

# Définition biologique de l'agressivité tumorale : les signatures biologiques peuvent-elles être utilisées en pratique clinique ?

*Biological definition of tumor aggressiveness:  
are molecular signatures ready to be used  
in clinical practice?*

M. Arnedos<sup>1,2</sup>, S. Delaloge<sup>1</sup> et F. André<sup>1,2</sup>

*Mots clés :* cancer du sein, grade, récepteurs hormonaux, chimiothérapie

*Keywords:* breast cancer, tumor grade, hormone receptors, chemotherapy

Les technologies d'immunomarquage et d'analyse d'expression génomique ont permis de répartir les cancers du sein en quatre classes moléculaires. Chacune de ces classes correspond à un pronostic et à une sensibilité aux thérapies distinctes. Les deux principaux marqueurs de classification sont *les récepteurs hormonaux* et *Her2*. Ces deux marqueurs pourraient être complétés par :

- des tests génomiques (oncotype, mammaprint, PAM50) ;
  - ou un immunomarquage par Ki67 pour définir des sous-classes moléculaires.
- Néanmoins, ces derniers tests sont l'objet de controverses et leur utilisation en pratique clinique ne fait pas consensus. Enfin, de nouvelles méthodes de classification de l'agressivité tumorale apparaissent. Ainsi, une analyse du nombre de copies d'ADN et de l'instabilité génomique pourrait donner une bonne évaluation de l'agressivité tumorale. Enfin, des marqueurs liés au stroma pourraient

1 Département de médecine, pathologie mammaire, Institut Gustave Roussy, 94800 Villejuif, France

2 INSERM Unit U981, Institut Gustave Roussy, 94800 Villejuif, France

permettre de différencier les tumeurs triples négatives et celles surexprimant Her2, en matière de pronostic.

## Introduction

Les analyses génomiques à haut débit ont mis en évidence que le cancer du sein correspond en fait à quatre classes moléculaires distinctes [1]. Les cancers du sein de *type basal* n'expriment pas les récepteurs hormonaux, ni Her2, présentent de fortes altérations de la réparation de l'ADN et sont sensibles à la chimiothérapie. Les cancers du sein *avec amplification de Her2* sont associés à un fort risque de rechute spontanée et sont très sensibles aux agents anti-Her2 et à la chimiothérapie. Enfin, les cancers du sein luminaux expriment les récepteurs hormonaux. Ces mêmes cancers du sein luminaux sont souvent divisés en deux sous-catégories : cancers du sein luminal A et B. Les cancers du sein de type luminal B définissent une sous-catégorie présentant un pronostic plus défavorable, en comparaison au sous-type luminal A. Cette définition est fondée sur une analyse « non supervisée » de technologies génomiques à haut débit. Des analyses bioinformatiques plus fines portant sur les voies moléculaires fonctionnelles ont permis de mettre en évidence que les sous-types luminal B présentaient un enrichissement en gènes impliqués dans la prolifération cellulaire [2]. Un travail important de ces dernières années a consisté à générer un test permettant de distinguer les cancers du sein de type luminal A et luminal B, soit un sous-type plus agressif.

Dans ce document, nous rapporterons les résultats obtenus avec les signatures génomiques de 1<sup>re</sup> génération, ainsi qu'avec des outils d'immunomarquage. Enfin, nous discuterons l'apport potentiel de nouvelles approches pour évaluer l'agressivité tumorale.

## Signatures multigéniques de risque de rechute

Il est actuellement admis que la plupart des signatures génomiques de 1<sup>re</sup> génération ont surtout pour intérêt d'identifier *les cancers du sein RE+*, en fonction du pronostic. La signature multigénique la plus utilisée est le test *Oncotype DX*. Ce test évalue l'expression de 21 gènes [3]. Il a été rapporté comme étant pronostique dans 5 études rétrospectives, réalisées avec du matériel collecté dans le cadre d'études prospectives randomisées. L'ensemble des études testant *Oncotype DX*

regroupait plus de 6 000 échantillons. Il est actuellement admis que ce test a une valeur pronostique indiscutable. Certaines données préliminaires [4, 5] suggèrent qu'il pourrait également avoir une valeur prédictive de l'effet de la chimiothérapie adjuvante. Ces dernières données restent à démontrer dans des études de validation, testant notamment les chimiothérapies de 3<sup>e</sup> génération. Au total, ce test a une valeur pronostique indiscutable (« validité clinique » selon les critères EGAPP – Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention). Il n'existe pas d'étude prospective à ce jour validant son utilité médicale selon les critères EGAPP. Cette preuve de l'utilité médicale sera mise en évidence dans l'étude TAILORx testant Oncotype DX de façon prospective, et dont les résultats sont attendus sous peu. Cette conclusion était celle de la conférence de consensus IMPAKT. D'autres conférences de consensus considèrent que ce test peut être utilisé en routine (NCCN – National Comprehensive Cancer Network). Dans l'attente de la preuve de l'utilité médicale, il paraît raisonnable de proposer ce test pour identifier des patientes de bon pronostic, en cas de difficulté de décision pour la chimiothérapie adjuvante (grade II, RE+, Her2- et N-) [6]. Ce test n'est pas remboursé en France, mais est largement utilisé aux États-Unis.

La deuxième signature multigénique la plus étudiée lors de ces dernières années est la signature *Mammaprint* (70 gènes) [7]. Cette signature contient 70 gènes. Sa valeur pronostique a été validée dans 15 articles, regroupant au total 2 440 patientes. Néanmoins, contrairement à Oncotype DX, aucune de ces études n'incluait de population issue d'un essai randomisé. Comme pour Oncotype DX, ce test a montré une valeur pronostique indiscutable dans des études rétrospectives. Un essai prospectif (MINDACT- Microarray In Node-negative and 1 to 3 positive lymph node Disease may Avoid ChemoTherapy) a recruté 6 000 patientes et avait pour objectif de montrer l'utilité médicale du test [8]. Les 1<sup>ers</sup> résultats sont attendus dans 2 ans. À l'opposé d'Oncotype DX, il n'y a pas de preuve que *Mammaprint* ait une valeur prédictive de l'efficacité de la chimiothérapie. Au total, il est recommandé d'attendre les résultats de la validation prospective de l'essai MINDACT avant de prescrire ce test.

Quatre autres tests génomiques ont montré une valeur pronostique pour les patientes avec RE+. Le test *Mapquant* [9] et le *Breast Cancer Index* [10] évaluent l'agressivité tumorale sous la forme d'un grade génomique. Le test *MapQuant* est en cours de validation prospective dans une étude randomisée française menée par le Dr Brain et le groupe UNICANCER. Le test *PAM50* est particulièrement intéressant car il a été désigné spécifiquement pour identifier les tumeurs de

type luminal B [11]. Ce test a été étudié chez plus de 2 000 patientes de façon rétrospective. Il semble présenter des performances intéressantes pour la valeur pronostique, qui pourraient être supérieures à Oncotype DX et aux tests IHC. Enfin, le test *endopredict* est un test développé par la société Sividon [12]. Ce test est particulièrement intéressant car il a démontré de façon formelle une supériorité en comparaison aux tests d'immunohistochimie standards. Ce test a été validé de façon rétrospective dans deux essais randomisés. Cette validation regroupait un total de 2 666 échantillons. Ce test est réalisable par RT-PCR dans les centres hospitaliers, ce qui le différencie de nombreuses signatures, qui nécessitent une analyse centralisée dans des compagnies de biotechnologie.

Au total, les signatures dites de 1<sup>re</sup> génération présentent des valeurs pronostiques indiscutables sur les études rétrospectives. Les trois grandes études prospectives permettront de valider Oncotype DX, Mammaprint et Mapquant. Dans l'attente de ces validations prospectives, Oncotype DX est largement utilisé aux États-Unis, compte tenu de sa robustesse. Néanmoins, ce test est actuellement exclusivement réservé aux patientes pour lesquelles les indications de chimiothérapie sont difficiles à prendre et, si possible, après information de la patiente de l'absence de preuve formelle d'utilité médicale.

## Score immunohistochimie et agressivité tumorale

L'expression des *récepteurs à l'estrogène* et *Her2* sont deux marqueurs permettant une appréciation de l'agressivité tumorale. Ces deux marqueurs permettent une évaluation approximative des sous-classes tumorales. Plus récemment, des études de corrélation ont suggéré que le *Ki67* pouvait permettre de différencier les cancers de type luminal A et B. Néanmoins, dans ces études, les performances du *Ki67* pour identifier un sous-type étaient très modestes pour un test diagnostique, avec une sensibilité de 72 % (95 % CI = 59 % à 82 %) et une spécificité de 77 % (95 % CI = 67 % à 85 %) [13]. De multiples études rétrospectives ont étudié la valeur de *Ki67*. Ces études permettent aujourd'hui d'avoir une idée assez claire du potentiel de ce marqueur. L'ensemble des études montre de façon concordante que le *Ki67* a une valeur pronostique modeste lorsque sont analysés les cancers RE+/Her2/grade II [14]. Par ailleurs, ces études ne montrent pas de valeur prédictive du *Ki67* pour l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante [15, 16]. En effet, aucune étude ne retrouve un test d'interaction chimio *Ki67* statistiquement significatif [17]. Au total, le *Ki67*, indépendamment des problèmes analytiques

que pose le marqueur, semble devoir être utilisé avec une extrême précaution. Ce marqueur n'a pas été considéré comme un marqueur standard pour la pratique clinique par la conférence de consensus IMPAKT. Ce marqueur semble, à ce jour, devoir être réservé à des situations très précises, soit les cancers du sein < 2 cm, RE+ fort, RP+, Her2-négatif, grade II et sans envahissement ganglionnaire, et chez les patientes qui recevront une hormonothérapie optimale.

Les marqueurs RE, RP, Her2 et Ki67 sont actuellement intégrés dans des scores multiprotéines qui pourraient permettre d'améliorer les performances individuelles de chaque marqueur [18].

## Nouvelles méthodes d'évaluation de l'agressivité tumorale

De nouveaux outils sont en train d'émerger qui pourraient permettre d'améliorer l'évaluation de l'agressivité tumorale. Tout d'abord, des études récentes suggèrent que l'évaluation de l'instabilité génomique pourrait permettre de prédire le risque de rechute. En effet, après des études portant sur des effectifs faibles, une large étude a permis de proposer une sous-classification moléculaire basée sur une analyse de type CGH array (technologie permettant de quantifier le nombre de copies de chaque gène) [19]. Cette analyse montre notamment que l'agressivité du cancer du sein peut être définie en fonction de l'instabilité génomique et du nombre de copies d'ADN.

L'analyse de l'activation des kinases pourrait également permettre une appréciation de l'agressivité tumorale [20]. À titre d'exemple, la phosphorylation de certaines kinases a été rapportée pour être pronostique dans le cancer du sein [21, 22].

Enfin, de plus en plus d'arguments suggèrent que l'évaluation de l'infiltration lymphocytaire pourrait permettre d'évaluer l'agressivité tumorale. À titre d'exemple, Loi *et al.* ont montré que l'infiltrat lymphocytaire était associé à un meilleur pronostic dans les cancers du sein triple négatif et Her2 [23]. Ces données sont également retrouvées dans les analyses génomiques à haut débit qui suggèrent que l'activation du système immunitaire prédit la rechute dans ces deux sous-types [24].

## Conclusion

Les deux marqueurs les plus robustes de l'agressivité tumorale sont RE et Her2. Ces deux marqueurs seront complétés sous peu par des tests multigéniques permettant de séparer les cancers de type luminal A et B. Le Ki67, bien qu'associé à des tests statistiques significatifs, présente des performances modestes qui incitent à ne l'utiliser que dans des circonstances spéciales décrites dans le texte. Enfin, l'évaluation de l'infiltrat lymphocytaire, de l'instabilité génomique et de l'activation des kinases devrait permettre de compléter cet arsenal moléculaire dans les années à venir.

## Références

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB *et al.* (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-52
2. Sotiriou C, Pusztai L (2009) Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 360: 790-800
3. Paik S, Shak S, Tang G *et al.* (2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351: 2817-26
4. Paik S, Tang G, Shak S *et al.* (2006) Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24: 3726-34
5. Albain KS, Barlow WE, Shak S *et al.* (2010) Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol* 11: 55-65
6. Engstrom PF, Bloom MG, Demetri GD *et al.* (2011) NCCN molecular testing white paper: effectiveness, efficiency, and reimbursement. *J Natl Compr Canc Netw* 9 (Suppl 6): S1-16
7. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ *et al.* (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-6
8. Cardoso F, Van't Veer L, Rutgers E, Loi S, Mook S, Piccart-Gebhart MJ (2008) Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *J Clin Oncol* 26: 729-35
9. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S *et al.* (2006) Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 98: 262-72
10. Mathieu MC, Mazouni C, Kesty NC *et al.* (2012) Breast Cancer Index predicts pathological complete response and eligibility for breast conserving surgery in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 23: 2046-52
11. Parker JS, Mullins M, Cheang MC *et al.* (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 27: 1160-7
12. Filipits M, Rudas M, Jakesz R *et al.* (2011) A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res* 17: 6012-20

13. Cheang MC, Chia SK, Voduc D *et al.* (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101: 736-50
14. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM *et al.* (2008) Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol* 26: 5569-75
15. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG *et al.* (2008) Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 100: 207-12
16. Bartlett JM, Munro AF, Dunn JA *et al.* (2010) Predictive markers of anthracycline benefit: a prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial (NEAT/BR9601). *Lancet Oncol* 11: 266-74
17. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA (2010) Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 11: 174-83
18. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S *et al.* (2011) Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol* 29: 4273-8
19. Curtis C, Shah SP, Chin SF *et al.* (2012) The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 486: 346-52
20. Bianchini G, Wamoto T, Qi Y *et al.* (2009) Prognostic and therapeutic implications of kinase expression patterns in breast cancer. *Breast Cancer Symposium*: abstract 69
21. Rojo F, Gonzalez-Navarrete I, Bragado R *et al.* (2009) Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human breast cancer independently predicts prognosis and is repressed by doxorubicin. *Clin Cancer Res* 15: 3530-9
22. Finetti P, Cervera N, Charafe-Jauffret E *et al.* (2008) Sixteen-kinase gene expression identifies luminal breast cancers with poor prognosis. *Cancer Res* 68: 767-76
23. Loi S, Michiels S, Lambrechts D *et al.* (2012) Tumor PIK3CA mutations, lymphocyte infiltration, and recurrence-free survival (RFS) in early breast cancer (BC): Results from the FinHER trial. *J Clin Oncol* 30
24. Desmedt C, Majjaj S, Kheddoumi N *et al.* (2012) Characterization and clinical evaluation of CD10+ stroma cells in the breast cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 18: 1004-14