013 [10/08/2013]. Available from: [www.has-sante.fr/](http://www.has-sante.fr/).
150. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit Avastin®. Paris, France, 2013.
151. Avastin®: Avis de la Commission de la Transparence 25 mai 2011, HAS, 2011 [04/04/2013]. Available from: [www.has-sante.fr/](http://www.has-sante.fr/).
152. Muhsin M, Graham J, Kirkpatrick P. Bevacizumab. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(12):995-6.
153. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;367(19):1783-91.
154. Kadcyła®: Avis de la Commission de la Transparence 19 Mars 2014, HAS, 2014 [02/06/2014]. Available from: [www.has-sante.fr/](http://www.has-sante.fr/).
155. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(26):2733-43.
156. Moy B, Goss PE. Lapatinib: current status and future directions in breast cancer. *Oncologist.* 2006;11(10):1047-57.
157. Xia W, Bisi J, Strum J, Liu L, Carrick K, Graham KM, et al. Regulation of survivin by ErbB2 signaling: therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Res.* 2006;66(3):1640-7.
158. Vidal: Résumé des caractéristiques du produit TYVERB®. Paris, France, 2013.
159. Campone M, Kerbrat P, Roché H, Bennouna J, Cuillière J, Le Mevel B, et al. Prospects from the bench to the development of signal transduction inhibitors: application for breast cancer. *Bull Cancer.* 2003.
160. Andre F, O'Regan R, Ozguroglu M, Toi M, Xu B, Jerusalem G, et al. Everolimus for women with trastuzumab-resistant, HER2-positive, advanced breast cancer (BOLERO-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(6):580-91.

161. LoRusso PM. Mammalian target of rapamycin as a rational therapeutic target for breast cancer treatment. *Oncology*. 2013;84(1):43-56.
162. Borders EB, Bivona C, Medina PJ. Mammalian target of rapamycin: biological function and target for novel anticancer agents. *Am J Health Syst Pharm*. 2010;67(24):2095-106.
163. Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*. 2013;497(7448):217-23.
164. Hurvitz SA, Dalenc F, Campone M, O'Regan RM, Tjan-Heijnen VC, Gligorov J, et al. A phase 2 study of everolimus combined with trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-overexpressing advanced breast cancer that progressed during prior trastuzumab and taxane therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;141(3):437-46.
165. Atkins MB, Yasothan U, Kirkpatrick P. Everolimus. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):535-6.
166. AFINITOR®: Avis de la Commission de la Transparence 3 Avril 2013, HAS, 2013 [25/05/2013]. Available from: <http://www.has-sante.fr>.
167. Oudard S, Elaidi RT. Sequential therapy with targeted agents in patients with advanced renal cell carcinoma: optimizing patient benefit. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(8):981-7.
168. Nahta R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol*. 2012;2012:428062.
169. Nahta R, Esteva FJ. Trastuzumab: triumphs and tribulations. *Oncogene*. 2007;26(25):3637-43.
170. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(4):395-402.
171. Chen FL, Xia W, Spector NL. Acquired resistance to small molecule ErbB2 tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):6730-4.

172. Guo S, Sonenshein GE. Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2004;24(19):8681-90.
173. Trowe T, Boukouvala S, Calkins K, Cutler RE, Jr., Fong R, Funke R, et al. EXEL-7647 inhibits mutant forms of ErbB2 associated with lapatinib resistance and neoplastic transformation. *Clin Cancer Res*. 2008;14(8):2465-75.
174. Lee JW, Soung YH, Seo SH, Kim SY, Park CH, Wang YP, et al. Somatic mutations of ERBB2 kinase domain in gastric, colorectal, and breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2006;12(1):57-61.
175. Qi X, Zhi H, Lepp A, Wang P, Huang J, Basir Z, et al. p38gamma mitogen-activated protein kinase (MAPK) confers breast cancer hormone sensitivity by switching estrogen receptor (ER) signaling from classical to nonclassical pathway via stimulating ER phosphorylation and c-Jun transcription. *J Biol Chem*. 2012;287(18):14681-91.
176. Davidson B, Konstantinovskiy S, Kleinberg L, Nguyen MT, Bassarova A, Kvalheim G, et al. The mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2006;102(3):453-61.
177. Luporsi E. Validation des biomarqueurs, niveau de preuve et essais cliniques adaptatifs, Les biomarqueurs moléculaires en oncologie, sous la direction de Jean-Louis Merlin Paris, France: Springer-Verlag. 2014.
178. Vorkas PA, Poupouridou N, Agelaki S, Kroupis C, Georgoulas V, Lianidou ES. PIK3CA hotspot mutation scanning by a novel and highly sensitive high-resolution small amplicon melting analysis method. *J Mol Diagn*. 2010;12(5):697-704.
179. Simi L, Pratesi N, Vignoli M, Sestini R, Cianchi F, Valanzano R, et al. High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(2):247-53.
180. Board RE, Thelwell NJ, Ravetto PF, Little S, Ranson M, Dive C, et al. Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA. *Clin Chem*. 2008;54(4):757-60.

181. Chergui F, Chretien AS, Bouali S, Ramacci C, Rouyer M, Bastogne T, et al. Validation of a phosphoprotein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. *Clin Chem*. 2009;55(7):1327-36.
182. Hofman V, Ilie M, Gavric-Tanga V, Lespinet V, Mari M, Lassalle S, et al. [Role of the surgical pathology laboratory in the pre-analytical approach of molecular biology techniques]. *Ann Pathol*. 2010;30(2):85-93.
183. Groenen PJ, Blokk WA, Diepenbroek C, Burgers L, Visinoni F, Wesseling P, et al. Preparing pathology for personalized medicine: possibilities for improvement of the pre-analytical phase. *Histopathology*. 2011;59(1):1-7.
184. Bellocq JP, Egele C, De Crémoux P, Ruck R, Mathelin C, Luporsi E, et al. Prélèvements tissulaires tumoraux pour analyses moléculaires : comment les gérer au mieux ? 32es Journées de la SFSPM, Strasbourg. 2010.
185. Lai YL, Mau BL, Cheng WH, Chen HM, Chiu HH, Tzen CY. PIK3CA exon 20 mutation is independently associated with a poor prognosis in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(4):1064-9.
186. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res*. 2004;64(21):7678-81.
187. Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, et al. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2005;7(5):R609-16.
188. Dumont AG, Dumont SN, Trent JC. The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. *Chin J Cancer*. 2012;31(7):327-34.
189. Lerma E, Catusus L, Gallardo A, Peiro G, Alonso C, Aranda I, et al. Exon 20 PIK3CA mutations decreases survival in aggressive (HER-2 positive) breast carcinomas. *Virchows Arch*. 2008;453(2):133-9.
190. Aleskandarany MA, Rakha EA, Ahmed MA, Powe DG, Paish EC, Macmillan RD, et al. PIK3CA expression in invasive breast cancer: a biomarker of poor prognosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122(1):45-53.

191. Bouchalova K, Cizkova M, Cwiertka K, Trojanec R, Friedecky D, Hajduch M. Lapatinib in breast cancer - the predictive significance of HER1 (EGFR), HER2, PTEN and PIK3CA genes and lapatinib plasma level assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010;154(4):281-8.
192. Ellis MJ, Lin L, Crowder R, Tao Y, Hoog J, Snider J, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119(2):379-90.
193. Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H, Do KA, Sangai T, Adkins F, et al. PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2012;18(6):1777-89.
194. Weigelt B, Warne PH, Downward J. PIK3CA mutation, but not PTEN loss of function, determines the sensitivity of breast cancer cells to mTOR inhibitory drugs. *Oncogene.* 2011;30(29):3222-33.
195. Juric D, Argiles G, Burris H, Gonzalez-Angulo A, Saura C, Quadt C, et al. Phase I study of BYL719, an alpha-specific PI3K inhibitor, in patients with PIK3CA mutant advanced solid tumors: preliminary efficacy and safety in patients with PIK3CA mutant ER-positive (ER+) metastatic breast cancer (MBC). *Cancer Res.* 2012;72(24 Supplement):P6-10-07.
196. O'Brien NA, McDonald K, Tong L, von Eeuw E, Kalous O, Conklin D, et al. Targeting PI3K/mTOR overcomes resistance to HER2-targeted therapy independent of feedback activation of AKT. *Clin Cancer Res.* 2014;20(13):3507-20.
197. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest.* 2008;118(9):3065-74.
198. Carracedo A, Baselga J, Pandolfi PP. Deconstructing feedback-signaling networks to improve anticancer therapy with mTORC1 inhibitors. *Cell Cycle.* 2008;7(24):3805-9.
199. Svensson S, Jirstrom K, Ryden L, Roos G, Emdin S, Ostrowski MC, et al. ERK phosphorylation is linked to VEGFR2 expression and Ets-2 phosphorylation in breast cancer

and is associated with tamoxifen treatment resistance and small tumours with good prognosis. *Oncogene*. 2005;24(27):4370-9.

200. Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, et al. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res*. 2008;68(3):826-33.

201. Antoon JW, Bratton MR, Guillot LM, Wadsworth S, Salvo VA, Elliott S, et al. Pharmacology and anti-tumor activity of RWJ67657, a novel inhibitor of p38 mitogen activated protein kinase. *Am J Cancer Res*. 2012;2(4):446-58.

202. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000;74(5):311-7.

203. Wang LH, Yang XY, Zhang X, An P, Kim HJ, Huang J, et al. Disruption of estrogen receptor DNA-binding domain and related intramolecular communication restores tamoxifen sensitivity in resistant breast cancer. *Cancer Cell*. 2006;10(6):487-99.

204. Nemere I, Pietras RJ, Blackmore PF. Membrane receptors for steroid hormones: signal transduction and physiological significance. *J Cell Biochem*. 2003;88(3):438-45.

205. Nicholson RI, Staka C, Boyns F, Hutcheson IR, Gee JM. Growth factor-driven mechanisms associated with resistance to estrogen deprivation in breast cancer: new opportunities for therapy. *Endocr Relat Cancer*. 2004;11(4):623-41.

206. Donnelly SM, Paplomata E, Peake BM, Sanabria E, Chen Z, Nahta R. P38 MAPK contributes to resistance and invasiveness of HER2- overexpressing breast cancer. *Curr Med Chem*. 2014;21(4):501-10.

207. Qi X, Pohl NM, Loesch M, Hou S, Li R, Qin JZ, et al. p38alpha antagonizes p38gamma activity through c-Jun-dependent ubiquitin-proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response. *J Biol Chem*. 2007;282(43):31398-408.

208. Meng F, Zhang H, Liu G, Kreike B, Chen W, Sethi S, et al. p38gamma mitogen-activated protein kinase contributes to oncogenic properties maintenance and resistance to poly (ADP-ribose)-polymerase-1 inhibition in breast cancer. *Neoplasia*. 2011;13(5):472-82.

209. Qi X, Hou S, Lepp A, Li R, Basir Z, Lou Z, et al. Phosphorylation and stabilization of topoisomerase IIalpha protein by p38gamma mitogen-activated protein kinase sensitize breast cancer cells to its poisons. *J Biol Chem*. 2011;286(41):35883-90.
210. Salh B, Marotta A, Wagey R, Sayed M, Pelech S. Dysregulation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream effectors in human breast cancer. *Int J Cancer*. 2002;98(1):148-54.
211. Han YC, Zeng XX, Wang R, Zhao Y, Li BL, Song M. Correlation of p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway to uPA expression in breast cancer. *Ai Zheng*. 2007;26(1):48-53.
212. Bhatt S, Xiao Z, Meng Z, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation by p38 mitogen-activated protein kinase promotes estrogen receptor alpha turnover and functional activity via the SCF(Skp2) proteasomal complex. *Mol Cell Biol*. 2012;32(10):1928-43.
213. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Grund D, Hemminger G, Muller V, et al. Expression and prognostic relevance of activated extracellular-regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;92(12):2206-15.
214. Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, Skoog L, Lehtio J. Vascular endothelial growth factor receptor 2 and downstream p38 mitogen-activated protein kinase are possible candidate markers of intrinsic resistance to adjuvant endocrine treatment in steroid receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125(2):457-65.
215. Park SS, Kim SW. Activated Akt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with HER2 overexpression. *Oncol Rep*. 2007;18(1):139-43.



**N° d'identification : 6675**

**TITRE**

**Etude de nouveaux biomarqueurs tumoraux et détermination de leurs impacts sur la réponse aux thérapies ciblées dans le traitement du cancer du sein**

**Thèse soutenue le 17 Octobre 2014**

**Par Maëva LION**

**RESUME :**

Les voies de signalisation intracellulaire PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase, situées en aval des récepteurs HER, ont une implication majeure en oncogénèse mammaire et sont étudiées pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques anticancéreuses. Le gène codant la sous-unité catalytique p110 $\alpha$  de la PI3Kinase (*PIK3CA*) est muté dans 18 à 45% des carcinomes mammaires. Le but de l'étude était d'évaluer la signification clinique et l'intérêt théranostique du statut mutationnel du gène *PIK3CA* ainsi que le niveau d'expression des phosphoprotéines des voies PI3K/AKT/mTOR et RAS/RAF/MAPKinase dans les cancers du sein. La recherche des mutations des exons 9 et 20 du gène *PIK3CA* a été réalisée par PCR-HRM sur 118 échantillons de tumeurs de sein inclus en paraffine et par PCR-ARMS Scorpion sur une population de 149 tumeurs de sein. L'étude du niveau d'expression des phosphoprotéines a, elle, été réalisée sur 45 échantillons congelés de tumeurs mammaires canalaire invasives par la technique BPA qui est une technique ELISA sur billes avec détection fluorimétrique.

Concernant l'étude du statut mutationnel du gène *PIK3CA*, les mutations de l'exon 20 ont été plus fréquemment retrouvées dans les tumeurs de grade SBR II et III. L'étude des phosphoprotéines montre, quant à elle, que les niveaux d'expression de la P38MAPKinase et de sa forme phosphorylée sont significativement supérieurs dans les tumeurs RE+ et à l'inverse plus faibles dans les tumeurs triple-négatives.

Le statut mutationnel du gène *PIK3CA* et le niveau d'expression de la P38MAPKinase pourraient être utilisés comme biomarqueurs prédictifs de la réponse aux thérapies ciblées, mais également comme marqueurs pronostiques, et ainsi améliorer la personnalisation thérapeutique.

**MOTS CLES : Cancer du sein, Biomarqueurs, Mutations *PIK3CA*, P38MAPKinase, Thérapies ciblées**

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr. Jean-Louis Merlin (PU-PH)	Unité de Biologie des Tumeurs Service de Biopathologie Institut de Cancérologie de Lorraine	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle