



La valeur prédictive et pronostique d'une faible expression des récepteurs d'estrogènes en cancer du sein

Mémoire

Antoine Bouchard-Fortier

Maîtrise en épidémiologie – épidémiologie clinique
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Antoine Bouchard-Fortier, 2015

Résumé

L'objectif de ce projet fut d'évaluer le bénéfice associé à la thérapie antihormonale (TA) pour les cancers du sein avec des récepteurs d'estrogènes (ER) faiblement positifs (<10 fmol/mg de cytosol). Nous avons identifié 2221 patientes avec cancer du sein dont ER ont été évalués par méthode biochimique (Ligand-Based Assay ou LBA) de 1976 à 1995 et suivies jusqu'en 2008. Des modèles à risques proportionnels de Cox ont été utilisés pour évaluer l'impact des différents niveaux de ER sur la survie au cancer du sein chez les patientes ayant reçu ou non une TA. Parmi les 2221 patientes incluses dans l'étude, 661 (29,8%) ont reçu une TA. Chez celles avec TA, une diminution significative de la mortalité spécifique au cancer du sein n'a été démontrée que pour les niveaux de ER ≥ 10 fmol/mg de cytosol. Ainsi, ceci ne supporte pas une TA pour les cancers du sein faiblement positif pour ER testés en LBA.

Abstract

The objective of this project was to evaluate the effect of antihormonal therapy (AT) on patients with weakly positive ER breast cancers (BC) (<10 fmol/mg of cytosol). We identified 2221 BC patients with ER tested by ligand-based assay (LBA) from 1976 to 1995, treated and followed until 2008. Cox proportional hazards models were used to assess the effect of ER levels on BC survival in patients who received AT. Of 2221 patients studied, 661 (29.8%) received AT. Of those who received AT, there was a significant risk reduction in breast cancer-specific mortality only for patients with ER levels ≥ 10 fmol/mg of cytosol. Therefore our results do not support treating with AT weakly positive ER BC patients identified by LBA.

Table des matières

Résumé	III
Abstract	V
Table des matières	VII
Liste des tableaux	XI
Liste des figures	XIII
Abréviations	XV
Avant-propos	XVII
Introduction	1
Chapitre 1 - État des connaissances	3
1.1 L'influence des hormones féminines dans le cancer du sein	5
1.2 Les estrogènes	5
1.3 Les récepteurs hormonaux	8
1.3.1 Les récepteurs d'estrogènes	10
1.3.2 Les récepteurs de progestérone	10
1.4 Tamoxifène	11
1.4.1 Découverte du tamoxifène	11
1.4.2 Mécanisme d'action du tamoxifène	11
1.4.3 Effets secondaires associés au tamoxifène	12
1.5 Les récepteurs d'estrogènes comme facteur prédictif en cancer du sein	13
1.6 Évaluation pathologique des récepteurs hormonaux	14
1.6.1 Évaluation quantitative par méthode biochimique	14
1.6.2 Évaluation qualitative par méthode immunohistochimique	15

1.6.3	Systèmes de pointage pour la mesure des récepteurs hormonaux en IHC	16
1.6.4	Seuils de positivité des récepteurs hormonaux	17
1.6.5	Classement des cancers du sein exprimant de faibles niveaux de récepteurs hormonaux	19
1.7	L'antihormonothérapie chez les patientes avec cancer du sein faiblement positif pour ER (4-9 fmol/mg de cytosol en LBA ou 1-9% de coloration en IHC)	20
1.8	Question et objectifs de recherche	23
1.8.1	Questions de recherche	23
1.8.2	Objectifs de recherche	24
Chapitre 2 - Article soumis pour publication : <i>Prognostic and predictive value of low Estrogen receptor expression in breast cancer</i>		25
	Résumé	27
	Abstract	32
	Keywords	33
2.1	Introduction	35
2.2	Methods	36
2.2.1	Study population	36
2.2.2	Data collection	36
2.2.3	Follow up	37
2.2.4	Statistical analysis	38
2.3	Results	39
2.4	Discussion	40
2.5	Conclusion	43
	List of abbreviations	44

Competing interest	45
Author's contribution	45
Tables	47
Table 1	47
Table 2	48
Table 3	48
Table 4	49
Figures	51
Figure 1	51
Figure 2	51
Figure 3	52
Conclusion	53
4.1 Conclusion	55
Annexe 1	59
Tableau A1	61
Légende tableau A1	66
Bibliographie	67

Liste des tableaux

Chapitre 1 :

- Tableau 1:** Effets secondaires des estrogènes sur les différents organes du corps humain
- Tableau 2 :** Relation entre différents sous-types histologiques de cancers du sein et l'expression de ER et PR
- Tableau 3 :** Risques associés à la prise de tamoxifène

Chapitre 2 :

- Table 1:** Patients characteristics according to their anti-hormonal treatment
- Table 2:** Breast cancer specific mortality up to 20 years according to ER status in patients with anti-hormonal treatment (n = 661)
- Table 3:** Breast cancer specific mortality up to 20 years according to ER status in patients without anti-hormonal treatment (n = 1560)
- Table 4:** Breast cancer specific mortality up to 20 years according to ER status and anti-hormonal treatment (n=2221).

Annexe 1:

- Tableau A1 :** Études analysant la mesure de ER en LBA et/ou en IHC en lien avec le traitement antihormonal en cancer du sein.

Liste des figures

Chapitre 1

- Figure 1:** Schémas illustrant la production d'estrogènes (estradiol) par les tissus adipeux et les ovaires.
- Figure 2 :** Stéroïdogénèse résultant en la formation d'estrogènes (estradiol).
- Figure 3:** Molécule de tamoxifène.
- Figure 4 :** Différents niveaux d'expression de ER en IHC rapportés en %.

Chapitre 2

- Figure 1 :** 20-year breast cancer-specific survival for patients treated with anti-hormonal therapy (n=661).
- Figure 2 :** 20-year breast cancer-specific survival for patients without anti-hormonal therapy (n=1560).
- Figure 3 :** 20-year breast cancer survival, all patients (n=2221).

Abréviations

TA: Thérapie antihormonale

AT: Antihormonal therapy

ER: Récepteurs d'estrogènes

PR: Récepteurs de progestérone

BC: Breast cancer

LBA: Ligand-binding assay

IHC: Immunohistochimie

ASCO: American Society of Clinical Oncology

CPA: College of American Pathologists

CMS: Centre des Maladies du Sein Deschêne-Fabia

DCCA: Dextrane coated charcoal assay

RAMQ: Régie de l'assurance maladie du Québec

ISQ: Institut statistique du Québec

Ref: Référence

95CI: 95% confidence interval

HR: Hazard ratio ou rapport de risques

EBCTCG: Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group

RR: Rate ratio ou rapport de taux

Avant Propos

C'est au cours de ma résidence en chirurgie générale que j'ai développé un intérêt pour la recherche, notamment la recherche en oncologie. Ce fut grâce à Dr Louise Provencher qui, de par sa passion contagieuse, m'a démontré l'importance de la recherche clinique. C'est donc avec le désir d'améliorer mes connaissances en recherche que j'ai effectué une maîtrise en épidémiologie clinique de l'Université Laval au cours de ma résidence en chirurgie générale et de ma formation surspécialisée en chirurgie oncologique.

Ce mémoire est constitué de 2 sections : la présentation de l'état des connaissances et l'article de recherche soumis pour publication. Ce projet a été présenté comme affiche à l'American Society of Clinical Oncology annual meeting en 2013 et a fait l'objet d'une présentation orale aux journées scientifiques du département de chirurgie de l'Université Laval.

Je tiens à remercier mes directeurs de maîtrise Dr Louise Provencher et Dr Caroline Diorio pour leur supervision et aide dans l'élaboration et la réalisation du projet de recherche ainsi que la rédaction de l'article et du mémoire. Je souligne aussi le soutien de Caty Blanchette qui a contribué grandement à l'analyse statistique des résultats.

Je remercie également mes parents, Céline Bouchard et Michel Fortier, pour leur encouragements et soutien tout au long de ce projet qui m'ont permis d'achever ce travail.

Introduction

Le cancer du sein est le cancer invasif le plus fréquent chez les femmes et représente la deuxième cause de mortalité par cancer chez celles-ci, la première étant le cancer du poumon. En général, 1 femme sur 8 sera diagnostiquée avec un cancer du sein au cours de sa vie. Au Canada seulement, on estime qu'en 2014, 24 400 femmes recevront un diagnostic de cancer du sein et 5000 vont en mourir [1]. Grâce à la recherche, le traitement s'est grandement perfectionné ayant pour effet d'améliorer considérablement la survie des patientes qui en sont atteintes. Une des percées les plus importantes fut la découverte des récepteurs d'estrogènes (ER) localisés dans le noyau de la cellule tumorale qui agissent en régulant sa croissance et sa division. Cette découverte a permis le développement d'une thérapie antihormonale pour bloquer ces récepteurs et a permis de diminuer de façon significative les récurrences et la mortalité. Depuis sa mise en marché dans les années 1970, le tamoxifène demeure un des principaux agents, avec les inhibiteurs de l'aromatase, dans le traitement antihormonal du cancer du sein [2]. Pour cette raison, l'évaluation des récepteurs hormonaux présents dans les cancers du sein est devenue un élément essentiel dans la décision thérapeutique et doit être présent dans les rapports de pathologie [3, 4]. Malgré les années de recherches cumulées sur ces récepteurs, il existe encore à ce jour des incertitudes, principalement en ce qui a trait à leur seuil de positivité pour justifier l'administration d'un traitement antihormonal d'une durée d'au moins 5 ans. Ce mémoire a été effectué afin d'explorer la valeur prédictive et pronostique d'une faible expression des ER pour tenter de déterminer le seuil de positivité auquel un traitement antihormonal serait bénéfique

Chapitre 1

État des connaissances

1.1 L'influence des hormones féminines dans le cancer du sein

Un des premières démonstrations de la dépendance hormonale du cancer du sein a été faite il y a plus de 100 ans par George Thomas Beatson. Celui-ci a rapporté 2 femmes ayant eu une rémission presque complète de leur cancer du sein inopérable après avoir subi une ovariectomie bilatérale [5]. Inspiré par ces résultats, Stanley Boyd publia les résultats cliniques de 54 patientes avec cancer du sein ayant subi une ovariectomie bilatérale. Il remarqua que près du tiers des patientes bénéficiaient initialement de l'ablation ovarienne. Cependant, celles-ci recidivaient ou progressaient après une période de 6-12 mois. Il fut le premier à établir le lien entre les résultats cliniques obtenus et le retrait d'une substance alors inconnue produite par les ovaires : les estrogènes [6, 7]. Il fallut attendre jusqu'au milieu des années 1960 pour que les récepteurs d'estrogènes présents dans les cellules de cancers du sein soient reconnus comme étant le lien entre la présence d'hormone (estrogènes) et la progression tumorale [8].

1.2 Les estrogènes

Les estrogènes sont des hormones féminines qui sont produites à partir du cholestérol et qui peuvent être libérées via deux systèmes différents. Chez la femme pré-ménopausée, les estrogènes sont libérés par les ovaires en réponse aux hormones produites par l'hypophyse (LH et FSH). Chez la femme ménopausée, les estrogènes ne sont plus produits par les ovaires mais plutôt via des précurseurs d'estrogènes (testostérone et androsténédione) produits par les surrénales et transformés dans les tissus adipeux en estrogènes par une enzyme nommée aromatasase (Figures 1 et 2) [2]. Les estrogènes jouent un rôle important dans la régulation de plusieurs systèmes différents en se liant aux récepteurs d'estrogènes. Ceux-ci vont avoir une influence directe dans la régulation de la masse adipeuse (quantité et localisation), dans l'homéostasie des lipides, de la masse musculaire de la densité osseuse (Tableau 1).

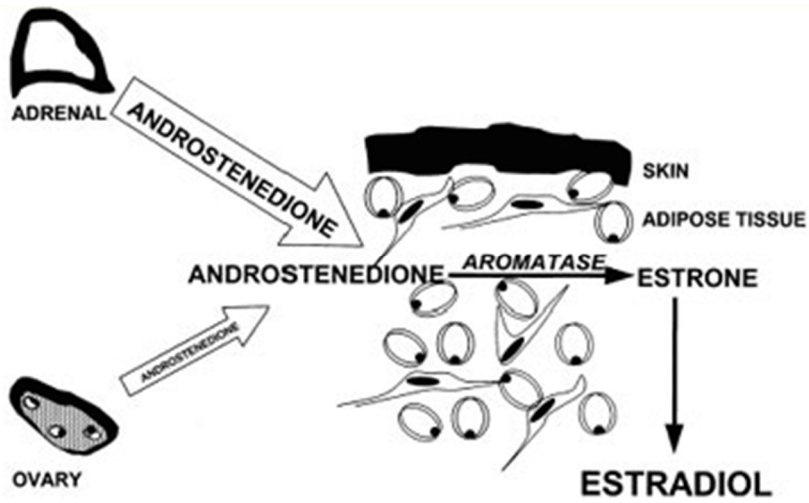


Figure 1 : Schémas illustrant la production d'estrogènes (estradiol) par les tissus adipeux et les ovaires [9].

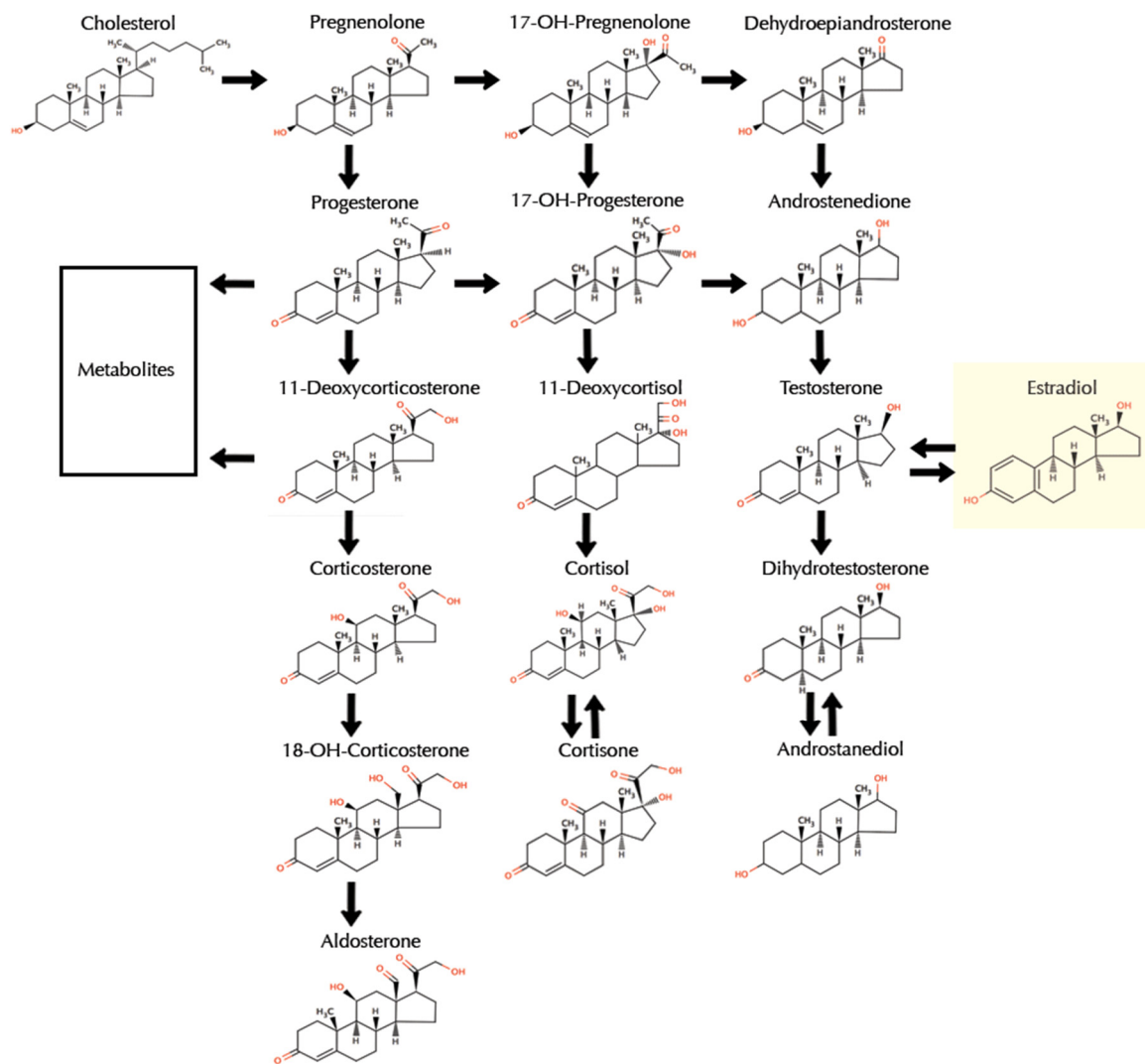


Figure 2: Stéroidogénèse résultant en la formation d'estrogènes (estradiol). Tiré de : Häggström M et al. [10]

Tableau 1: Effets secondaires des estrogènes sur les différents organes du corps humain

Sites d'action	Effets
Tissus conjonctifs	<ul style="list-style-type: none">• Remodelage et augmentation de la masse adipeuse• Homéostasie de la masse musculaire et de la densité osseuse
Lipides	<ul style="list-style-type: none">• Augmentation des HDL et triglycérides sériques• Diminution des LDL sériques
Cerveau	<ul style="list-style-type: none">• Maintien de la libido• Maintien de la température corporelle• Effet sur le comportement
Ovaires	<ul style="list-style-type: none">• Rôle dans le déclenchement de l'ovulation
Utérus	<ul style="list-style-type: none">• Croissance de l'endomètre / utérine pendant le cycle menstruel
Vagin	<ul style="list-style-type: none">• Augmentation de la lubrification vaginale• Épaississement des parois du vagin
Seins	<ul style="list-style-type: none">• Croissance de la glande mammaire durant la puberté et préparation à la production de lait
Système immunitaire	<ul style="list-style-type: none">• Effets anti-inflammatoires via action sur les cellules polymorphonucléaires et les globules blancs
Système cardiovasculaire	<ul style="list-style-type: none">• Effets protecteurs en diminuant la formation d'athérosclérose
Système gastro-intestinal	<ul style="list-style-type: none">• Diminution de la motilité intestinale• Augmentation de la quantité de cholestérol sécrété présent dans la bile
Balance liquidienne	<ul style="list-style-type: none">• Favorise la rétention hydro-sodée

1.3 Les récepteurs hormonaux

En cancer du sein, les récepteurs hormonaux comprennent les récepteurs d'estrogènes (ER) et les récepteurs de progestérone (PR). L'expression de ER et de PR en cancer du sein a été considérablement étudiée au cours des dernières années. Ces récepteurs sont présents dans près de 80% des cancers du sein contrairement à seulement 15-25% des cellules épithéliales mammaires normales [11]. Il a été démontré que les tumeurs de bas grade à composante

tubulaire, colloïde ou papillaire sont généralement positives pour les récepteurs hormonaux tandis que les tumeurs de haut grade ou à composante apocrine, médullaire ou métaplasique sont le plus souvent négatives pour ces récepteurs [11]. Le tableau 2 résume les résultats de Nadji et al. qui ont effectué une analyse de la prévalence des récepteurs hormonaux positifs pour différents sous-types de cancers du sein par méthode immunohistochimique [11]. On estime qu'environ 65% des cancers du sein sont positifs pour ER et PR (ER+/PR+) et que près de 13% ne sont positifs que pour ER (ER+/PR-). Seulement 2% des cancers du sein sont négatifs pour ER et positifs pour PR (ER-/PR+) [11]. Très peu d'études existent sur l'implication clinique de ces tumeurs ER-/PR+ et il est généralement accepté que celles-ci répondent moins bien à la thérapie antihormonale et sont associées à un moins bon pronostic par rapport aux tumeurs ER+/PR+ [12]. Ces tumeurs sont cependant traitées comme positives pour les récepteurs hormonaux puisque quelques études ont suggéré qu'une certaine proportion des patientes ER-/PR+ répondront au traitement antihormonal [13, 14]. Près de 20% des cancers du sein n'exprimeront pas de récepteurs hormonaux et seront donc négatifs pour ER et PR (ER-/PR-) [11].

Tableau 2 : Relation entre différents sous-types histologiques de cancers du sein et l'expression de ER et PR. Traduit et adapté de Nadji et al. [11].

Sous-types histologiques de cancer du sein	ER +	PR +
Canalaire infiltrant, non sous-typé (n=4 396)	3 255 (74%)	2 330 (53%)
Tubulaire (n = 237)	237 (100%)	225 (95%)
Colloïde (n = 184)	184 (100%)	133 (72%)
Papillaire (n = 44)	44 (100%)	35 (80%)
Apocrine (n = 40)	0 (0%)	0 (0%)
Médullaire (n = 96)	0 (0%)	0 (0%)
Métaplasique (n = 120)	0 (0%)	0 (0%)
Lobulaire infiltrant (n = 380)	380 (100%)	293 (77%)

1.3.1 Les récepteurs d'estrogènes

La protéine du récepteur d'estrogènes a été initialement décrite en 1967 par Jensen et al. [15]. Les récepteurs d'estrogènes se trouvent généralement dans le noyau cellulaire où ils se lient aux estrogènes [16]. Deux isoformes du même récepteur existent (α et β) chacun encodé par un gène différent (ESR1 et ESR2 respectivement). Lorsqu'ils se lient à l'estrogène, ceux-ci vont former un dimère ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$) et induire une cascade de signalisation entraînant la production de facteurs de transcription ayant pour effet ultime la croissance et prolifération tumorale [16-19]. C'est au courant des années 1970 grâce aux travaux de McGuire et al. que sa valeur pronostique en cancer du sein a été démontrée pour la première fois [13]. Depuis, plusieurs études ont corroboré les résultats de McGuire et confirmé que le statut ER représente l'un des facteurs pronostiques parmi les plus importants en cancer du sein [13, 14, 20, 21].

1.3.2 Les récepteurs de progestérone (PR)

Les récepteurs de progestérone sont considérés comme faisant parti de la cascade de signalement déclenchée par les récepteurs d'estrogènes et occupent donc un rôle similaire dans la croissance tumorale. Étant en aval dans la cascade de signalement, ils sont perçus comme étant un reflet de la fonction de ER. Jusqu'à présent, PR n'a pas été démontré comme un facteur prédictif de réponse au traitement antihormonal [22-24]. Cependant, plusieurs études ont démontré que PR représenterait un facteur pronostique indépendant, ayant une valeur moindre que celle de ER [20, 25-32]. C'est pour cette raison que les PR sont inclus dans le rapport de pathologie évaluant un cancer du sein.

1.4 Tamoxifène

1.4.1 Découverte du tamoxifène

Suite à la découverte des estrogènes et de leur impact sur la croissance tumorale via les récepteurs d'estrogènes, l'obtention d'une thérapie antihormonale pouvant bloquer ces récepteurs n'était qu'une suite logique dans le traitement du cancer du sein. C'est au courant des années 1960, à la recherche d'une pilule contraceptive de type anti-estrogène non stéroïdienne, que le tamoxifène a été créé [33-37]. Cette nouvelle molécule n'avait pas le potentiel contraceptif escompté, cependant on a noté qu'elle était efficace contre le cancer du sein. Le tamoxifène a donc été introduit en 1972 par Imperial Chemical Industries (maintenant AstraZeneca) comme thérapie antihormonale adjuvante en cancer du sein, mais ce n'est qu'au début des années 1980 que son potentiel clinique réel a été découvert. Au début, le tamoxifène était donné tant chez les patientes avec cancer du sein positif pour ER que chez celles avec cancer du sein ER négatifs, car on supposait que tous les cancers du sein étaient plus ou moins hormonaux sensibles. Par la suite, le tamoxifène n'a été offert qu'aux patientes avec ER positifs devenant ainsi la première thérapie ciblée [37].

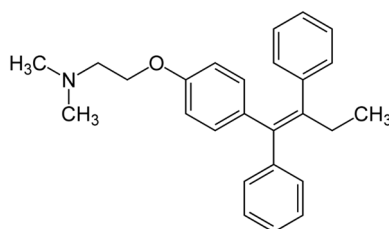


Figure 3: Molécule de tamoxifène [38]

1.4.2 Mécanisme d'action du tamoxifène

Le tamoxifène agit comme un modulateur sélectif des récepteurs d'estrogènes via son métabolite, le 4-hydroxytamoxifène. Il possède une action sélective selon l'emplacement tissulaire des récepteurs hormonaux auxquels il se lie. Dans le tissu mammaire, il agit comme un antagoniste des ER tandis que dans l'endomètre utérin, il est un agoniste des ER favorisant ainsi sa

prolifération. Le 4-hydroxytamoxifène est produit par le foie via les cytochromes p450 CYP2D6 et CYP3A4 métabolisant le tamoxifène. Ce métabolite est responsable des effets associés au tamoxifène et aurait une affinité pour ER 30-100 fois supérieur au tamoxifène. [39, 40].

1.4.3 Effets secondaires associés au tamoxifène

Cependant, même si le tamoxifène s'avère beaucoup moins toxique que la chimiothérapie, celui-ci n'est pas pour autant sans risque. Plus longtemps celui-ci est prescrit, plus les probabilités de subir ces risques sont élevées. Dans la littérature, il est rapporté que le tamoxifène peut être associé chez >10% des patientes à de l'hypertension artérielle, des épisodes dépressifs, des arthralgies et de l'œdème périphérique [41]. Il est estimé qu'environ 1-10% des patientes recevant du tamoxifène vont avoir au cours de leur traitement des évènements thromboemboliques, de l'ostéoporose (chez les femmes non-ménopausées), des bouffées de chaleur, de l'insomnie et des cataractes [42]. Il a aussi été démontré que le tamoxifène peut être associé à une hyperplasie de l'endomètre et augmenterait jusqu'à quatre fois le risque de cancer de l'endomètre, allant de 1/1000 à 4/1000 patientes recevant du tamoxifène [41-45]. Les principaux effets secondaires associés au tamoxifène sont résumés ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3 : Risques associés à la prise de tamoxifène

Risques associés avec prise de tamoxifène	%
Système cardiovasculaire	
Flushing	33%
Hypertension	11%
Œdème périphérique	11%
Maladie thromboembolique	5%
Système nerveux central	
Changements d'humeur	15%
Dépression	5-10%
Système endocrinien	
Bouffées de chaleur	40%
Rétention liquidienne	30%
Altération des menstruations	20%
Système neuromusculaire	
Faiblesse musculaire	18%
Arthrite	14%
Arthralgies	11%
Cataractes	10%
Système génital	
Cancer de l'endomètre	1-2%
Pertes vaginales	30%

1.5 Les récepteurs d'estrogènes comme facteur prédictif en cancer du sein

Avec la découverte du tamoxifène, les récepteurs d'estrogènes sont devenus un facteur prédictif de réponse à la thérapie antihormonale puisque les femmes avec cancer du sein ER positifs traitées avec tamoxifène auront une meilleure survie que celle ER négatifs [12, 46-50]. En effet, la plus récente méta-analyse publiée par le groupe des EBCTCG a démontré que les femmes

atteintes de cancer du sein avec ER positifs ayant reçu un traitement de tamoxifène pour une durée de 5 ans obtenaient une diminution du risque de mortalité spécifique au cancer du sein de près de 29% et une diminution du risque de cancer du sein controlatéral de près de 50% [12, 51]. Ces études ont donc confirmé l'importance d'un traitement adjuvant de tamoxifène d'une durée minimale de 5 ans chez les femmes avec récepteurs hormonaux positifs. Récemment, Davies et al. ont publié une étude démontrant diminution de la récurrence et de la mortalité lorsque le tamoxifène est donné aux femmes avec cancer du sein ER positifs pour une durée totale de 10 ans plutôt que 5 ans [52]. En résumé, de par leur importance pronostique et prédictive, l'évaluation pathologique d'un cancer du sein doit inclure une analyse des récepteurs hormonaux afin de pronostiquer les patientes et de leur justifier un traitement antihormonal.

1.6 Évaluation pathologique des récepteurs hormonaux

1.6.1 Évaluation quantitative par méthode biochimique

Initialement, l'évaluation pathologique des récepteurs hormonaux en cancer du sein s'est faite à l'aide de tests biochimiques (biochemical ligand-binding assays ou LBA). Cette méthode a été maintes fois validée dans la littérature pour l'évaluation des récepteurs hormonaux en cancer du sein et fut la principale méthode de détection utilisée pendant de nombreuses années [20, 53-59]. L'évaluation des ER par LBA implique la congélation immédiate du spécimen chirurgical contenant la tumeur suivi de sa pulvérisation dans l'azote liquide afin d'en extraire le cytosol cellulaire. Une fois le cytosol extrait, celui-ci est ensuite combiné avec des quantités croissantes d'estradiol radioactif pour permettre la mesure de la concentration des ER en fmol/mg de cytosol. Avec cette technique, il a été démontré que le tissu mammaire sain exprime ER entre 0-4 fmol/mg de cytosol [60, 61]. Des études effectuées en cancer du sein métastatique ont démontré que les patientes bénéficiaient d'une thérapie antihormonale à partir d'une concentration de ER ≥ 10 fmol/mg de cytosol [53]. Ainsi suite à ces résultats, un seuil ≥ 10 fmol/mg de cytosol fut généralement accepté comme seuil de positivité pour ER en cancer du sein [12]. Le principal avantage associé à l'évaluation des récepteurs hormonaux par LBA se trouve dans l'évaluation quantitative de ceux-ci. Cependant, les inconvénients de cette méthode sont sa complexité et la

grande quantité de tissu tumoral nécessaire pour générer des résultats. De plus, l'absence de données histologiques dans cette façon d'évaluer les récepteurs hormonaux constitue un autre désavantage puisqu'il est impossible d'établir si les récepteurs hormonaux détectés proviennent du tissu mammaire sain, d'une tumeur bénigne ou bien d'un cancer [53].

1.6.2 Évaluation qualitative par méthode immunohistochimique

C'est pour ces raisons que le dépistage des récepteurs hormonaux par LBA a été progressivement remplacé par les tests effectués par méthode immunohistochimique (IHC) au courant des années 1990. Les tests IHC utilisent des anticorps monoclonaux spécifiques aux récepteurs hormonaux visibles au microscope permettant de détecter leur présence et ainsi déterminer si une tumeur est positive ou négative pour ces récepteurs hormonaux. Les résultats des tests IHC sont généralement rapportés en % de noyaux liés avec l'anticorps tout en qualifiant l'intensité de la coloration. La méthode IHC a l'avantage d'être en plus une analyse qualitative de ER puisque l'évaluation de ER se fait au microscope et cible spécifiquement les cellules tumorales. De plus, le test est abordable en raison des faibles coûts associés aux anticorps utilisés. Cependant, son principal inconvénient est son manque de reproductibilité à l'intérieur d'un même laboratoire de pathologie de même qu'entre différents laboratoires ayant pour effet l'obtention de résultats discordants allant jusqu'à près de 20% des analyses effectuées en IHC [62]. Cette variabilité est introduite par la présence de variations techniques (temps de fixation tumoral, utilisation d'anticorps différents), de variations de lecture et enfin, de variations dans la façon de rapporter les résultats. En 2000, Rhodes et al. ont publié dans le Journal of Clinical Pathology une étude analysant la variabilité des résultats de ER en cancer du sein entre différents laboratoires de pathologie au Royaume Uni. Celle-ci s'est faite dans le contexte d'une analyse nationale d'évaluation de la qualité de l'acte (UK National External Quality Assessment Service). Cette étude a effectué une analyse centrale des ER en IHC pour 7016 cancers sein provenant 71 hôpitaux différents au Royaume Uni. En utilisant un seuil de positivité de 10% pour les récepteurs hormonaux, les auteurs ont observé un taux de variation de positivité de près de 20% en comparant les résultats obtenus dans les hôpitaux à leur analyse centrale. De plus, cette variation était encore plus importante lorsqu'il s'agissait de tumeurs avec une faible expression

de ER (ER=1-9%) [63]. Une étude canadienne a publié en 2011 des résultats similaires où près du tiers des patientes testées négatives pour ER entre 1997-2005 à Terre-Neuve étaient en fait positives lorsque retestées dans un centre de référence. Ces résultats furent attribués au manque de standardisation des tests IHC, aux contrôles de qualités déficients et au manque de formation du personnel interprétant les tests IHC [64].

1.6.3 Systèmes de pointage pour la mesure des récepteurs hormonaux en IHC

Dans la littérature, plusieurs différents systèmes de pointages ont été développés et validés afin de rapporter les résultats des mesures de récepteurs hormonaux en IHC. Les principaux systèmes de pointages en IHC utilisés jusqu'à présent sont: le score de proportion, le score de Allred, le score de quick et le score histo. Le score de proportion est le plus simple des scores de pointage. Le résultat de ce score est obtenu en calculant la proportion de cellules liées avec l'anticorps et est exprimé en pourcentage (0-100%) [65]. La figure 4 ci-dessous fournit un exemple pour différents scores de proportion en IHC. Ce score a été validé et démontré concordant aux résultats obtenus en LBA dans plusieurs études (concordance = 79-88%) [11, 66-70]. Le score de Allred est similaire au score de proportion excepté que l'intensité de la coloration des noyaux liés avec l'anticorps y est incluse. Ce score est obtenu par l'addition du score proportion (0 = 0% ; 1 = < 1% ; 2 = 1-9% ; 3 = 10 – 32% ; 4 = 33-65% ; 5 = >65%) à un score d'intensité de coloration cellulaire (0 = aucune coloration ; 1 = coloration faible ; 2 = coloration intermédiaire ; 3 = coloration forte). Ainsi, le score de Allred varie de 0-8, 0 représentant une absence de cellules liées avec l'anticorps et 8, >65% des cellules liées avec une coloration forte. Ce score a aussi été jugé concordant (concordance = 73-90%) avec la méthode par LBA dans l'évaluation des récepteurs hormonaux en IHC et fut pendant longtemps un des principaux scores utilisé en Amérique du Nord [59]. Le principal désavantage du score de Allred est la présence d'un biais d'observateur dans l'évaluation de l'intensité de coloration, celle-ci pouvant varier d'un pathologiste à l'autre. Le score de Quick et le score Histo sont des variantes du score de Allred et ont aussi été validés dans l'évaluation des récepteurs hormonaux en cancer du sein; cependant ceux-ci sont plus rarement utilisés dans les rapports de pathologie [20, 57, 67, 71-73]. En résumé, malgré la présence de nombreux systèmes de pointage différents dans l'évaluation des récepteurs

hormonaux en IHC, la détection des récepteurs hormonaux par IHC a été démontrée de façon consistante comparable à la méthode biochimique par LBA.

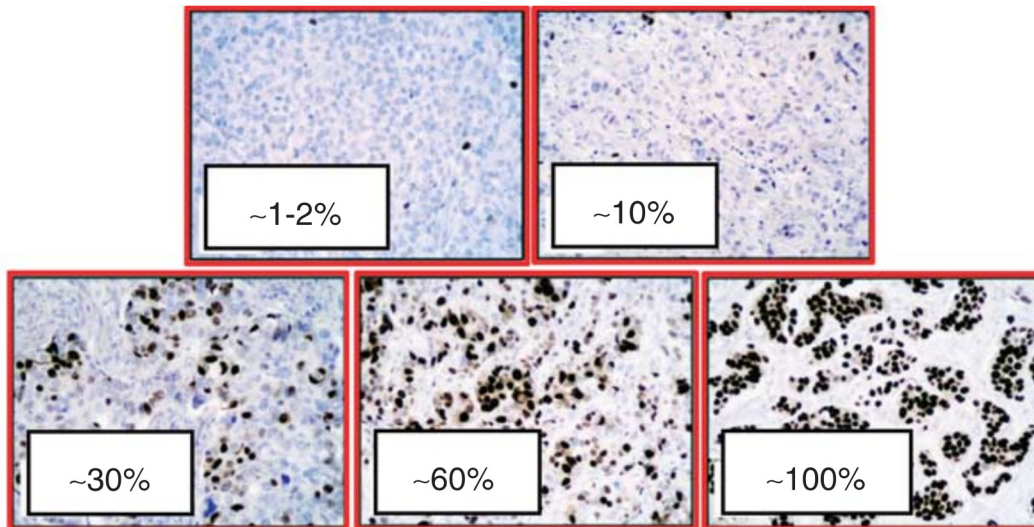


Figure 4 : Différents niveaux d'expression de ER en IHC rapportés en % [74].

1.6.4 Seuils de positivité des récepteurs hormonaux

Au cours des 30 dernières années, différents seuils de positivité pour les récepteurs hormonaux ont été utilisés pour justifier une thérapie antihormonale. La majorité des études ayant étudié la relation entre la quantité de récepteurs hormonaux et la réponse au traitement antihormonal ont été faites à partir de la méthode LBA [13, 46, 47, 62, 75]. Très peu d'études se sont penchées sur les seuils de positivité des récepteurs hormonaux en IHC. Les quelques études disponibles sont des études rétrospectives qui ont ré-analysé les spécimens tumoraux à l'aide de tests IHC et comparé les résultats obtenus à ceux en LBA, tout en tenant compte de la réponse au traitement antihormonal.

Comme mentionné précédemment, le seuil de positivité des récepteurs hormonaux en LBA fut initialement choisi en se basant sur des études faites chez des patientes métastatiques recevant du

tamoxifène. Ces études ont démontré un bénéfice clinique à traiter les patientes avec cancer du sein exprimant ≥ 10 fmol/mg de cytosol de ER [13]. Lorsque la détection des récepteurs hormonaux par IHC fut introduite au courant des années 1990, il y avait alors très peu d'études portant sur les seuils optimaux de positivité des récepteurs hormonaux en IHC et ce même s'il y avait de nombreuses études démontrant la validité de la méthode IHC par rapport à la méthode LBA. Effectivement, on dénombre plus d'une vingtaine d'études ayant comparé les résultats obtenus en LBA à ceux en IHC [20, 21, 26, 27, 29, 31, 32, 56, 57, 59, 71, 73, 74, 76-83]. Celles-ci ont démontré de façon consistante l'équivalence de la méthode par IHC par rapport à la méthode par LBA. Le tableau A1 résume les résultats de ces études en comparant les résultats obtenus en IHC et leur concordance avec les résultats obtenus par LBA (concordance variant de 69% à 90% selon les études) (Annexe 1, Tableau A1).

Une des premières études établissant cette équivalence fut publiée par McCarty et al. en 1986 [71]. Les auteurs ont comparé les valeurs de récepteurs hormonaux de 452 cancers du sein évalués à la fois en IHC et en LBA. Ceux-ci ont utilisé en IHC l'anticorps monoclonal H222 Sp gamma dirigé contre les récepteurs d'estrogènes. Avec un seuil de positivité de 75 en IHC (score histo) et de 20 fmol/mg de cytosol en LBA, les auteurs ont démontré une sensibilité et une spécificité de la méthode IHC par rapport à la méthode par LBA de 80-95% et de 74-94% respectivement. Une autre étude importante fut celle de Cheang et al. publiée en 2006 qui a comparé les résultats obtenus en LBA à ceux en IHC chez plus de 4000 patientes avec cancer du sein [81]. Les auteurs ont comparé les résultats obtenus en IHC (anticorps 1D5 et SP1) à ceux obtenus par la méthode LBA. Le seuil de positivité pour ER en LBA était ≥ 10 mg/fmol et en IHC, $\geq 1\%$. Au total, 4105 cancers du sein avec un suivi médian de 12.4 années ont été analysés pour leurs récepteurs hormonaux. L'anticorps SP1 a détecté ER comme étant positif dans 69.5% des cas et 1D5 dans 63,1%. Les deux anticorps utilisés en IHC se sont avérés être de bons indicateurs pronostique tant au niveau de la survie spécifique au cancer du sein que de la survie sans maladie lorsque comparés aux résultats en LBA avec une spécificité de 92% et une sensibilité de 78-86%. La principale critique de cette étude est que les analyses en IHC ont été faites à partir de matrice tissulaire plutôt que sur des sections tissulaires entières conduisant potentiellement à des erreurs de prélèvement et donc des résultats pouvant être faussés. Néanmoins, plusieurs autres études publiées dans les dernières décennies ont appuyé ces résultats

et démontré que l'utilisation de la méthode IHC est une technique valide dans l'évaluation des récepteurs hormonaux (Annexe 1, Tableau A1)

1.6.5 Classement des cancers du sein exprimant de faibles niveaux de récepteurs hormonaux

Ces études ont donc démontré la validité de la méthode IHC par rapport à la méthode LBA et ont entraîné dans la majorité des centres de référence la conversion de l'analyse pathologique des récepteurs en IHC. Cependant, en raison du manque d'études portant sur le seuil de positivité optimal des récepteurs hormonaux justifiant un traitement antihormonal, la plupart des institutions utilisant l'IHC ont décidé d'adopter par convention un seuil de positivité de 10% en lien avec le seuil de 10 mg/fmol de cytosol utilisé en LBA. Suite à cette adoption, quelques études ont mis en doute la valeur de ce seuil et se sont questionnées sur la pertinence d'un seuil abaissé.

Lorsque la méthode par LBA fut introduite, bien que 10 mg/fmol de cytosol avait été démontré comme un seuil cliniquement significatif pour prescrire un traitement antihormonal, il y avait déjà à l'époque certains auteurs suggérant que même les patientes avec de faibles niveaux de récepteurs d'estrogènes (3-10 fmol/mg de cytosol) pouvaient bénéficier d'un traitement antihormonal [84, 85].

Face au nombre croissant d'opinions contradictoires sur la signification clinique associée aux faibles seuils de récepteurs hormonaux en plus de la présence d'études démontrant une variation importante des résultats entre différents laboratoires, les principaux experts mondiaux se sont réunis dans le cadre de la conférence de St-Gallen en 2009 afin de discuter des seuils de positivité de ER et d'émettre des recommandations en fonction de l'évidence disponible [86]. Ces recommandations furent ensuite entérinées par l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) et le College of American Pathologists (CAP) en 2010 puis publiées dans le Journal of Clinical Oncology en 2010 [62]. Après avoir fait une analyse détaillée de la littérature, les experts ont recommandé qu'un seuil de 1% plutôt que de 10% soit utilisé pour déterminer la positivité d'une tumeur aux récepteurs hormonaux tout en indiquant l'obligation d'effectuer ces tests en présence

de contrôles [62]. Ainsi, depuis 2010 les tumeurs faiblement positives pour ER (1-9%) sont maintenant considérées positives et on peut donc offrir à ces patientes un traitement antihormonal d'au moins 5 ans. Cependant, très peu d'études supportent un tel traitement antihormonal pour les tumeurs faiblement positives pour ER en IHC.

1.7 L'antihormonothérapie chez les patientes avec cancer du sein faiblement positif pour ER (4-9 fmol/mg de cytosol en LBA ou 1-9% de coloration en IHC)

Plusieurs études ont décrit la relation entre les niveaux de récepteurs hormonaux et le bénéfice à recevoir une thérapie antihormonale [20, 29, 30, 62, 75, 87-89]. De façon générale, ces études ont démontré une association directe de la survie globale et de la survie sans maladie avec les niveaux de récepteurs hormonaux. Cependant, il n'y a que très peu d'études qui ont étudié les seuils cliniques optimaux de positivité de ER en LBA en relation avec les résultats en IHC.

Une des premières études portant sur l'impact clinique de l'antihormonothérapie en relation avec les niveaux de ER mesurés en LBA et IHC fut celle Barnes et al. publiée en 1996 [20]. Les auteurs ont comparé la mesure de ER en LBA et en IHC chez 170 patientes avec cancer du sein métastatique traitées avec tamoxifène. Le seuil de positivité en LBA utilisé était de > 20 fmol/mg cytosol. L'évaluation de ER en IHC a été faite à l'aide de l'anticorps 1D5 et avec différents systèmes de pointage (score de proportion, score d'intensité, score de Quick et score Histo). Les seuils de positivité pour les différentes mesures en IHC étaient comme suit : score de proportion $= \geq 1\%$, score d'intensité $= \geq 1$, score de Quick $= >5$ et score Histo >100 . Seuls les scores de proportion et d'intensité avaient un seuil de positivité suffisamment bas pour inclure les tumeurs faiblement positives pour ER (coloration $\geq 1\%$ et coloration \geq faible intensité). Avec cette étude, les auteurs ont déterminé que près de 74% des cancers étaient positifs pour ER en LBA par rapport à 81% en IHC avec le score de proportion et 81% avec le score d'intensité. En analysant la réponse clinique au tamoxifène selon les résultats obtenus en LBA et en IHC, les auteurs ont obtenu une meilleure réponse clinique au traitement antihormonal (complète/partielle versus stabilité/progression) pour ER évalué en IHC qu'en LBA ($X^2=28,32$ $p=0,0001$ versus $X^2=7,89$ $p=0,005$, respectivement). Plusieurs points méritent d'être mentionnés dans l'analyse de cette étude. Premièrement, les patientes incluses étaient toutes métastatiques traitées avec tamoxifène,

introduisant un biais de sélection en sélectionnant des patientes déjà connues comme répondantes au tamoxifène. De plus, les résultats obtenus par la méthode IHC ont été comparés à des résultats en LBA obtenus plus de 15 ans auparavant avec un seuil de positivité en LBA beaucoup plus élevé que les standards utilisés (20 fmol/mg vs 10 fmol/mg). Enfin, aucune analyse de sous-groupes n'a été faite afin de déterminer si les patientes faiblement positives pour ER avaient un bénéfice clinique à recevoir du tamoxifène. Pour toutes ces raisons, les résultats de cette étude ne permettent pas d'établir un seuil de positivité de ER fiable pour lequel les patientes ont un bénéfice clinique à recevoir du tamoxifène.

Des résultats similaires en IHC ont été démontrés par d'autres groupes [21, 31, 73]. Comme avec l'étude de Barnes et al., l'interprétation des résultats de ces études est limitée par des seuils de positivité pour ER en LBA variables, par la sélection de patientes positives en LBA recevant un traitement antihormonal, par l'utilisation de différents anticorps et par l'utilisation de scores/seuils en IHC différents.

Une des études les plus importantes effectuées pour comparer la méthode LBA à la méthode IHC et tenter de préciser le seuil de positivité de ER en IHC optimal fut celle de Harvey et al. publiée en 1999 dans *Journal of Clinical Oncology* [59]. Les auteurs ont comparé la mesure de ER en LBA à la mesure en IHC à l'aide de l'anticorps 6F11 chez 1982 patientes avec cancer du sein non métastatique et traitées de différentes façons (aucun traitement, traitement antihormonal, chimiothérapie seule, chimiothérapie et traitement antihormonal). Le seuil de positivité pour ER en LBA était de 3 fmol/mg de cytosol. Les résultats en IHC furent comptabilisés selon le score de Allred (score de proportion + le score d'intensité variant de 0 à 8). Les niveaux de ER furent analysés en fonction de la réponse clinique à la thérapie antihormonale. En comparant différents sous-groupes de patientes selon leur score de Allred, les auteurs ont démontré que celles avec un score ≥ 3 (au moins 1-10% de cellules tumorales faiblement colorées) avaient un meilleur pronostic que celles avec un score inférieur à 3 lorsque traitées avec tamoxifène. Près de 71% des cancers furent classés ER positifs par IHC avec un score de Allred ≥ 3 obtenant un niveau de corrélation entre la méthode IHC et LBA de 86%. De plus, une analyse de sous-groupes des patientes avec différents niveaux de récepteurs hormonaux, a démontré que les patientes avec au moins 1% de coloration tumorale en IHC avaient une meilleure survie sans maladie que celles avec moins de 1% de coloration lorsque traitées avec tamoxifène ($p=0,01$ en analyse

multivariée). Ceci a donc justifié la recommandation des auteurs pour un abaissement du seuil de positivité pour la thérapie antihormonale de 10% à 1% en IHC. Cependant, cette étude a reçu quelques critiques, notamment en lien avec le fait que les spécimens analysés en IHC provenaient de fragments de tumeurs pulvérisées et congelés qui avaient été utilisés préalablement pour la détection de ER en LBA. Ceci rend leurs résultats difficiles à comparer avec la méthode IHC actuelle où l'analyse microscopique se fait sur des spécimens tumoraux intacts fixés.

En 2011, Khoshnoud et al. ont analysé la survie de patientes post-ménopausées avec cancer du sein réséqué randomisées entre un traitement au tamoxifène versus placebo [83]. Le statut ER des patientes a été répété avec la méthode IHC afin de comparer celle-ci avec la méthode LBA. Les auteurs ont obtenu un haut niveau de concordance entre la méthode IHC et la méthode LBA (88%). Avec un suivi médian de 17 ans, ils ont démontré qu'il n'y avait aucun bénéfice clinique à traiter les patientes ER négatifs ($<0,05$ fmol/ μ g d'ADN ou $<10\%$ en IHC) et qu'il y avait une diminution de la survie sans récurrence chez les patientes ER positifs ($\geq 0,05$ fmol/ μ g d'ADN ou $\geq 10\%$ en IHC) ayant reçues du tamoxifène (HR: 0,53, $p < 0,001$). Cependant, cette étude incluait très peu de patientes faiblement positives pour ER (7 patientes incluses avec ER entre 1-9% en IHC) et l'échelle de quantification de ER en LBA était différente de la plupart des autres études semblables (fmol/ μ g d'ADN plutôt qu'en fmol/mg de cytosol).

En 2011, le groupe des « Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group » (EBCTCG) a publié une métaanalyse portant sur les études randomisées contrôlées de 5 ans de tamoxifène vs placebo chez des patientes avec cancer du sein non métastatique ayant des seuils de positivité pour ER en LBA variables [12]. Cette métaanalyse a inclus près de 20 études différentes avec un total de 21457 patientes. Grâce à une analyse multivariée des différents niveaux de récepteurs hormonaux exprimés par les tumeurs, les auteurs ont démontré un bénéfice cliniquement significatif à donner un traitement antihormonal aux patientes avec des seuils de ER ≥ 10 fmol/mg. Effectivement, ils ont observé que le tamoxifène donné pendant une période de 5 ans chez les patientes avec ER ≥ 10 fmol/mg diminuait significativement le risque de récurrence (RR = 0,61; $p < 0,00001$) et de mortalité (RR = 0,71; $p = 0,05$) associées au cancer et ce jusqu'à 10 ans suivant le début du traitement. Les auteurs n'ont pas démontré de bénéfice en terme de récurrence (RR = 0,94; $p = 0,12$) ou de mortalité associées au cancer du sein à traiter avec tamoxifène les patientes faiblement positives pour ER en LBA (1-9 fmol/mg).

1.8 Question et objectifs de recherche

1.8.1 Questions de recherche

En résumé, les récepteurs d'estrogènes sont un facteur pronostique et prédictif majeur en cancer du sein. Les femmes avec un cancer du sein ER positifs auront une meilleure survie que celles ER négatifs de par sa biologie tumorale et sa réponse favorable au traitement antihormonal. En présence d'un cancer du sein ER positifs, il est recommandé d'administrer un traitement antihormonal (tamoxifène) pour une durée de 5ans et depuis tout récemment, 10 ans. Cependant, le tamoxifène n'est pas sans risques d'où l'importance de classifier correctement les tumeurs afin de maximiser les bénéfices du tamoxifène par rapport à ses risques inhérents. La différenciation des cancers du sein entre ER positifs et négatifs s'est d'abord faite par la méthode LBA, puis à partir des années 1990, par IHC. Ces deux méthodes sont différentes, la méthode LBA étant surtout quantitative et la méthode IHC qualitative. De nombreuses études ont démontré que ces deux méthodes étaient équivalentes avec des résultats ER très concordants, >80% [59, 81, 83] (Annexe 1, Tableau A1). En 2010, après une révision de la littérature, l'ASCO/CPA ont abaissé le seuil de positivité pour l'évaluation de ER en cancer du sein de 10% à 1% [62]. Leur recommandation s'est basée sur 6 études, avec peu de patientes faiblement positives pour ER, de courts suivis et enfin des méthodes d'évaluation de ER différentes. Face à cela, plusieurs questions peuvent être soulevées :

- Quelle est la survie des femmes avec cancer du sein ayant de faibles taux de récepteurs hormonaux (4-9 fmol/mg de cytosol) par rapport à celles avec taux de récepteurs hormonaux ≥ 10 fmol/mg de cytosol en LBA?
- Est-ce que le traitement au tamoxifène est associé à un gain de survie chez femmes avec de faibles taux de récepteurs hormonaux en LBA?
- Est-ce que les bénéfices associés à la prise de tamoxifène sont supérieurs aux effets secondaires chez les femmes avec faibles taux de ER?
- Est-ce que le bénéfice de traiter une patiente avec cancer avec de faibles taux de récepteurs hormonaux est supérieur au risque de traiter un cancer négatif pour les récepteurs hormonaux?

1.8.2 Objectifs de recherche

L'objectif principal de ce travail fut d'analyser les patientes avec cancer du sein exprimant de faibles niveaux de ER. Puisque l'analyse en IHC n'a été introduite qu'à partir de 1994, le suivi et le nombre de patientes furent jugés insuffisants pour obtenir une analyse potentiellement significative. Nous avons donc décidé d'analyser les patientes avec cancers du sein avec ER déterminés LBA plutôt qu'en IHC pour la survie et la mortalité spécifique au cancer du sein en lien avec les différents niveaux d'expression de ER (fmol/mg de cytosol) afin de déterminer la valeur pronostique d'une faible expression de ER. Comme objectif secondaire, nous avons comparé la survie des patientes avec différents niveaux de ER traitées ou non avec tamoxifène afin de déterminer si une thérapie antihormonale chez les patientes avec cancer du sein faible en ER (4-9 fmol/mg de cytosol) est justifiée.

Chapitre 2

Article soumis pour publication :

*Prognostic and predictive value of low estrogen receptor
expression in breast cancer*

Résumé

Objectif:

La thérapie antihormonale (tamoxifène) est recommandée dans le traitement des cancers du sein avec récepteurs hormonaux positifs, cependant l'efficacité du tamoxifène pour les cancers exprimant de faibles niveaux de récepteurs d'estrogènes (ER) demeure incertaine. L'objectif de ce projet fut d'évaluer le bénéfice associé au traitement des cancers du sein faiblement positifs pour ER avec une thérapie antihormonale.

Méthodes:

Nous avons identifié 2221 patientes avec cancer du sein pour lesquelles les récepteurs hormonaux ont été évalués par la méthode biochimique (ligand-based assay ou LBA) de 1975 à 1995. Ces patientes ont été traitées et suivies dans un même centre hospitalier jusqu'en 2008. Des modèles à risques proportionnels de Cox ont été utilisés pour évaluer l'impact des différents niveaux de ER sur la survie au cancer du sein chez les patientes ayant reçu ou non du tamoxifène. Ces modèles ont été ajustés pour l'âge, l'indice de masse corporelle, la taille tumorale, le statut ganglionnaire, la chirurgie et la chimiothérapie.

Résultats:

Au total, 17% des patientes (383) exprimaient ER entre 0-3 fmol/mg de cytosol et 12% (266) entre 4-9 fmol/mg de cytosol. Les patientes avec des niveaux de ER de 0-3, 4-9, 10-19, 20-49, et ≥ 50 fmol/mg de cytosol avaient une survie à 20 ans au cancer du sein de 56%, 56%, 63%, 71% et 60% respectivement. Parmi les 2221 patientes incluses dans l'étude, 661 (29,8%) ont reçu une thérapie antihormonale. Chez ces patientes, les niveaux ER de 0-3, 4-9, 10-19, 20-49 et ≥ 50 fmol/mg de cytosol étaient associés avec un rapport de risques (HR) pour la mortalité au cancer du sein abaissé de : 1,00 (référence), 0,59 ($p=0,09$), 0,19 ($p<0,0001$), 0,26 ($p<0,0001$) et 0,31 ($p<0,0001$) respectivement. Une diminution significative du risque n'a été démontrée que pour les niveaux de ER ≥ 10 fmol/mg de cytosol.

Conclusion:

L'utilisation de tamoxifène chez les patientes avec cancer du sein faiblement positifs pour ER (<10 fmol/mg de cytosol) n'est pas associé à une diminution significative de la mortalité spécifique au cancer du sein en comparaison avec les cancers exprimant des niveaux supérieurs de ER (≥ 10 fmol/mg de cytosol). Ainsi, nos résultats ne supportent pas un traitement antihormonal adjuvant pour les patientes avec cancer du sein faiblement positif pour les récepteurs hormonaux testés par la méthode biochimique.

**PROGNOSTIC AND PREDICTIVE VALUE OF LOW ESTROGEN RECEPTOR
EXPRESSION IN BREAST CANCER.**

Antoine Bouchard-Fortier¹⁻²; Louise Provencher¹⁻³; Caty Blanchette² and Caroline Diorio¹⁻³

¹ Centre des maladies du sein Deschênes-Fabia, Hôpital du Saint-Sacrement, CHU de Québec, Quebec City, Qc, Canada

² Faculté de médecine, Centre de recherche sur le Cancer, Université Laval, Quebec City, Qc, Canada,

³Axe oncologie, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Quebec City, Qc, Canada

* To whom correspondence should be addressed:

Caroline Diorio
Axe oncologie
Centre de recherche du CHU de Québec
1050 Chemin Sainte-Foy
Quebec City, QC, Canada G1S 4L8

Tel: (418) 682-7390

Fax: (418) 682-7949

E-mail : cdiorio@uresp.ulaval.ca

Authors E-mail:

Antoine Bouchard-Fortier, E-mail: antoine.bouchard-fortier.1@ulaval.ca

Louise Provencher, E-mail: louise.provencher.cha@ssss.gouv.qc.ca

Caty Blanchette, E-mail: cblanche@crchudequebec.ulaval.ca

Caroline Diorio, E-mail: caroline.diorio@crchudequebec.ulaval.ca

Abstract

Purpose:

Anti-hormonal therapy (tamoxifen) is recommended for estrogen receptor (ER) positive breast cancers (BC), however its effect on negative/low receptor cancers is unclear. We sought to evaluate the effect of adjuvant tamoxifen on patients with weakly positive ER breast cancers.

Methods:

We identified 2221 BC patients with ER tested by ligand-based assay from 1976 to 1995, treated and followed until 2008. Cox proportional hazards models were used to assess the effect of ER levels on BC survival in patients who received tamoxifen, adjusted for age, body mass index, tumor size, nodal status, surgery and chemotherapy.

Results:

Overall, 17% of patients (383) were within 0-3 fmol/mg of cytosol and 12% (266) within 4-9 fmol/mg of cytosol. Patients with ER levels of 0-3, 4-9, 10-19, 20-49, and ≥ 50 fmol/mg of cytosol had a 20-year BC survival of 56%, 56%, 63%, 71% and 60% respectively. Of 2221 patients studied, 661 (29.8%) received hormonal therapy. Of these, ER levels of 0-3, 4-9, 10-19, 20-49 and ≥ 50 fmol/mg of cytosol were associated with a hazard ratio of lowered BC mortality (HR (p-value) of 1.00 (reference), 0.59 (0.09), 0.19 (<0.0001), 0.26 (<0.0001) and 0.31 (<0.0001) respectively; with significant risk reduction only for ER levels ≥ 10 fmol/mg of cytosol.

Conclusion:

Tamoxifen use in BC patients with weakly positive ER (<10 fmol/mg of cytosol) is not associated with significant lowered breast cancer-specific mortality when compared with higher levels of ER (≥ 10 fmol/mg of cytosol). Our results do not support treating with anti-hormonal therapy weakly positive ER BC patients identified by LBA.

Keywords

Breast cancer, Estrogen receptors, Estrogen receptor positivity, Tamoxifen, Cytosol

Introduction

The presence of estrogen receptors (ER) in breast cancer has been known for more than 30 years. Since their discovery, a number of studies have shown that ER status is the single most important predictive and prognostic biomarker in breast cancer [4, 57, 59, 76, 90-94]. It is recognized that ER-positive tumors should be treated with adjuvant tamoxifen or aromatase inhibitors, as there is an important survival benefit from anti-hormonal therapy. Women with ER-positive breast cancer treated with 5 years of adjuvant tamoxifen have a decreased risk of death from the disease of 29% and a decreased risk of contralateral breast cancer of 50% [12].

The assessment of ER in breast cancer was originally done with biochemical ligand-binding assays (LBA). This method has been validated repeatedly in the literature and was considered the gold standard for a long time [20, 53-59]. A threshold of ≥ 10 fmol/mg of cytosol was generally accepted for a tumor to be ER-positive [12]. Since the mid 1990's, LBAs were progressively replaced by immunohistochemistry (IHC) assays. IHC assays use highly specific monoclonal antibodies directed against ER to assess tumor hormonal status. Results are generally reported as the % of stained cells combined with the intensity of staining. As of recently, $\geq 10\%$ of stained cells for ER was considered the threshold for positivity. However, a number of studies reported up to 20% inter-laboratory variability in IHC results when testing ER status in same breast cancers [31, 63, 95]. Most of those inaccurate results occurred because of variation in pre-analytic variable, thresholds for positivity and interpretation criteria. In order to reduce the number of misclassified patients, the American Society of Clinical Oncology (ASCO) and the College of American Pathologists (CPA) published in 2010 guideline recommendations for IHC testing of ER in breast cancer. After a review of the evidence, the panel recommended that ER assays be considered positive if there are at least 1% of positive tumor nuclei in the sample on testing in the presence of controls [20, 53-59, 62]. Therefore, since 2010, patients with weakly positive ER tumors (1-9% of stained cells) have been offered anti-hormonal therapies as there are now considered ER-positive. However little is known about the real benefit of treating these weakly positive ER tumors with anti-hormonal therapies.

The primary endpoint of this study was to define breast cancer-specific survival and mortality according to ER levels (fmol/mg of cytosol) in order to assess the prognostic significance of ER. As a secondary endpoint, we compared survival of different levels of ER concentration expressed

by breast cancer treated or not with tamoxifen to determine if adjuvant anti-hormonal treatment of ER-poor breast cancer patients is justified.

Methods

Study Population

After obtaining ethics approval by the institutional research ethics committee, a retrospective study of women who attended our tertiary breast cancer center (Centre des Maladies du Sein Deschêne-Fabia) was performed. As the study had no direct patient involvement, patient consent for the study was not required. Patients included in this study were women diagnosed and treated for an infiltrative breast cancer between February 1976 and May 1995 and followed until 2008 at our center. We excluded women with non-invasive breast cancer, those who were metastatic at diagnosis, had a previous diagnosis of cancer of any site except non-melanoma skin cancer and cervical intraepithelial neoplasia or those for whom the ER status was unknown.

Data Collection

To identify and extract patient characteristics, we used the registry of our institution (CMS registry). This registry is one of the most important breast cancer registries in Canada with information on more than 10,000 women diagnosed with breast cancer, treated and followed at our institution since 1976 [96].

Characteristics of women extracted from the CMS registry included age at diagnosis (years) and body mass index (BMI; kg/m²). ER and progesterone receptors (PR) were measured by biochemistry (DCCA: dextrane coated charcoal assay) until the beginning of the 1990s, and thereafter by immunohistochemistry (IHC). The cut-off point for positivity was established at 10 fmol/mg cytosol proteins for DCCA. Patients with very low ER levels (1-3 fmol/mg of cytosol) were considered ER-negative based on previous studies that used 3 fmol/mg of cytosol as the threshold for negativity [12, 59, 97]. Indeed, in the present study, the survival of ER levels of 1-3 fmol/mg of cytosol was analysed and shown to be similar to patients with ER levels of 0 fmol/mg of cytosol. Thus, patients with ER levels of 0 and between 1-3 fmol/mg of cytosol were

combined to compose the ER-negative group, and patients with ER levels between 4-9 fmol/mg of cytosol, the weakly positive ER group. Patients with ER levels >9 fmol/mg of cytosol were considered ER-positive (10-19, 20-49, \geq 50 fmol/mg of cytosol)

Extent of disease at diagnosis, which is a measure of early detection, was assessed by tumor size, and regional or distant involvement. Tumor size (mm) corresponds to the largest diameter of the primary tumor considering the invasive component of the tumor only. Axillary lymph node involvement (node-negative or node-positive) and the absolute number of involved nodes, when applicable, were based on axillary dissection.

Initial locoregional treatments and neo-adjuvant or adjuvant systemic therapies were documented. The more invasive breast surgery was reported, and classified as mastectomy (including simple mastectomy, modified radical mastectomy or radical mastectomy) or breast-conserving surgery (including lumpectomy, partial or segmental mastectomy or quadrantectomy). Women classified as having had no breast surgery include those who have had an incisional biopsy as the most invasive breast procedure. Axillary surgery included mostly axillary dissection, as sentinel lymph node biopsy was not done before 1996.

Adjuvant endocrine therapy included almost exclusively tamoxifen administration. Neo-adjuvant and adjuvant chemotherapy regimens were classified as traditional polychemotherapy (cyclophosphamide [C], methotrexate [M], fluorouracil [F], and in rare instances, Melphalan [Alkeran[®]]), anthracycline containing regimens (adryamicin or epirubicin) or anthracycline containing regimens plus taxanes (docetaxel or paclitaxel).

Follow up

The CMS conducts active follow-up of all breast cancer patients in order to assess vital status. Vital status was updated by linkage of the CMS register with the database of beneficiaries of the Quebec universal health insurance system (“Régie de l’Assurance Maladie du Québec, RAMQ”), and to the Quebec mortality database held by the “*Institut de la statistique du Québec, ISQ*”. As compared to the Quebec mortality database, the RAMQ database also allows identification of a date at which other women were still known to be alive. The 2221 women included in the present study were followed for periods ranging between 4 days to 20 years

(median follow up 14.7 years) until the end of 2008, which was the termination date for the present analysis.

In addition, we extracted medical files of all ER-negative patients treated with tamoxifen along with 10 cases of ER-negative patients not treated with tamoxifen to detect if a bias was present in ER-negative patients that did or did not receive tamoxifen as an adjuvant therapy. Patients with negative or weakly positive ER that received tamoxifen were generally patients within a trial studying the use of tamoxifen. We verified patients' characteristics along with their ER and PR LBA results.

Statistical Analysis

The date of diagnosis was defined, in order of priority, as the date of the first histopathological confirmation of the malignancy, the date of the first positive cytology, or the date of the first clinical investigation (mainly mammography) showing malignancy.

We estimated survival of breast cancer patients from low ER expression (4-9 fmol/mg of cytosol), higher ER expression (10-19, 20-49, ≥ 50 fmol/mg of cytosol) and those who are ER-negative (0-3 fmol/mg of cytosol) using the Kaplan-Meier method. Those analyses were performed separately in patients that did not receive anti-hormonal therapy and in patients that received anti-hormonal therapy, as well as both therapies combined. Cox proportional hazards models were used to assess the effect of ER levels (0-3, 4-9, 10-19, 20-49, ≥ 50 fmol/mg of cytosol) on breast cancer mortality in patients who did or did not receive anti-hormonal therapy (tamoxifen). Breast cancer-specific mortality for patients studied was reported as hazard ratios with 95% confidence intervals. In addition, a multivariable Cox model was conducted on all patients according to their ER levels and the presence or absence of anti-hormonal treatment. These patients were compared to the reference group being patients with ER-negative breast cancer (0-3 fmol/mg of cytosol) not treated with anti-hormonal therapy. Patients included in the analyses had their follow up started upon breast cancer diagnosis and ended at death, end of follow up or at 20-years of follow up whichever came first. In the analyses, the event was breast cancer specific mortality. The Cox models were adjusted for age, BMI, tumor size, nodal status, surgery and chemotherapy. Further adjustment for PR status and/or end of follow up at 20-years did not materially change the results. Therefore, these models are not presented. All *p*-values

reported were 2-sided with 95% confidence intervals. Statistical tests were performed using SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Patient characteristics are presented in Table 1 according to their anti-hormonal treatment. Six hundred sixty one breast cancer patients received anti-hormonal therapy and 1560 patients did not receive any anti-hormonal therapy.

Patients treated with anti-hormonal therapy were older than patients that did not received anti-hormonal therapy (mean age of 59.4 years vs 53.5 years). Both groups had in order of frequency ≤ 20 mm, $>20-50$ mm and >50 mm tumors (50.4%, 39.2% and 7.0% respectively) and a high proportion of patients had positive axillary lymph node involvement (41.4%). Patients treated with anti-hormonal therapy had a frequency of negative ER (0-3 fmol/mg of cytosol) of 6.1% and weakly positive (4-9 fmol/mg of cytosol) of 7.0%. As expected, patients not treated with anti-hormonal therapy had a higher prevalence of negative and weakly positive ER with frequencies of 22.0% and 14.1% respectively. Patients treated with anti-hormonal therapy had higher levels of ER when compared with patients not treated with anti-hormonal therapy. ER values between 10-19, 20-49 and >50 fmol/mg of cytosol for patient treated with tamoxifen were 15.1%, 25.9% and 46% respectively and for patients that did not received tamoxifen were 12.6%, 17.1% and 34.2% respectively. Frequency of patients with PR values between 0-9 and ≥ 10 fmol/mg of cytosol were 31.0% and 63.7% respectively in patients treated with anti-hormonal treatment and 40.2% and 51.5% respectively in patients without anti-hormonal treatment. The majority of both groups of patients did not received chemotherapy in addition to anti-hormonal therapy (84.9% and 71.2%). After a median follow up of 14.7 years, breast cancer related deaths were 216/661 patients (32.7%) in the anti-hormonal therapy group and 556/1560 (35.6%) patients in the group without anti-hormonal therapy.

Among patients treated with anti-hormonal therapy (n=661), the 20-year breast cancer-specific survival demonstrated a separation between survival curves of ER levels corresponding to <10 and ≥ 10 fmol/mg of cytosol (Fig 1). The 20-year breast cancer-specific mortality in patients

treated with anti-hormonal therapy demonstrated a significant risk reduction for ER levels ≥ 10 fmol/mg of cytosol (Table 2). In the adjusted analysis, ER levels of 0-3, 4-9, 10-19, 20-49 and ≥ 50 fmol/mg of cytosol were associated with a hazard ratio of lowered breast cancer mortality of 1.00 (reference), 0.59 (p -value=0.09), 0.19 (p -value <0.0001), 0.26 (p -value <0.0001) and 0.31 (p -value <0.0001) respectively.

Among patients without anti-hormonal therapy ($n=1560$), the 20-year breast cancer-specific survival was similar with the exception of patients with ER levels between 20-49 fmol/mg that seemed to have improved survival (73%) (Fig 2). The 20-year breast cancer-specific mortality in patients without anti-hormonal therapy demonstrated a significant risk reduction only for ER levels ≥ 20 fmol/mg of cytosol (Table 3). In the adjusted analysis, ER levels of 0-3, 4-9, 10-19, 20-49 and ≥ 50 fmol/mg of cytosol were associated with a hazard ratio of lowered breast cancer mortality of 1.00 (reference), 0.91 (p -value=0.52), 0.86 (p -value=0.30), 0.47 (p -value <0.0001) and 0.78 (p -value=0.03) respectively.

Figure 3 shows that all patients ($n=2221$, regardless of therapy) with ER between 0-3, 4-9, 10-19, 20-49 and ≥ 50 fmol/mg of cytosol had a 20-year breast cancer survival of 56%, 56%, 63%, 71% and 60% respectively. The 20-year breast cancer-specific mortality in the adjusted analysis of all patients treated with or without anti-hormonal therapy revealed that significant protective effect for tumors with ER levels of ≥ 10 fmol/mg of cytosol when compared to ER-negative breast cancer patients (0-3 fmol/mg of cytosol) not treated with anti-hormonal therapy (p -value <0.0001) (Table 4).

Discussion

In this study, we demonstrated a relationship between ER expression and survival, confirming that ER is a strong prognostic factor in breast cancer patients. Multivariable analyses of breast cancer survival according to ER expression and anti-hormonal treatment showed an ER threshold of 10 fmol/mg of cytosol for which there was a statistically significant benefit associated with anti-hormonal therapy. Even though a trend seemed to be present, breast cancers with poor ER expression (4-9 fmol/mg of cytosol) did not benefit from anti-hormonal adjuvant therapy when

compared to breast cancers with negative ER (0-3 fmol/mg of cytosol) treated with anti-hormonal therapy. In addition, breast cancers with negative or weak ER (0-3 and 4-9 fmol/mg of cytosol) did not significantly benefit from anti-hormonal therapy when compared with breast cancers with negative ER (0-3 fmol/mg of cytosol) not treated with anti-hormonal therapy.

The benefit of anti-hormonal therapy in breast cancers expressing hormonal receptors has been recognized for more than 30 years. Throughout the years, assays to determine the presence or absence of hormonal receptors on cancer cells have progressively been refined and thresholds have been lowered. Recently, the ASCO/CPA recommended treating with anti-hormonal therapy breast cancers with very low levels of ER ($\geq 1\%$ on IHC) [31, 62, 63, 95]. There will always be a threshold of ER expression for which the clinical benefits of anti-hormonal therapy are outweighed by the misclassification of a tumor as being hormone sensitive rather than hormone resistant. Patients with an ER-positive breast cancer misclassified as ER-negative will be denied the benefit of anti-hormonal therapy whereas patients with an ER-negative breast cancer misclassified as ER-positive will be exposed to the risks of anti-hormonal therapy and be denied the benefits of other treatments.

A number of studies showed a direct linear relationship between ER levels and survival [20, 21, 26, 31, 56, 59, 73, 76, 83]. However, very few studies support the use of anti-hormonal treatment in breast cancer patients that are weakly positive for ER (3-9 fmol/mg of cytosol in LBA or 1-9% in IHC assays). The 6 studies used to establish the ASCO/CPA guidelines had different scoring systems, different threshold values, limited follow up and a low number of patients with ER-poor tumors [20, 21, 31, 59, 71, 73]. Recently, the EBCTCG trialists published a metaanalysis studying the relevance of breast cancer hormone receptors to the efficacy of adjuvant tamoxifen [12]. They included more than 20 randomised controlled trials (21 457 patients) that were done on the administration of 5 years of adjuvant tamoxifen to non-metastatic breast cancer patients with variable ER positivity thresholds tested using the biochemical assay. The authors showed that patients with ER <10 fmol/mg of cytosol did not benefit from anti-hormonal therapy.

Khoshnoud et al. in 2011 randomised post-menopausal breast cancer patients between adjuvant tamoxifen versus placebo. The ER status of patients were re-analysed with immunohistochemistry (IHC) in order to compare cytosol based assays with IHC for the

determination of the ER status and the prediction of response to adjuvant tamoxifen. The authors obtained a high concordance between cytosol assays and immunohistochemistry assays (88%). With a median follow-up of 17 years, they showed no clinical benefit to treat ER-negative patients (<0.05 fmol/ μ g of DNA or $<10\%$ on IHC) and a reduced recurrence-free survival with patients with positive ER treated with tamoxifen (HR: 0.53, $p < 0.001$). There was however very few patients with ER-poor tumors included in this study (7 patients with 1-9% ER positivity on IHC) and the ER scale used was different than most previous studies (fmol/ μ g of DNA rather than fmol/mg of cytosol proteins) [83].

Merglen et al. in 2009, found that patients with ER $<10\%$ on IHC assays treated with tamoxifen had a significantly increased risk of death from their disease when compared with similar patients treated without tamoxifen [98]. In addition, anti-hormonal treatments are not devoid of side effects. Tamoxifen and aromatase inhibitors have been shown to be associated with increased risk of thromboembolic events, uterine cancer, bone fractures and many other side effects that were shown to decrease quality of life (fatigue, hot sweats and depression, to name few) [12, 99]. As there is now new evidence showing survival benefits to treat patient with tamoxifen for 10 years rather than 5 years, the correct classification of breast cancer as ER-positive or negative is of crucial importance [52]. Based on our findings and on the absence of evidence supporting extended therapy for patients with ER-poor tumors, tamoxifen therapy duration should not be extended to 10 years in this subgroup of patients.

This is so far the study with the largest number of patients followed for the longest period of time in a single center. Moreover, our study has the largest number of weakly positive ER patients in the published literature. Among the 2221 patients included, none were lost to follow-up, causes of death were known for all patients and there were very few missing variables. As opposed to many previous reports, we were able to analyse subgroups of patient with many different levels of ER expression due to the large number of patients.

However, some limitations must be taken into account. ER values were analyzed using biochemical assays, which is a technique that is no longer used but has been shown to be equivalent to IHC. This was however necessary as follow up for breast cancer patients with ER analyzed with IHC is insufficient so far. In addition, misclassification of the ER status could have

occurred, as well as deaths that were not reported in the registry causing underestimation of a real treatment effect. It is also not possible to know the number of patients that did not completed five years of tamoxifen therapy due to complications, side effects or patient preference. This would represent a potential exposure bias resulting in an underestimate again of the treatment effect. Moreover, it must be noted that tumor grades and menopausal status were not included in the adjusted analyses as these variables were missing for several patients included in the study. In order to ascertain that these missing variables would not impact our results we performed additional sensitivity analyses including and excluding them and found an attenuation of our results meaning that our observations might have been overestimated.

Conclusion

Based on this study, we conclude that breast cancer patients with weak expression of ER on LBA (<10 fmol/mg of cytosol) do not seem to significantly benefit from adjuvant anti-hormonal therapy as oppose to those with ER levels ≥ 10 fmol/mg cytosol. Therefore caution should be applied when treating breast cancer patients with low levels of ER measured by LBA and treatment allocation should be decided on a case-by-case basis. It is still uncertain whether this is true for weakly positive breast cancers tested by IHC as our study was done using ER analysed with LBA. A similar study should be done with ER analysed by IHC to precise if our findings are valid for the actual patient population.

List of abbreviations

ER: Estrogen receptors

PR: Progesterone receptors

LBA: Ligand-binding assay

IHC: Immunohistochemistry

ASCO: American Society of Clinical Oncology

CPA: College of American Pathologists

CMS: Centre des Maladies du Sein Deschêne-Fabia

BMI: Body mass index

DCCA: Dextrane coated charcoal assay

RAMQ: Régie de l'assurance maladie du Québec

ISQ: Institut statistique du Québec

Ref: Reference

95CI: 95% confidence interval

HR: Hazard ratio

Competing interests

The authors indicated no potential conflicts of interest.

Author's contribution

ABF, LP and CD took part in the overall design of the study. ABF wrote the first draft of the manuscript. ABF, CD and CB conducted the statistical analyses. Both LP and CD critically revised the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Tables

Table 1: Patients Characteristics According to their Anti-Hormonal Treatment

Patients characteristics	Anti-Hormonal Treatment	No Anti-Hormonal Treatment	Total
N	661	1560	2221
Age, mean in years (SD)	59.4 (11.1)	53.5 (13.1)	55.3 (12.8)
BMI, mean in Kg/m ² (SD)	24.7 (4.4)	23.7 (4.0)	24.0 (4.2)
Missing, n (%)	11 (1.6)	47 (3.0)	58 (2.6)
Tumor Size, n (%)			
≤20 mm	301 (45.5)	819 (52.5)	1120 (50.4)
>20-50 mm	225 (43.1)	585 (37.5)	870 (39.2)
>50 mm	52 (7.8)	104 (6.7)	156 (7.0)
Missing	23 (3.5)	52 (3.3)	75 (3.4)
Axillary Nodes, n (%)			
0	248 (37.5)	870 (55.8)	1118 (50.3)
1-3	225 (34.0)	347 (22.2)	572 (25.8)
>3	128 (19.4)	219 (14.0)	347 (15.6)
Unknown	60 (9.1)	124 (8.0)	184 (8.3)
Estrogen Receptors, n (%)			
0-3 fmol/mg	40 (6.1)	343 (22.0)	383 (17.2)
4-9 fmol/mg	46 (7.0)	220 (14.1)	266 (12.0)
10-19 fmol/mg	100 (15.1)	196 (12.6)	296 (13.3)
20-49 fmol/mg	171 (25.9)	267 (17.1)	438 (19.7)
≥ 50 fmol/mg	304 (46.0)	534 (34.2)	838 (37.7)
Progesterone Receptors, n (%)			
0-9 fmol/mg	205 (31.0)	627 (40.2)	832 (37.5)
≥ 10 fmol/mg	421 (63.7)	804 (51.5)	1225 (55.2)
Unknown	35 (5.3)	129 (8.27)	164 (7.4)
Surgery, n (%)			
Total Mastectomy	282 (42.7)	788 (50.5)	1070 (48.2)
Lumpectomy/Radiotherapy	294 (44.5)	615 (39.4)	909 (41.0)
Other	85 (12.9)	157 (10.1)	242 (10.9)
Chemotherapy (%)			
Yes	100 (15.1)	450 (28.9)	550 (24.8)
No	561 (84.9)	1110 (71.2)	1671 (75.2)
Death			
Breast Cancer	216 (32.7)	556 (35.6)	772 (34.8)
Overall	336 (50.8)	830 (53.2)	1166 (52.5)

Abbreviation: BMI, body mass index

Table 2: Breast Cancer Specific Mortality up to 20 Years According to ER Status in Patients with Anti-Hormonal Treatment (n = 661)

ER Groups (fmol/mg)	Deaths/Total	Unadjusted Analysis		Adjusted Analysis	
		Hazard Ratio	95 CI (p-Value)	Hazard Ratio	95 CI (p-Value)
0-3	22/40	1	Ref (---)	1	Ref (---)
4-9	24/46	0.75	0.42-1.34 (0.33)	0.59	0.33-1.08 (0.09)
10-19	22/100	0.22	0.12-0.41 (<0.0001)	0.19	0.10-0.36 (<0.0001)
20-49	49/171	0.31	0.19-0.52 (<0.0001)	0.26	0.16-0.45 (<0.0001)
≥50	99/304	0.38	0.24-0.60 (<0.0001)	0.31	0.19-0.51 (<0.0001)

Abbreviations: ER, estrogen receptor; 95 CI, 95% confidence interval; Ref, reference

Ajusted for age, body mass index, tumour size, axillary lymph node involvement, surgery, radiation therapy and chemotherapy

Table 3: Breast Cancer Specific Mortality up to 20 Years According to ER Status in Patients without Anti-Hormonal Treatment (n = 1560)

ER Groups (fmol/mg)	Deaths/Total	Unadjusted Analysis		Adjusted Analysis	
		Hazard Ratio	95 CI (p-Value)	Hazard Ratio	95 CI (p-Value)
0-3	140/343	1	Ref (---)	1	Ref (---)
4-9	87/220	0.89	0.68-1.16 (0.39)	0.91	0.70-1.20 (0.52)
10-19	80/196	0.86	0.65-1.12 (0.25)	0.86	0.65-1.14 (0.30)
20-49	62/267	0.44	0.33-0.60 (<0.0001)	0.47	0.35-0.63 (<0.0001)
≥50	187/534	0.74	0.60-0.92 (0.01)	0.78	0.62-0.98 (0.03)

Abbreviations: ER, estrogen receptor; 95 CI, 95% confidence interval; Ref, reference

Ajusted for age, body mass index, tumour size, axillary lymph node involvement, surgery, radiation therapy and chemotherapy

Table 4: Breast Cancer Specific Mortality up to 20 Years According to ER Status and Anti-Hormonal Treatment (n=2221)

ER Groups (fmol/mg)	Unadjusted Analysis				Adjusted Analysis			
	Anti-Hormonal (-)		Anti-Hormonal (+)		Anti-Hormonal (-)		Anti-Hormonal (+)	
	HR	95 CI (p-Value)	HR	95 CI (p-Value)	HR	95 CI (p-Value)	HR	95 CI (p-Value)
0-3	1.00	Ref (---)	1.79	1.14-2.81 (0.01)	1.00	Ref (---)	1.55	0.97-2.46 (0.07)
4-9	0.89	0.68-1.16 (0.39)	1.37	0.89-2.11 (0.16)	0.92	0.71-1.21 (0.56)	1.03	0.66-1.60 (0.90)
10-19	0.85	0.65-1.12 (0.25)	0.41	0.26-0.65 (0.0001)	0.86	0.66-1.14 (0.30)	0.34	0.22-0.54 (<0.0001)
20-49	0.44	0.33-0.60 (<0.0001)	0.57	0.41-0.79 (0.0008)	0.47	0.35-0.63 (<0.0001)	0.46	0.33-0.65 (<0.0001)
≥50	0.74	0.60-0.92 (0.008)	0.69	0.53-0.89 (0.004)	0.77	0.61-0.96 (0.02)	0.55	0.42-0.73 (<0.0001)

Abbreviations: ER, estrogen receptor; HR, hazard ratio; 95 CI, 95% confidence interval; Ref, reference
 Adjusted for age, body mass index, tumour size, axillary lymph node involvement, surgery, radiation therapy and chemotherapy

Figures

Figure 1: 20-year breast cancer-specific survival for patients treated with anti-hormonal therapy (n=661)

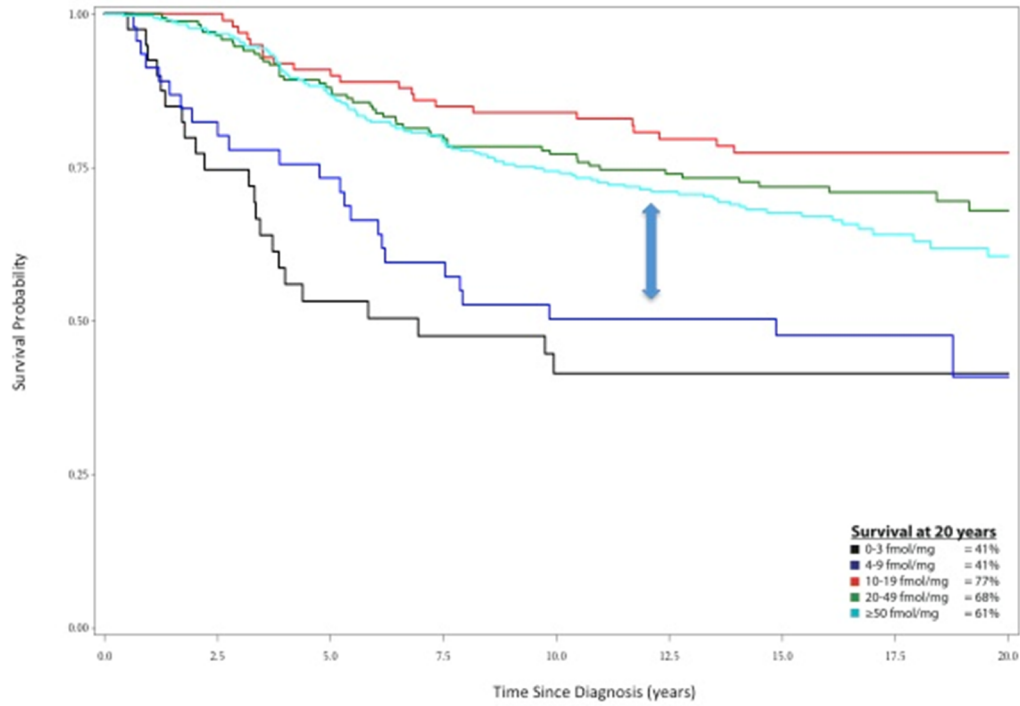


Figure 2: 20-year breast cancer-specific survival for patients without anti-hormonal therapy (n=1560)

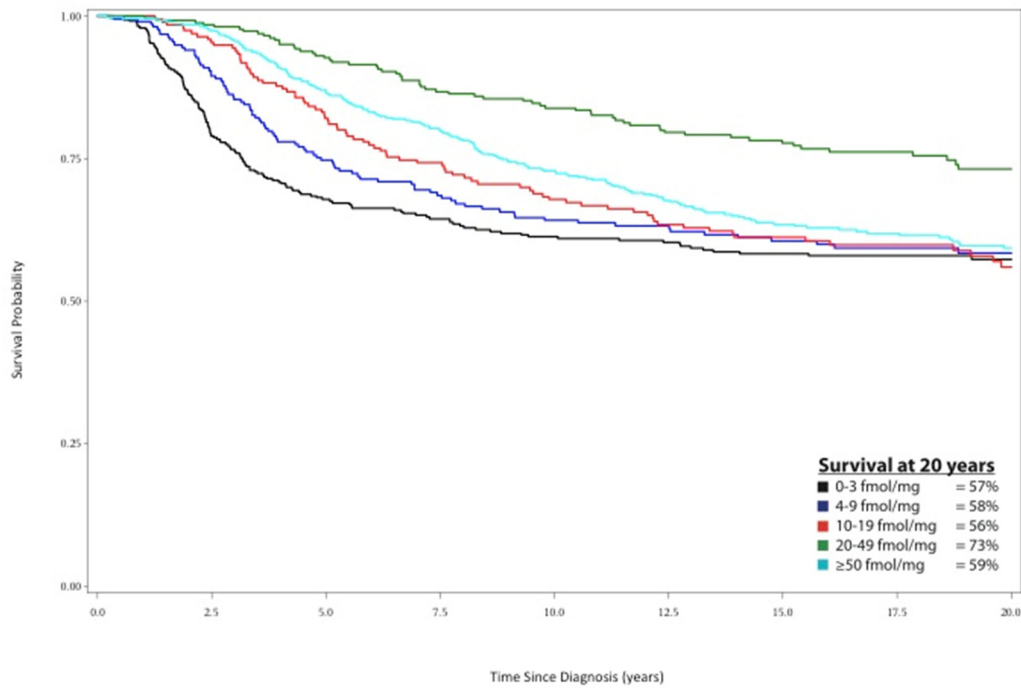
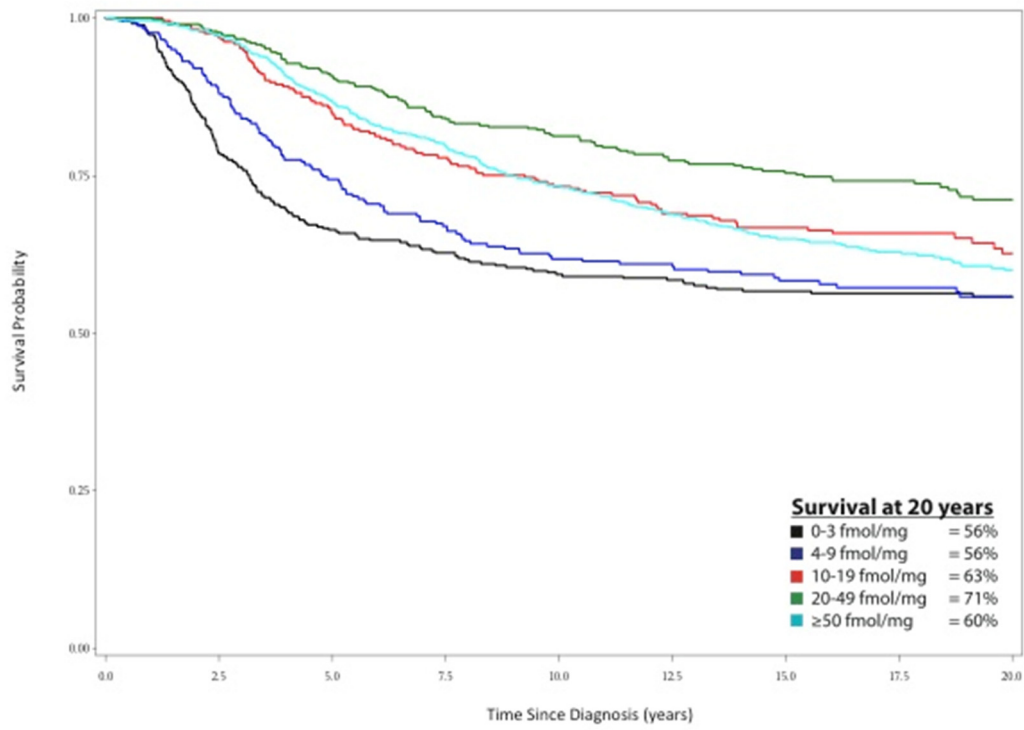


Figure 3: 20-year breast cancer survival, all patients (n=2221)



Conclusion

Conclusion

Le bénéfice d'une thérapie antihormonale pour les cancers du sein exprimant les récepteurs hormonaux est reconnu depuis plus de 30 ans [13, 22, 53]. Au cours des années, les tests de détection des récepteurs hormonaux se sont raffinés et les seuils de positivité ont progressivement été abaissés. Récemment, suite à une revue de la littérature, des experts des associations ASCO et CPA ont abaissé le seuil de positivité de ER testé en IHC de 10% à 1% de cellules colorées. Ainsi, il est donc maintenant recommandé d'administrer pour une durée d'au moins 5 ans un traitement adjuvant antihormonal aux patientes avec cancer du sein exprimant au moins 1% de ER, soit à partir de très faibles niveaux [62].

Avec ce projet, nous avons confirmé l'existence d'un lien étroit entre le niveau d'expression de ER et la survie au cancer du sein, confirmant ER comme étant un important facteur pronostique. Les analyses multivariées effectuées pour la survie au cancer du sein selon l'expression de ER et l'exposition au traitement antihormonal (tamoxifène) ont confirmé qu'un seuil de ER de 10 fmol/mg de cytosol est nécessaire pour obtenir un bénéfice significatif à prescrire du tamoxifène. Les patientes avec cancer du sein ayant une faible expression de ER (4-9 fmol/mg cytosol) semblent peu bénéficier du tamoxifène lorsque comparées à celles étant ER négatives (0-3 fmol /mg de cytosol) traitées avec tamoxifène. De plus, les patientes avec ER négatifs ou faiblement exprimés en LBA (0-3 et 4-9 fmol/mg de cytosol) n'ont pas bénéficié d'un traitement au tamoxifène lorsque comparées à celles avec celle ayant des ER négatifs (0-3 fmol/mg de cytosol) non traitées avec le tamoxifène.

L'établissement d'une valeur seuil pour ER justifiant un traitement antihormonal implique qu'il y aura toujours un seuil d'expression de ER pour lequel les bénéfices cliniques de l'antihormonothérapie seront compensés par la classification erronée d'une tumeur hormono-répondante comme étant hormono-résistante. Les patientes avec un cancer du sein de ER positif classifié ER négatif se verront refuser le bénéfice d'un traitement antihormonal tandis que celles avec un cancer du sein ER négatif classifié ER positif seront exposées aux risques du traitement antihormonal.

Plusieurs études ont démontré une relation directe entre les niveaux de ER et la survie [20, 21, 26, 56, 59, 73, 76, 83]. Cependant, seules quelques unes supportent l'utilisation d'un traitement antihormonal chez les patientes avec cancer du sein faiblement positif pour ER (3-9 fmol/mg de cytosol en LBA ou 1-9% en IHC). Les 6 études utilisées par l'ASCO/CPA pour établir leur recommandations ont utilisé des systèmes de pointage de ER différents, des seuils de positivité variables, avaient en général un court suivi clinique et incluaient peu de patientes avec des tumeurs faibles en ER [20, 21, 31, 59, 71]. Avec leur méta-analyse, incluant plus 20 études randomisées contrôlées différentes, le groupe des EBCTCG n'ont pas démontré de bénéfice clinique à administrer du tamoxifène aux patientes ayant une expression ER <10 fmol/mg de cytosol [12]. Ils ont observé que le tamoxifène donné pendant une période de 5 ans chez les patientes avec ER \geq 10 fmol/mg de cytosol diminuait significativement le risque de récurrence et de mortalité et ce, jusqu'à 10 ans suivant le début du traitement.

En 2009, l'équipe de Merglen et al. a observé que les patientes avec des niveaux de ER <10% IHC traitées avec tamoxifène avaient un risque de mortalité au cancer du sein accru lorsque comparées aux patientes traitées sans tamoxifène [98]. Par ailleurs, le tamoxifène n'est pas sans risque. Il est reconnu que le tamoxifène est associé à un risque accru d'évènements thromboemboliques, de cancer de l'endomètre, de fractures osseuses et à de nombreux effets secondaires pouvant affecter la qualité de vie des patientes (ex: fatigue, bouffées de chaleur et dépression) [41-45]. Puisqu'il y a présentement de nouveaux résultats cliniques supportant la prise de tamoxifène pendant une durée de 10 ans plutôt que de 5 ans, la bonne classification des tumeurs comme étant positives ou négatives pour ER est d'une grande importance [52]. Avec les résultats de notre projet et en raison du manque d'évidence supportant une thérapie antihormonale de 10 ans chez les patientes faibles en ER, la durée de la prise de tamoxifène ne devrait pas être allongée au-delà de 5 ans pour ce sous-groupe de patientes.

Ce projet de recherche est jusqu'à ce jour celui avec le plus grand nombre de patientes suivies pour la plus longue période de temps dans un même centre. De plus, il inclut le plus grand nombre de patientes avec cancer du sein faiblement positif pour ER lorsque comparé aux autres études déjà publiées. Parmi les 2221 patientes incluses, il n'y a eu aucune perte au suivi, le statut vital de même que les causes de décès étaient connues pour toutes les patientes et très peu de variables étaient manquantes. De plus, en raison du grand nombre de patientes incluses, nous

avons été en mesure de réaliser des analyses de sous-groupes de patientes avec des niveaux variables de ER.

Cependant, notre étude présente quelques limitations. L'expression de ER a été mesurée à l'aide d'une technique qui n'est plus utilisée (LBA) mais qui par contre a été démontrée comme équivalente à IHC. Ceci fut nécessaire, puisque les patientes avec ER mesurés en IHC avaient un suivi insuffisant pour cette étude. De plus, on doit considérer la possibilité que certaines patientes aient pu être classées de façon erronée (ER +/-) et que tous les décès n'ont pas été recensés dans la banque de donnée ayant pour effet d'entraîner une sous-estimation de l'effet réel du traitement. Il est aussi impossible de savoir quelle proportion de patientes n'ont pas complété 5 ans de tamoxifène en raison de complications, d'effets secondaires ou de préférences personnelles. Ceci aurait pour effet de créer une sous-estimation de l'effet réel du traitement. Par ailleurs, on doit aussi considérer le fait que les grades tumoraux et le statut de ménopause n'étaient pas connus pour plusieurs des patientes à l'étude. Dans le but de vérifier que ces variables manquantes n'avaient pas d'impact sur les résultats, nous avons effectué des analyses supplémentaires en les incluant avec une variable indicatrice ou en les excluant et avons observé que les résultats ne changeaient pas de façon significative et tendaient à être en fait atténués. Ceci signifie que nos résultats pourraient être surestimés et que le bénéfice à traiter ces patientes serait encore moindre que mesuré.

En somme, les résultats de notre étude nous permettent de conclure que les patientes avec cancer du sein faiblement positif pour ER (<10 fmol/mg de cytosol) en LBA ne semblent pas bénéficier significativement d'une thérapie antihormonale adjuvante à l'opposé des patientes exprimant ER à des niveaux ≥ 10 fmol/mg de cytosol. Bien que la mesure des récepteurs hormonaux en IHC ait été démontrée équivalente à la méthode LBA, ces deux techniques sont fondamentalement différentes. La méthode biochimique (LBA) procure une analyse quantitative des récepteurs hormonaux tandis que la méthode IHC est davantage qualitative et permet d'apprécier l'emplacement du marquage. Puisque cette étude a été faite à partir de résultats de ER mesurés en LBA, nous ne pouvons nous prononcer avec certitude quant au bénéfice clinique associé au traitement des patientes avec de faibles niveaux de récepteurs en IHC (1-9%). Ainsi, dans le contexte d'un manque d'évidence supportant le traitement des patientes avec de faibles niveaux de récepteurs hormonaux mesurés en IHC, l'attribution du traitement antihormonal en adjuvant

devrait être décidé sur la base du cas par cas pour ces patientes. Pour préciser cette question clinique, il serait donc intéressant de répéter cette analyse avec des patientes pour lesquelles les récepteurs hormonaux ont été analysés en IHC plutôt qu'en LBA.

Il est fort possible que dans un future rapproché, les cancers exprimant de faibles niveaux de récepteurs hormonaux soient soumis à des tests de détection génique aidant ainsi à obtenir le statut hormonal réel de ceux-ci et enfin à optimiser le traitement adjuvant de ces patientes [100].

Annexe 1

Tableau A1 : Études analysant la mesure de ER en LBA et/ou en IHC en lien avec le traitement antihormonal en cancer du sein

Tableau A1 : Études analysant la mesure de ER en LBA et/ou en IHC en lien avec le traitement antihormonal en cancer du sein.

Références	Groupes à étude (n)	Thérapie adjuvante	Analyse ER	Score utilisé (seuil +)	% ER (+)	Suivi médian	Concordance entre Analyses	Résultats	Commentaires
McCarty et al., 1985 [71]	A = CSP (62) B = CSP (72) C = CSM (23)	0 0 tamox	LBA (DCC) IHC (H222)	LBA (≥ 20 fmol/mg) Score histo (≥ 75)	NA NA	NA NA	Pop A: SP=89% et SS=95% Pop B: SP= 94% et SS=88% Pop C: SP =89% et SS=93%	Réponse clinique objective: SP=89%, SS=93%	Première étude décrivant corrélation entre LBA et IHC avec réponse clinique.
Kinsel et al., 1989 [57]	CSP opérés pré / post ménop (257)	Selon stade: Aucune = 75% Tamox= 0% Chimio seule = 25%	LBA (DCC) IHC (H222)	LBA (≥ 10 fmol/mg) Score histo (≥ 75)	48% 54%	6,2 ans	Concordance: 69% SS: 52% SP: 88%	Meilleur prédiction de survie avec IHC que LBA en analyse univariée.	Information limitée sur caractéristiques des patientes à l'étude. Patientes avec ER (+) ont meilleur pronostique que ER (-) lorsque IHC utilisé pour mesurer ER.
Rutqvist et al., 1989 [56]	CSP opérés post-ménop (750)	RCT: Tamox vs placebo	LBA (IF)	LBA ($\geq 0,05$ fmol/ μ g DNA)	79%	4,5 ans	NA	Bénéfice clinique significatif à traiter à partir de ER $\geq 0,05$ fmol/ μ g DNA (p<0,01).	Analyse faite en LBA utilisant fmol/ μ g DNA donc difficile à comparer aux résultats en fmol/mg de cytosol.
Reiner et al., 1990 [76]	CSP opérés pré/post ménop (426)	Selon stade et RH: Aucune = 44% Tamox = 31% Chimio-tamox = 6% Chimio seule = 19%	LBA (DCC) IHC (H222)	LBA (> 10 fmol/mg) Score de Allred (≥ 2)	NA 81%	3,0 ans	Concordance: 74%	Meilleure survie pour ER (+) en IHC (p<0,0001). Pas de différence de survie significative entre différents niveaux de ER.	Court suivi, pas de faibles positifs étudiés en LBA et peu de patientes ER (+) non traitées avec tamox.

Tableau A1 (suite)

Référence	Groupes à étude (n)	Thérapie adjuvante	Analyse ER	Score utilisé (seuil +)	% ER (+)	Suivi médian	Concordance entre Analyses	Résultats	Commentaires
Andersen et al., 1991 [77]	CSP opérés post-ménop (349)	RCT: Tamox vs placebo	LBA (DCC) IHC (1D5)	LBA (>10 fmol/mg) Score de proportion (≥1)	79% 75%	7,2 ans	Concordance: 79%	Meilleure survie pour ER (+) en IHC (p<0,001). Pas de différence de survie entre patientes ayant reçu tamox vs placebo.	Bonne concordance entre LBA et IHC, cependant résultats en désaccord quant au bénéfice du tamox avec autres études. Court suivi, faible puissance, cancers du sein stades avancés inclus.
DeMascarel et al., 1995 [78]	CSP opérés pré/post ménop (942)	Selon stade et RH: Aucune = 29% Chimio-tamox = 44% Chimio seule = 22%	LBA (DCC) IHC (1D5)	LBA (>10 fmol/mg) Score de proportion (≥1)	73% 75%	9,0 ans	Concordance: 87%	Patientes ER (+) ont meilleure survie que celles ER (-) cependant non significatif.	Groupes hétérogènes
Barnes et al., 1996 [20]	CSP métastatiques pré/post ménop (170)	Tamox	LBA (DCC) IHC (1D5)	LBA (> 20 fmol/mg) Score de proportion (≥1) Score de quick (>5) Score de Allred (≥ 2) Score histo (>100)	74% 81% 48% 69% 66%	16,6 ans	Concordance: 81%	IHC supérieur pour prédire réponse à tamox par rapport à LBA (p<0,001). ER est un facteur pronostique en analyses multivariées (p<0,0001)	Étude démontrant supériorité de méthode IHC par rapport à LBA pour prédire réponse. Utilisation de plusieurs méthodes pour analyser résultats en IHC. LBA n'inclus pas faibles positifs. Pas d'analyse de sous-groupes pour cancers ER faiblement positifs.

Tableau A1 (suite)

Références	Groupes à étude (n)	Thérapie adjuvante	Analyse ER	Score utilisé (seuil +)	% ER (+)	Suivi médian	Concordance entre Analyses	Résultats	Commentaires
Ferno et al., 1996 [79]	CSP stade II post-ménop (98)	RCT: Tamox 2 vs 5 ans	LBA (DCC) IHC (1D5)	LBA (>25 fmol/mg) Score de proportion (≥10)	63% 65%	3,2 ans	Concordance: 86%	Patientes ER (+) ont meilleure survie que celles ER (-) (p=0,003).	Aucune analyse de sous-groupes pour patientes avec ER (1-9%) (n=34). Patientes avec ER (1-9%) ont obtenu valeur médiane de ER en LBA = 3,4 fmol/mg.
Harvey et al., 1999 [59]	CSP pré/post ménop (1982)	Selon stade et RH: Aucune = 35% Tamox = 26% Chimio-tamox = 13% Chimio = 13%	LBA (DCC) IHC (6F11)	LBA (>3 fmol/mg) Score Allred (≥2)	79% 71%	5,4 ans	Concordance: 86%	IHC supérieur pour prédire DFS par rapport à LBA (HR: 0,474; p=0,0008) et équivalent pour prédire OS avec seuil de 2 (Allred)	Échantillons pour IHC préparés de façon non conventionnelle. Seules 67/1982 patientes avaient score de Allred =2.
Elledge et al., 2000 [21]	CSP métastatiques pré/post ménop (205)	Tamox	LBA (DCC) IHC (6F11)	LBA (>3 fmol/mg) Score de Allred (≥2)	100% 90%	9 ans	Concordance: 90%	Analyse de ER en IHC supérieure pour prédire OS. Seuil ≥2 significatif pour prédire réponse à thérapie antihormonale.	Corrélation directe de la réponse au tamox avec niveaux de ER en IHC. Absence de groupe sans tamox. Pas d'analyse de sous-groupes faite en LBA.
Thomson et al., 2002 [73]	CSP pré-ménop, stade II (332)	RCT: Ovariectomie vs chimio	LBA (DCC) IHC (6F11)	LBA (≥20 fmol/mg) Score de quick (≥2)	81% 68%	10,7 ans	Corrélation de Spearman: 0,55	Interaction significative entre IHC et traitement démontrant ovariectomie associée avec bénéfice de survie si score de quick ≥2 (p=0,001) et augmentation mortalité lorsque score de quick <2 (HR: 2,33; 95% CI: 1,3-4,2).	Les auteurs ont démontré que tumeurs ER faibles en IHC (ER <2 avec score de quick) ne bénéficient pas de traitement antihormonal (ovariectomie).

Tableau A1 (suite)

Références	Groupes à étude (n)	Thérapie adjuvante	Analyse ER	Score utilisé (seuil +)	% ER (+)	Suivi médian	Concordance entre Analyses	Résultats	Commentaires
Ogawa et al., 2004 [32]	CSP opérés pré/post ménop (152)	Selon stade et RH: Aucune = 10% Tamox = 54% Chimio-tamox = 36%	LBA (DCC) IHC (1D5)	LBA (≥ 13 fmol/mg) Score de Allred (≥ 3)	48% 48%	3,2 ans	Concordance: 73%	IHC meilleur prédicteur de survie (OS et DFS) que LBA avec seuil de ≥ 3 (Allred) ($p < 0,001$).	Étude analysant le seuil de positivité de IHC avec LBA. Majorité des patientes ont reçu tamox, court suivi, faibles seuils en LBA non étudiés.
Regan et al., 2006 [31]	CSP opérés pré/post ménop, gg (-) (1547)	RCT: Placébo vs chimio vs goserelin vs chimio-goserelin	LBA (DCC) IHC (1D5)	LBA (≥ 10 fmol/mg) Score de proportion (≥ 10)	73% 76%	9 ans	Concordance: 88%	Association significative entre DFS et statut ER en IHC.	Étude faite à partir des patientes des RCT International Breast Cancer Trial Group VIII et IX.
Yamashita et al., 2006 [29]	CSP opérés métastatiques au suivi	Traitement adjuvant selon stade et RH, traitement antihormonal au diagnostic de métastases	IHC (1D5)	Score de proportion (≥ 1) Score de proportion (≥ 10) Score de Allred (≥ 4)	76% 73% 75%	6,4 ans	NA	Interaction significative entre survie et tamox à partir d'un seuil = 10% en IHC ($p: 0,03$)	Peu de patientes incluses, seulement 2 patientes avec ER (1-9%), toutes métastatiques et traitées avec tamox.
Cheang et al., 2006 [81]	CSP opérés pré/post ménop (4150)	Selon stade et RH: Aucune = 41% Tamox = 33% Chimio-tamox = 8% Chimio = 18%	LBA (DCC) IHC (1D5) IHC (SP1)	LBA (≥ 10 fmol/mg) Score de proportion (≥ 1)	78% 63% 70%	12,4 ans	LBA et IHC (1D5): SS = 78%, SP = 92% LBA et IHC (SP1) SS = 86%, SP = 92%	Meilleure prédiction de survie avec IHC que LBA. SP1 a démontré une meilleure prédiction du pronostique que 1D5.	Analyses en IHC faites à partir de « tissus microarray ». Pas d'analyse de sous-groupes pour patientes avec faibles niveaux de ER.
Hori et al., 2007 [82]	CSP opérés pré/post ménop (486)	Tamox	LBA (DCC) IHC (1D5)	LBA (≥ 10 fmol/mg) Score de proportion (≥ 10)	91% 82%	12,8 ans	Concordance: 81%	Résultats IHC similaires à ceux en LBA. Différence significative pour DFS avec seuil de 10% en IHC ($p < 0,004$) et pour OS avec seuil de 33% ($p < 0,00045$).	Analyses de sous-groupes effectuées pour déterminer seuil optimal de positivité. Cependant, seulement 3 patientes faiblement positives pour ER (1-9%). Pas d'analyse effectuée pour patientes faiblement positives pour ER en LBA.

Tableau A1 (suite)

Références	Groupes à étude (n)	Thérapie adjuvante	Analyse ER	Score utilisé (seuil +)	% ER (+)	Suivi médian	Concordance entre Analyses	Résultats	Commentaires
Viale et al., 2007 [26]	CSP opérés post-ménop (3596)	RCT: Tamox vs letrozole	LBA (DCC) IHC (1D5)	Score de proportion (≥ 1) Score de proportion (≥ 10)	98% 97%	4 ans	NA	Interaction significative entre DFA et expression ER ($p < 0,0001$). Réponse partielle au traitement antihormonal lorsque ER = 1-9%.	Absence de patientes faibles en ER (1-9%) non traitées, court suivi, pas de comparaison des résultats en IHC avec ceux en LBA.
Khosnoud et al., 2011 [83]	CSP opérés post-ménop (683)	RCT: Tamox vs placebo	LBA (IF) IHC (SRi)	LBA (≥ 0.05 fmol/ μ gDNA) Score de proportion (≥ 10)	79% 79%	17 ans	Concordance: 88%	Amélioration significative du RFS associé à prise de tamox si ER(+) (IHC: HR=0,53, $P < 0,001$; LBA: HR=0,53, $P < 0,001$). Absence de bénéfice clinique si ER faible (1-9%) ou absents (0%).	Longue période de suivi, cependant seulement 7 patientes avec ER faible (1-9%) et mesure de ER en LBA différente des autres études.
EBCTCG, 2011 [12]	CSP opérés pré/post ménop	Métaanalyse de 21 RCT: Tamox vs placebo (21712)	LBA (DCC)	LBA (≥ 10 fmol/mg)	NA	NA	NA	Amélioration significative du DFS à partir de ER ≥ 10 fmol/mg chez patientes traitées avec tamox (RR:0,61 [SE=0,03; $2p < 0,00001$]). Chez patientes avec faibles niveaux de ER (4-9 fmol/mg), pas eu de bénéfice à donner tamox (RR 0,97 [SE=0,05])	Métaanalyse de plus de 21 RCT (21712 patientes incluses). Plus de 373 patientes avec faibles ER (4-9 fmol/mg) randomisées entre tamox et placebo, suivies sur plus de 10 ans.

Légende tableau A1



Comparaison de méthode LBA avec IHC



Comparaison de méthode LBA avec IHC et analyse des patientes exprimant faibles niveaux de ER

Abréviations

ER = récepteurs d'estrogènes

CSP = cancers du sein primaires

CSPM = cancers du sein métastatiques

Tamox = tamoxifène (thérapie antihormonale)

LBA = ligand binding assay (analyse biochimique des récepteurs hormonaux)

IHC = analyse des récepteurs hormonaux par immunohistochimie

SP = spécificité

SS = sensibilité

Ménop = ménopause

RCT = étude randomisée contrôlée

DCC = dextran coated charcoal assay (méthode utilisée pour analyse des récepteurs en biochimie)

IF = isoelectric focusing (méthode utilisée pour analyse des récepteurs en biochimie)

Chimio = chimiothérapie adjuvante

RH = récepteurs hormonaux

DFS = survie sans maladie (disease free survival)

OS = survie globale (overall survival)

HR = rapport de risques (hazard ratio)

CI = intervalle de confiance (confidence interval)

GG = ganglions

Bibliographie

Bibliographie

1. cancer.ca.
2. D'Abreo N, Hindenburg AA (2013) Sex hormone receptors in breast cancer. *Vitam Horm* 93:99–133. doi: 10.1016/B978-0-12-416673-8.00001-0
3. Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. (2007) American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 25:5287–5312. doi: 10.1200/JCO.2007.14.2364
4. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. (2000) Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124:966–978. doi: 10.1043/0003-9985(2000)124<0966:PFIBC>2.0.CO;2
5. Beatson GT (1983) Classics in oncology: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 33:108–121. doi: 10.3322/canjclin.33.2.108
6. Boyd S (1897) On Oophorectomy in the Treatment of Cancer. *Br Med J* 2:890–896.
7. Boyd S (1899) Remarks on Oöphorectomy in the Treatment of Cancer of the Breast. *Br Med J* 1:257–262.
8. Jensen EV, HI J (1960) Fate of steroid estrogens in target tissues. In: G P, EP V (eds) *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer*. New-York: Academic Press, pp 61–174
9. Medscape Pathways of estrogen production.
10. M H, D R Diagram of the pathways of human steroidogenesis.
11. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR (2005) Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol* 123:21–27.
12. Davies C, Godwin J, Gray R, et al. (2011) Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378:771–784. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60993-8
13. McGuire WL (1973) Estrogen receptors in human breast cancer. *J Clin Invest* 52:73–77. doi: 10.1172/JCI107175
14. Dowsett M, Allred C, Knox J, et al. (2008) Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination trial. *Journal of Clinical Oncology* 26:1059–1065. doi: 10.1200/JCO.2007.12.9437

15. Jensen EV, Desombre ER, Hurst DJ, et al. (1967) Estrogen-receptor interactions in target tissues. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 56:547–569.
16. Bjornstrom L, Sjoberg M (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19:833–842. doi: 10.1210/me.2004-0486
17. Li X, Huang J, Bambara RA, Hilf R (2004) Single-Chain Estrogen Receptors (ERs) Reveal that the ER α / β Heterodimer Emulates Functions of the ER α Dimer in Genomic Estrogen Signaling Pathways. *Mol Cell Biol* 24:7681–7694.
18. Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81:1535–1565.
19. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, et al. (2011) Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev* 32:597–622. doi: 10.1210/er.2010-0016
20. Barnes DM, Harris WH, Smith P, et al. (1996) Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients. *Br J Cancer* 74:1445–1451.
21. Elledge RM, Green S, Pugh R, et al. (2000) Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer* 89:111–117. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000320)89:2<111::AID-IJC2>3.0.CO;2-W
22. Osborne CK, McGuire WL (1979) Therapy for cancer of the breast. Current status of steroid hormone receptors. *West J Med* 130:401–407.
23. Hayes DF (2008) Markers of endocrine sensitivity. *Breast Cancer Res* 10 Suppl 4:S18. doi: 10.1186/bcr2178
24. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, et al. (1992) Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology* 10:1284–1291.
25. Bartlett JMS, Rea D, Rimm DL (2011) Quantification of hormone receptors to guide adjuvant therapy choice in early breast cancer: better methods required for improved utility. *Journal of Clinical Oncology* 29:3715–3716. doi: 10.1200/JCO.2011.37.3704
26. Viale G, Regan MM, Maiorano E, et al. (2007) Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *Journal of Clinical Oncology* 25:3846–3852. doi: 10.1200/JCO.2007.11.9453
27. Jalava P, Kuopio T, Huovinen R, et al. (2005) Immunohistochemical staining of estrogen and

progesterone receptors: aspects for evaluating positivity and defining the cutpoints. *Anticancer Res* 25:2535–2542.

28. Mackey JR (2011) Can quantifying hormone receptor levels guide the choice of adjuvant endocrine therapy for breast cancer? *Journal of Clinical Oncology* 29:1504–1506. doi: 10.1200/JCO.2010.34.3202
29. Yamashita H, Yando Y, Nishio M, et al. (2006) Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer* 13:74–83.
30. Stendahl M, Ryden L, Nordenskjold B, et al. (2006) High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 12:4614–4618. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0248
31. Regan MM, Viale G, Mastropasqua MG, et al. (2006) Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays. *J Natl Cancer Inst* 98:1571–1581. doi: 10.1093/jnci/djj415
32. Ogawa Y, Moriya T, Kato Y, et al. (2004) Immunohistochemical assessment for estrogen receptor and progesterone receptor status in breast cancer: analysis for a cut-off point as the predictor for endocrine therapy. *Breast Cancer* 11:267–275.
33. Harper MJ, Walpole AL (1967) A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J Reprod Fertil* 13:101–119.
34. Harper MJ, Walpole AL (1966) Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes. *Nature* 212:87.
35. Harper MJ, Walpole AL (1967) Mode of action of I.C.I. 46,474 in preventing implantation in rats. *J Endocrinol* 37:83–92.
36. Jordan C (2002) Historical perspective on hormonal therapy of advanced breast cancer. *Clin Ther* 24 Suppl A:A3–16.
37. Jordan VC (2003) Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2:205–213.
38. Tamoxifen. Wikipedia
39. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA (2004) Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther* 310:1062–1075.
40. Wang D-Y, Fulthorpe R, Liss SN, Edwards EA (2004) Identification of estrogen-responsive genes by complementary deoxyribonucleic acid microarray and characterization of a novel early estrogen-induced gene: EEIG1. *Mol Endocrinol* 18:402–411.

41. Reis SE, Costantino JP, Wickerham DL, et al. (2001) Cardiovascular effects of tamoxifen in women with and without heart disease: breast cancer prevention trial. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Breast Cancer Prevention Trial Investigators. *J Natl Cancer Inst* 93:16–21.
42. Gail MH, Costantino JP, Bryant J, et al. (1999) Weighing the risks and benefits of tamoxifen treatment for preventing breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:1829–1846.
43. Fisher B, Costantino J, Redmond C, et al. (1989) A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med* 320:479–484. doi: 10.1056/NEJM198902233200802
44. Day R, Ganz PA, Costantino JP, et al. (1999) Health-related quality of life and tamoxifen in breast cancer prevention: a report from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of Clinical Oncology* 17:2659–2669.
45. www.uptodate.com.
46. Fisher B, Redmond C, Brown A, et al. (1981) Treatment of primary breast cancer with chemotherapy and tamoxifen. *N Engl J Med* 305:1–6. doi: 10.1056/NEJM198107023050101
47. Fisher B, Wickerham DL, Brown A, Redmond CK (1983) Breast cancer estrogen and progesterone receptor values: their distribution, degree of concordance, and relation to number of positive axillary nodes. *Journal of Clinical Oncology* 1:349–358.
48. Colleoni M, Gelber S, Goldhirsch A, et al. (2006) Tamoxifen after adjuvant chemotherapy for premenopausal women with lymph node-positive breast cancer: International Breast Cancer Study Group Trial 13-93. *Journal of Clinical Oncology* 24:1332–1341. doi: 10.1200/JCO.2005.03.0783
49. Rastelli F, Crispino S (2008) Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori* 94:370–383.
50. Bartlett JMS, Brookes CL, Robson T, et al. (2011) Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *Journal of Clinical Oncology* 29:1531–1538. doi: 10.1200/JCO.2010.30.3677
51. EBCTCG (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365:1687–1717. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0
52. Davies C, Pan H, Godwin J, et al. (2013) Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 381:805–816. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61963-1
53. McGuire WL, La Garza De M, Chamness GC (1977) Evaluation of estrogen receptor assays

in human breast cancer tissue. *Cancer Res* 37:637–639.

54. Lippman ME, Allegra JC, Thompson EB, et al. (1978) The relation between estrogen receptors and response rate to cytotoxic chemotherapy in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 298:1223–1228. doi: 10.1056/NEJM197806012982203
55. Stewart J, King R, Hayward J, Rubens R (1982) Estrogen and progesterone receptors: correlation of response rates, site and timing of receptor analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2:243–250.
56. Rutqvist LE, Cedermark B, Glas U, et al. (1987) The Stockholm trial on adjuvant tamoxifen in early breast cancer. Correlation between estrogen receptor level and treatment effect. *Breast Cancer Res Treat* 10:255–266.
57. Kinsel LB, Szabo E, Greene GL, et al. (1989) Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer Res* 49:1052–1056.
58. Blankenstein MA (1990) Comparison of ligand binding assay and enzyme immunoassay of oestrogen receptor in human breast cancer cytosols. Experience of the E.O.R.T.C. Receptor Group. *Breast Cancer Res Treat* 17:91–98.
59. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999) Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 17:1474–1481.
60. Fabris G, Marchetti E, Marzola A, et al. (1987) Pathophysiology of estrogen receptors in mammary tissue by monoclonal antibodies. *J Steroid Biochem* 27:171–176.
61. Ricketts D, Turnbull L, Ryall G, et al. (1991) Estrogen and progesterone receptors in the normal female breast. *Cancer Res* 51:1817–1822.
62. Hammond MEH, Hayes DF, Wolff AC, et al. (2010) American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract* 6:195–197. doi: 10.1200/JOP.777003
63. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, et al. (2000) Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 53:125–130.
64. Mathews M, Newbury J, Housser EM (2011) Shaping policy: the Canadian Cancer Society and the Hormone Receptor Testing Inquiry. *Curr Oncol* 18:174–179.
65. Arihiro K, Umemura S, Kurosumi M, et al. (2007) Comparison of evaluations for hormone receptors in breast carcinoma using two manual and three automated immunohistochemical assays. *Am J Clin Pathol* 127:356–365. doi: 10.1309/4D1A04NCDK96WFY7

66. Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE (2000) Assessment of Tissue Estrogen and Progesterone Receptor Levels: A Survey of Current Practice, Techniques, and Quantitation Methods. *Breast J* 6:189–196.
67. Ferrero-Pous M, Trassard M, Le Doussal V, et al. (2001) Comparison of enzyme immunoassay and immunohistochemical measurements of estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9:267–275.
68. Umemura S, Itoh H, Ohta M, et al. (2003) Immunohistochemical evaluation of hormone receptor for routine practice of breast cancer: highly sensitive procedures significantly contribute to the correlation with biochemical assays. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 11:62–72.
69. Kaplan PA, Frazier SR, Loy TS, et al. (2005) 1D5 and 6F11: An immunohistochemical comparison of two monoclonal antibodies for the evaluation of estrogen receptor status in primary breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 123:276–280.
70. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al. (2005) Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 16:1569–1583. doi: 10.1093/annonc/mdi326
71. McCarty KSJ, Miller LS, Cox EB, et al. (1985) Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 109:716–721.
72. Lee H, Douglas-Jones AG, Morgan JM, Jasani B (2002) The effect of fixation and processing on the sensitivity of oestrogen receptor assay by immunohistochemistry in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 55:236–238.
73. Thomson CS, Twelves CJ, Mallon EA, Leake RE (2002) Adjuvant ovarian ablation vs CMF chemotherapy in premenopausal breast cancer patients: trial update and impact of immunohistochemical assessment of ER status. *Breast* 11:419–429.
74. Alberts SR, Ingle JN, Roche PR, et al. (1996) Comparison of estrogen receptor determinations by a biochemical ligand-binding assay and immunohistochemical staining with monoclonal antibody ER1D5 in females with lymph node positive breast carcinoma entered on two prospective clinical trials. *Cancer* 78:764–772. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960815)78:4<764::AID-CNCR12>3.0.CO;2-T
75. Dowsett M, Houghton J, Iden C, et al. (2006) Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol* 17:818–826. doi: 10.1093/annonc/mdl016
76. Reiner A, Neumeister B, Spona J, et al. (1990) Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res* 50:7057–7061.
77. Andersen J, Thorpe SM, Rose C, et al. (1991) Estrogen receptor in primary breast cancer

estimated in paraffin-embedded tissue. A study of its usefulness compared to dextran-coated charcoal assay. *Acta Oncol* 30:685–690.

78. de Mascarel I, I S, G M, et al. (1995) Immunohistochemical Analysis of Estrogen Receptors in 938 Breast Carcinomas. *Appl Immunohistochem* 3:222–231.
79. Ferno M, Andersson C, Fallenius G, Idvall I (1996) Oestrogen receptor analysis of paraffin sections and cytosol samples of primary breast cancer in relation to outcome after adjuvant tamoxifen treatment. The South Sweden Breast Cancer Group. *Acta Oncol* 35:17–22.
80. Grabau DA, Thorpe SM, Knoop A, et al. (2000) Immunohistochemical assessment of oestrogen and progesterone receptors: correlations with the DCC method and clinical outcome in primary breast cancer patients. *Breast* 9:208–217. doi: 10.1054/brst.2000.0171
81. Cheang MCU, Treaba DO, Speers CH, et al. (2006) Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody SP1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. *Journal of Clinical Oncology* 24:5637–5644. doi: 10.1200/JCO.2005.05.4155
82. Horii R, Akiyama F, Ito Y, Iwase T (2007) Assessment of hormone receptor status in breast cancer. *Pathol Int* 57:784–790. doi: 10.1111/j.1440-1827.2007.02174.x
83. Khoshnoud MR, Lofdahl B, Fohlin H, et al. (2011) Immunohistochemistry compared to cytosol assays for determination of estrogen receptor and prediction of the long-term effect of adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 126:421–430. doi: 10.1007/s10549-010-1202-7
84. Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA3, McGuire WL (1980) The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 46:2884–2888.
85. Knight WA3, Osborne CK, McGuire WL (1980) Hormone receptors in primary and advanced breast cancer. *Clin Endocrinol Metab* 9:361–368.
86. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. (2009) Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 20:1319–1329. doi: 10.1093/annonc/mdp322
87. Cowen PN, Teasdale J, Jackson P, Reid BJ (1990) Oestrogen receptor in breast cancer: prognostic studies using a new immunohistochemical assay. *Histopathology* 17:319–325.
88. Esteban JM, Ahn C, Battifora H, Felder B (1994) Quantitative immunohistochemical assay for hormonal receptors: technical aspects and biological significance. *J Cell Biochem Suppl* 19:138–145.
89. Lockwood CA, Ricciardelli C, Raymond WA, et al. (1999) A simple index using video image analysis to predict disease outcome in primary breast cancer. *Int J Cancer* 84:203–208. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19990621)84:3<203::AID-IJC1>3.0.CO;2-U

90. Alexieva-Figusch J, Van Putten WL, Blankenstein MA, et al. (1988) The prognostic value and relationships of patient characteristics, estrogen and progesterin receptors, and site of relapse in primary breast cancer. *Cancer* 61:758–768.
91. McGuire WL (1991) Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst* 83:154–155.
92. (1996) Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology* 14:2843–2877.
93. Molino A, Micciolo R, Turazza M, et al. (1997) Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancers: a comparison of immunohistochemical and biochemical methods. *Breast Cancer Res Treat* 45:241–249.
94. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM (1998) Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11:155–168.
95. Badve SS, Baehner FL, Gray RP, et al. (2008) Estrogen- and progesterone-receptor status in ECOG 2197: comparison of immunohistochemistry by local and central laboratories and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction by central laboratory. *Journal of Clinical Oncology* 26:2473–2481. doi: 10.1200/JCO.2007.13.6424
96. Berube S, Provencher L, Robert J, et al. (2007) Quantitative exploration of possible reasons for the recent improvement in breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat* 106:419–431. doi: 10.1007/s10549-007-9503-1
97. Clark GM, Osborne CK, McGuire WL (1984) Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2:1102–1109.
98. Merglen A, Verkooijen HM, Fioretta G, et al. (2009) Hormonal therapy for oestrogen receptor-negative breast cancer is associated with higher disease-specific mortality. *Ann Oncol* 20:857–861. doi: 10.1093/annonc/mdn688
99. Visvanathan K, Chlebowski RT, Hurley P, et al. (2009) American society of clinical oncology clinical practice guideline update on the use of pharmacologic interventions including tamoxifen, raloxifene, and aromatase inhibition for breast cancer risk reduction. *Journal of Clinical Oncology* 27:3235–3258. doi: 10.1200/JCO.2008.20.5179
100. Wilson TR, Xiao Y, Spoerke JM, et al. (2014) Development of a robust RNA-based classifier to accurately determine ER, PR, and HER2 status in breast cancer clinical samples. *Breast Cancer Res Treat*. doi: 10.1007/s10549-014-3163-8