

## Quel est l'apport de la biologie pour les patientes ?

# Vers une nouvelle classification des cancers du sein : apport de la biologie moléculaire

### *Toward a new breast carcinoma classification based on molecular biology*

**Mots-clés :** Cancer du sein – Carcinome luminal – Carcinome *basal-like* – Carcinome apocrine – BRCA1.

**Keywords:** *Breast carcinoma – Luminal carcinoma – Basal-like carcinoma – Apocrine carcinoma – BRCA1.*

**A. Vincent-Salomon\*, \*\*, B. Sigal-Zafrani\***

La classification OMS des carcinomes infiltrants du sein définit 21 entités. Une meilleure compréhension des anomalies moléculaires des cancers du sein entraîne progressivement une amélioration de cette classification, donnant une part croissante aux caractéristiques biologiques de chaque type tumoral conditionnant le pronostic.

La réalisation de profils d'expression nécessite l'accès à une technologie sophistiquée, réservée le plus souvent à des essais cliniques ou à des centres spécialisés.

Il est donc important pour le pathologiste de bien reconnaître les types histologiques et moléculaires principaux, pour une prise en charge thérapeutique adéquate du plus grand nombre de patientes, y compris en dehors des centres spécialisés. Il est primordial que cliniciens et pathologistes s'accordent en pratique clinique sur les définitions de ces différents types moléculaires pour une prise en charge pluridisciplinaire harmonieuse des patientes.

Les données récentes des puces d'expression (analyse des niveaux d'expression des ARN) complétées par les analyses pan-génomiques (analyse de l'ADN) ont permis d'affiner les caractéristiques moléculaires des carcinomes mammaires et ont ainsi mis en lumière leur hétérogénéité biologique. Cependant, deux classes moléculaires principales de carcinomes du sein caractérisées par des anomalies biologiques très différentes se distinguent l'une de l'autre par leur niveau d'expression des récepteurs aux œstrogènes (récepteurs aux œstrogènes positifs [RO+] et négatifs [RO-]).

Les premières analyses moléculaires ont porté essentiellement sur les données d'expression des cellules carcinomateuses épithéliales. Mais des données d'expression spécifiques des cellules stromales montrent également l'impact pronostique des différents types de stroma observés dans les cancers du sein, qui devraient également permettre, à moyen terme, des développements de stratégies thérapeutiques nouvelles (1).

Les principaux types moléculaires des carcinomes infiltrants actuellement décrits à partir d'une liste de gènes différemment exprimés entre les types tumoraux et nommée "signature

intrinsèque" (2, 3) sont le type luminal A (25 à 40 % des cas) et B (20 à 25 % des cas), le type ERBB2 (15 % des cas), le type *basal-like* (15 à 18 % des cas) et le type *normal-like*, ce type étant vraisemblablement un artéfact lié à une forte contamination des premiers profils d'expression génique réalisés n'ayant donc pas de traduction réelle en pathologie (4). Les types *basal-like* et ERBB2 avec récepteurs aux œstrogènes négatifs sont les types associés aux pronostics les plus défavorables (5). Le type apocrine a ensuite été individualisé (1). Il faut également noter que les différents types moléculaires existent dès le stade de carcinome in situ.

Les différents types histologiques de la classification OMS commencent à être rattachés à ces classes moléculaires dont ils partagent certaines, voire toutes les caractéristiques, ou bien constituent des entités moléculaires à part entière (6).

### **Différents types moléculaires de carcinomes mammaires**

#### **Type luminal A (photo 1a)**

Ce groupe est caractérisé par le niveau d'expression le plus élevé du gène des RO et d'autres gènes (LIV-1, FOXA, XBP1 et GATA3, Stanniocalcine 2 [STC2], SCUBE2...) [2, 3, 5, 7, 8].

En pratique clinique, ce type moléculaire peut être défini comme les carcinomes exprimant les récepteurs aux œstrogènes et de grade I ou II, avec un index de prolifération faible. Le carcinome de type tubuleux est un exemple type de cette classe moléculaire.

#### **Type luminal B (photo 1b)**

Ce type se distingue du type luminal A par un niveau d'expression plus faible des gènes caractérisant le type luminal A et en particulier par l'expression forte d'un groupe de gènes de prolifération (2, 3, 5, 7, 8).

En pratique clinique, ce type moléculaire peut être défini comme les carcinomes exprimant les récepteurs aux œstrogènes de grade II ou III avec fort index de prolifération, mesuré par le compte mitotique sur dix champs microscopiques ou par le niveau d'expression du KI67.

\* Département de biologie des tumeurs, Institut Curie, Paris.

\*\* Inserm U830, Institut Curie, Paris.

Il faut noter que les carcinomes survenant dans le cadre de mutations héréditaires de BRCA2 appartiennent souvent à ce groupe moléculaire.

**Type ERBB2 (photos 1c et 1e)**

Ce type est caractérisé en particulier par une expression forte des gènes de l'amplicon de ERBB2, dont ERBB2 et GR7.

Il existe deux sous-types de carcinomes ERBB2: ceux qui expriment les récepteurs aux œstrogènes et ceux qui ne les expriment pas. Toutefois, l'amplicon ERBB2 comprend toujours la coam-

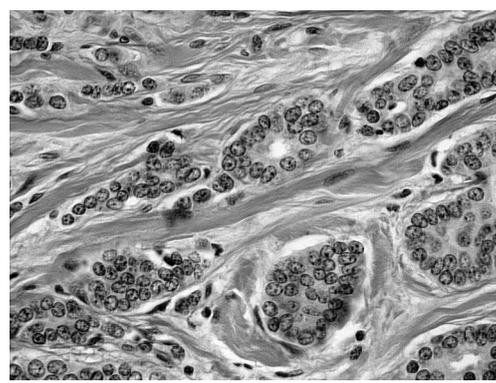
plification et l'expression des gènes PERLD1, GRB7, STARD3 et ERBB2 (2, 3, 5, 7, 8).

En pratique clinique, ce type moléculaire correspond aux carcinomes infiltrants ERBB2 3+ et RO-.

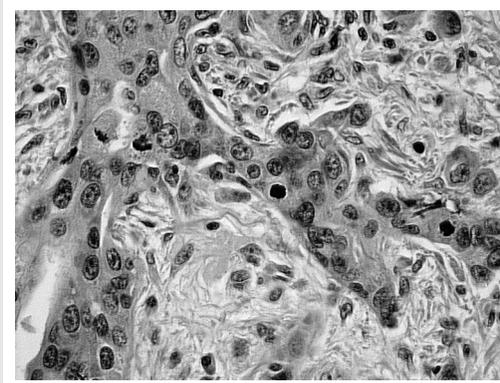
Les carcinomes ERBB2 3+ et exprimant les récepteurs aux œstrogènes peuvent être considérés comme appartenant à la classe moléculaire B (photos 1c et 1e).

Les carcinomes ERBB2 3+ RO+ sont à considérer comme des carcinomes de type luminal B.

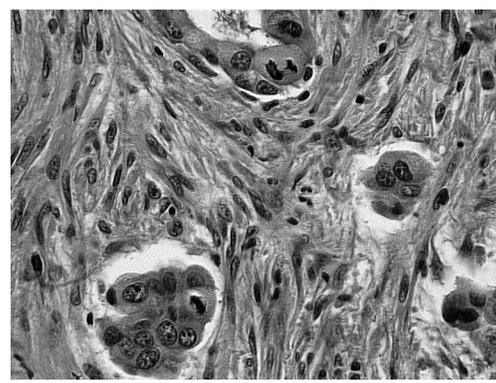
**Photos 1.** Aspects morphologiques caractéristiques de chaque type moléculaire.



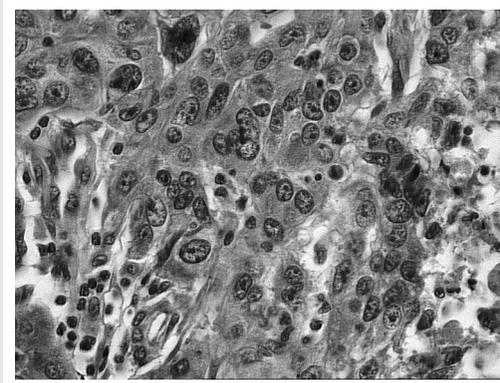
a. Exemple de carcinome de type luminal A (coloration HES).



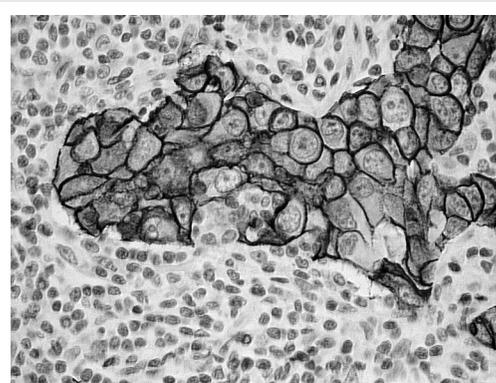
b. Exemple de carcinome de type luminal B (coloration HES).



c. Exemple de carcinome de type ERBB2.



d. Exemple de carcinome de type basal-like (coloration HES).



e. Marquage membranaire complet et intense, évalué 3+, à l'aide de l'anticorps anti-ERBB2 monoclonal CB11.



f. Expression cytoplasmique des cytokeratines 5 et 6 par le carcinome de type basal-like (anticorps anticytokeratines 5 et 6).

### **Carcinomes de type basal-like (photos 1d et 1f)**

Le type *basal-like* est caractérisé en analyse transcriptomique par un très faible niveau d'expression des gènes des RO, ERBB2, associé à une expression forte des gènes tels que cytokératines 5, 6 et 17, EGFR, C-KIT, SFRP1, laminine, Fatty-Acid binding Protein 7, intégrine  $\beta$ 4, cavéoline 2, P-cadhérine, MMP7 et TopoII Isomérase a (2, 3, 5, 7, 8).

Sur le plan génomique, les carcinomes *basal-like* présentent de nombreuses altérations génomiques avec plusieurs gains et pertes de segments chromosomiques (9), des mutations du gène P53 dans presque 100 % des cas (10), une activation de la voie AKT avec fréquentes mutations de PTEN (11) et très souvent une inactivation somatique (c'est-à-dire survenant dans la tumeur au cours de la carcinogenèse) du gène BRCA1. De plus, les mutations du gène PI3KCA sont rares (8,7 % des cas) [12].

À la suite des travaux moléculaires, la fréquence au diagnostic parmi les carcinomes mammaires des tumeurs du groupe *basal-like* ainsi que leurs caractéristiques immunophénotypiques et morphologiques ont été décrites (13). Les tumeurs répondant à ce profil forment un spectre lésionnel représentant 10 à 15 % des carcinomes infiltrants du sein et sont caractérisées :

- Sur le plan morphologique, les carcinomes *basal-like* sont de type canalaire, le plus souvent de grade III, peu différenciés, à marges "refoulantes", associés à des plages de nécrose géographique souvent centrale, avec un infiltrat inflammatoire lymphocytaire en périphérie. Les cellules présentent des atypies nucléaires souvent marquées et un index mitotique élevé. Les cellules tumorales sont agencées en travées, sans différenciation glandulaire (14).

- Sur le plan immunophénotypique, on note :
  - la "triple négativité" RO - RP - ERBB2- (ou "triple zéro");
  - l'expression des cytokératines de haut poids moléculaire CK5/6/14, ou EGFR ou KIT.

#### **» Carcinomes de type basal-like : un groupe hétérogène de carcinomes infiltrants sur les plans clinique, biologique et morphologique**

La majorité des carcinomes (85 %) survenant dans un contexte de mutation héréditaire du gène BRCA1 partage les caractéristiques immunophénotypiques, morphologiques et moléculaires des tumeurs de type *basal-like* (15).

D'autres formes rares de carcinomes de bon pronostic partagent ce phénotype *basal-like* sans présenter ces caractéristiques morphologiques et transcriptomiques : ce sont les carcinomes adénoïdes kystiques (16) et les carcinomes sécrétants juvéniles (17).

Donc, attention : toute tumeur de phénotype *basal-like* n'est pas strictement équivalente à l'entité *basal-like*, de grade III, peu différenciée, initialement décrite à partir des puces d'expression.

Des carcinomes non triples négatifs (7,3 %) expriment des marqueurs basaux (cytokératines 5/6 ou 14 ou EGFR), et environ 20 % des carcinomes triples négatifs n'expriment pas les marqueurs basaux (18).

D'un point de vue phénotypique, les carcinomes métaplasiques et médullaires sont considérés comme des carcinomes triples négatifs *basal-like*, c'est-à-dire exprimant les cytokératines de haut poids moléculaire CK5/6 ou 14. Ils partagent la plupart des caractéristiques moléculaires des tumeurs *basal-like* (nombreuses altérations chromosomiques, mutations du gène P53, inactivation somatique du gène BRCA1). Ces lésions ont toutefois certaines caractéristiques morphologiques et/ou moléculaires propres.

Les analyses transcriptomiques comparées des carcinomes médullaires et *basal-like* montrent l'importance de la signature "actine" (liée au stroma myofibroblastique des carcinomes *basal-like* absent dans les carcinomes médullaires) et de la signature dite "lymphocytaire/immune" liée à la particulière abondance d'éléments lymphocytaires dans le stroma de ces tumeurs. Un pronostic favorable a été reconnu au carcinome médullaire dans plusieurs études, ce qui est un paradoxe biologique pour un cancer présentant des facteurs histologiques de mauvais pronostic (grade SBR III, nécrose, négativité des récepteurs hormonaux) [19]. Cette réputation doit cependant être tempérée car, si le carcinome médullaire a un meilleur pronostic que le CCI de grades II et III, il s'agit plutôt d'un cancer répondant bien aux traitements par radiothérapie et chimiothérapie, mais le rôle du stroma (riche en lymphocytes, absence d'actine musculaire lisse) dans la réponse au traitement reste à démontrer.

Les carcinomes métaplasiques sont des tumeurs rares (moins de 5 %) qui peuvent être à cellules fusiformes ou en métaplasie épidermoïde. Ces tumeurs expriment l'EGFR plus fréquemment que les autres carcinomes *basal-like*, rattachée à une amplification de l'EGFR, en particulier dans les carcinomes métaplasiques épidermoïdes (20).

#### **» Intérêt clinique d'identifier les carcinomes basal-like**

Sur le plan clinique, il est important de reconnaître cette entité *basal-like* de grade III, car ces tumeurs présentent une bonne chimiosensibilité qui pourrait être expliquée, entre autres, par leur index de prolifération souvent élevé (21) et/ou un taux de mutation du gène de la P53 particulièrement important (22).

Les chimiothérapies proposées pour ce type de tumeur commencent à être différentes des régimes à base d'anthracyclines, drogue de référence des carcinomes mammaires. Plus récemment, des essais cliniques menés dans certains centres spécialisés commencent à démontrer l'efficacité d'approches thérapeutiques différentes utilisant des antiangiogéniques et des sels de platine. Les altérations génomiques (type et nombre) de ces tumeurs montrent la présence d'une instabilité génétique importante, identique à celle observée dans les tumeurs BRCA1 et notamment induite par l'inactivation somatique de BRCA1 dans la tumeur. Comme on l'a vu plus haut, elle se traduit par de nombreuses altérations génomiques avec pertes et gains chromosomiques, associée à des mutations de P53 et de PTEN (23, 24). L'inhibition de la voie de réparation des cassures simple-brin de l'ADN par les inhibiteurs de PARP (*Poly-ADP-Ribose-Polymerase*) est une stratégie élégante pour détruire spécifiquement ces cellules tumorales, déjà incapables de réparer les cassures double-brin étant donné l'inactivation de BRCA1. Les premiers résultats des essais de phase I ont été présentés au dernier congrès de l'ASCO 2009 et récemment publiés (24).

Ces perspectives de traitements spécifiquement réservés aux tumeurs de type *basal-like* rendent indispensables une identification fiable par les pathologistes.

En pratique clinique, les carcinomes *basal-like* de grade III sont le plus souvent caractérisés par une absence complète d'expression du gène des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone et de ERBB2 associé à une expression forte des gènes des cytokératines de haut poids moléculaire de type 5/6 ou 14 et de l'EGFR.

Notons que leur reconnaissance en pratique diagnostique pourrait aider à l'identification plus rapide des tumeurs survenant dans un contexte héréditaire BRCA1.

### » Carcinomes apocrines

Un groupe de carcinomes RO-/RP- a été individualisé, différent des tumeurs de types *basal-like*. Ce groupe présente une signature de type "apocrine" avec, en particulier, l'activation de la voie de signalisation du récepteur des androgènes. Ce type représente environ 15% des carcinomes analysés et inclut également certains carcinomes ERBB2 amplifiés (25). Leur phénotype est caractérisé par la négativité des récepteurs aux œstrogènes et la positivité des récepteurs aux androgènes. Cette observation ouvre des perspectives de nouvelles possibilités thérapeutiques hormonales antiandrogènes.

## Valeur pronostique des signatures stromales des carcinomes infiltrants

Les tumeurs du sein sont constituées de cellules épithéliales carcinomateuses entourées de stroma d'abondance variée, composé de fibroblastes, de myofibroblastes, de cellules endothéliales et de cellules inflammatoires mononuclées. Le rôle du stroma tumoral étant de plus en plus évident dans la progression tumorale, certaines équipes ont montré la valeur pronostique de signatures transcriptomiques liées au stroma (1, 26).

En pratique clinique, les pathologistes pourront à terme quantifier l'infiltrat lymphocytaire, préciser la nature du stroma myofibroblastique ou fibroblastique, ou évaluer l'expression de marqueurs importants pour le pronostic issus des données des puces d'expression d'analyse des gènes du stroma, avec des outils simples sur les coupes tissulaires colorées ou par immunohistochimie. Comme pour tout marqueur immunophénotypique, cela nécessitera une standardisation et une harmonisation des pratiques entre pathologistes.

## Comment s'intègrent les autres principaux types histologiques dans la classification moléculaire des cancers du sein ?

Le deuxième type histologique le plus fréquent est le **type lobulaire**. Si les carcinomes lobulaires partagent des caractéristiques biologiques avec les CCI de type luminal A (comme l'expression des récepteurs aux œstrogènes et une prolifération faible ou modérée),

ils s'en distinguent en particulier par l'existence de mutations fréquentes du gène de la E-cadhérine, survenant dans la carcinogénèse lobulaire dès le stade in situ.

Il a été montré que les carcinomes lobulaires présentaient des anomalies génomiques chromosomiques spécifiques par rapport aux CCI luminal A avec, en particulier, la récurrence d'une région d'amplification sur le bras court du chromosome 8 (8p12) centrée sur une phosphatase FGFR1 qui pourrait être une cible potentielle de traitement.

Les CLI ont des caractéristiques transcriptomiques qui les distinguent des CCI (27, 28). En pratique clinique, les pathologistes identifient les CLI sur leur aspect morphologique et peuvent s'aider si nécessaire de l'absence d'expression de la E-cadhérine en immunohistochimie.

Les carcinomes de type micropapillaire appartiennent le plus souvent à la classe moléculaire de type luminal B mais ils ont des particularités moléculaires qui les distinguent des autres tumeurs luminales, même si ces données de Weigelt et al. (6) ne reposent pour l'instant que sur moins de dix cas. Les données récentes de génomique montrent que ces tumeurs présentent de nombreuses régions d'amplification avec des profils génomiques souvent complexes (29).

## Conclusion

Les progrès des analyses moléculaires dans la compréhension de l'hétérogénéité des cancers du sein contribue à faire évoluer la prise en charge clinique des patientes.

L'identification des sous-types moléculaires qui bénéficieront à court terme de traitements spécifiques doit pouvoir être accessible au plus grand nombre.

Les pathologistes sont des acteurs clés de cette identification : leurs outils diagnostiques quotidiens sont essentiellement le grade suivant la méthodologie d'Elston et Ellis, l'analyse de l'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, et ERBB2, à intégrer avec les types histologiques au fur et à mesure de la description des caractéristiques moléculaires de ces tumeurs.

La fiabilité de ces tests dépend évidemment des contrôles de qualité des laboratoires et de leur entraînement, suivant le réseau d'expertise qui se constitue petit à petit en France depuis l'utilisation du statut de ERBB2 dans la stratégie des choix des thérapeutiques anti-ERBB2. ■

## Références bibliographiques

- [1] Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 2009;15:68-74.
- [2] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 2001;98:10869-74.
- [3] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
- [4] Parker JS, Mullins M, Cheang MC et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27:1160-7.
- [5] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS* 2003;100:8418-23.
- [6] Weigelt B, Horlings HM, Kreike B et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* 2008;216:141-50.
- [7] Hu Z, Fan C, Oh DS et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006;7:96.

- [8] Sotiriou C, Neo SY, McShane LM et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10393-8.
- [9] Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res* 2007;9:R24.
- [10] Manie E, Vincent-Salomon A, Lehmann-Che J et al. High frequency of TP53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors. *Cancer Res* 2009;69:663-71.
- [11] Marty B, Maire V, Gravier E et al. Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008;10:R101.
- [12] Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stenke-Hale K et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res* 2009;69:4116-24.
- [13] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5367-74.
- [14] Livasy CA, Karaca G, Nanda R et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19:264-71.
- [15] Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *JNCI Cancer Spectrum* 2003;95:1482-5.
- [16] Azoulay S, Lae M, Freneaux P et al. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol* 2005;18:1623-31.
- [17] Lae M, Freneaux P, Sastre-Garau X, Chouchane O, Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A. Secretory breast carcinomas with ETV6-NTRK3 fusion gene belong to the basal-like carcinoma spectrum. *Mod Pathol* 2009;22:291-8.
- [18] Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol* 2008;26:2568-81.
- [19] Dendale R, Vincent-Salomon A, Mouret-Fourme E et al. Medullary breast carcinoma: prognostic implications of p53 expression. *Int J Biol Markers* 2003;18:99-105.
- [20] Reis-Filho JS, Pinheiro C, Lambros MB et al. EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *J Pathol* 2006;209:445-53.
- [21] Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:5678-85.
- [22] Bertheau P, Turpin E, Rickman DS et al. Exquisite sensitivity of TP53 mutant and basal breast cancers to a dose-dense epirubicin-cyclophosphamide regimen. *PLoS Med* 2007;4:e90.
- [23] Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol* 2008;26:3785-90.
- [24] Fong PC, Boss DS, Yap TA et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009;361:123-34.
- [25] Farmer P, Bonnefoi H, Becette V et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005;24:4660-71.
- [26] Finak G, Bertos N, Pepin F et al. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 2008;14:518-27.
- [27] Bertucci F, Orsetti B, Negre V et al. Lobular and ductal carcinomas of the breast have distinct genomic and expression profiles. *Oncogene* 2008;27:5359-72.
- [28] Reis-Filho JS, Simpson PT, Turner NC et al. FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006;12:6652-62.
- [29] Marchio C, Iravani M, Natrajan R et al. Genomic and immunophenotypic characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast. *J Pathol* 2008;215:398-410.