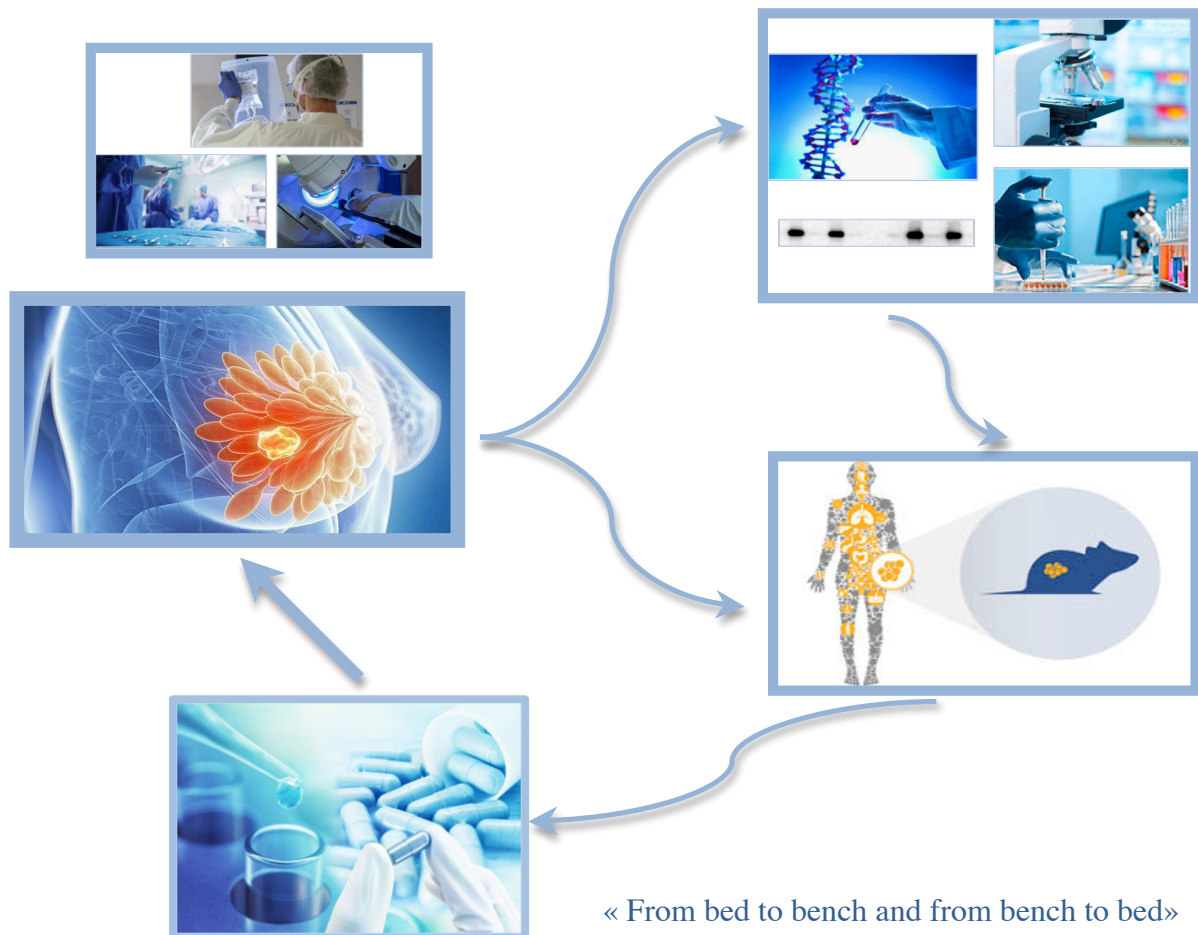


Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement
Département d'oncologie médicale – CHU de Liège

L'expression conjointe de la MT4-MMP, de l'EGFR et de la protéine du rétinoblastome sensibilise fortement les cancers du sein triple négatifs à la combinaison Erlotinib-Palbociclib



Pierre Foidart

Mémoire de thèse présenté en vue de l'obtention du grade académique de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteurs : Professeurs Guy Jerusalem et Agnès Noël

Supervision : Docteur Nor-Eddine Sounni

Avant de rentrer dans le vif du sujet, je tiens à remercier toutes celles et ceux qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail ou qui m'ont aidé à me développer à la fois en tant qu'homme, en tant que clinicien en oncologie médicale et en tant que chercheur.

Tout d'abord, je tiens à remercier mes promoteurs, les Professeurs Guy Jerusalem et Agnès Noël. Lors de la dernière année de master en médecine, Monsieur Jerusalem, vous avez su me convaincre des opportunités humaines et intellectuelles d'une carrière combinant la clinique et la recherche. Agnès, tu m'avais promis une « aventure de longue haleine » et ce fut le cas. L'activité de recherche est une épopée avec ses doutes, ses difficultés mais aussi et surtout des discussions enrichissantes, des rencontres inoubliables et des joies indescriptibles. Vos précieux conseils, vos idées permettant d'ouvrir de nouvelles pistes ont jalonné tout mon doctorat. Je remercie également le Professeur Didier Cataldo de son accueil au LBTD.

S'il est une personne que je ne pourrai jamais assez remercier, c'est le Docteur Nor-Eddine Sounni. Nor-Eddine, ta mémoire d'éléphant m'a plus d'une fois bluffé (tu es capable de citer une référence avec l'auteur, l'université, le journal et l'année de publication : inouï) mais c'est par dessus tout ta gentillesse, ton humilité, ta précision scientifique et ta capacité à faire confiance aux jeunes que tu encadres qui m'ont impressionné. Tu n'es pas seulement un superviseur, tu es proche de tes doctorants et tu les laisses grandir en tant que chercheurs, apprendre de leurs erreurs (sans pour autant laisser se produire des erreurs dommageables en terme de temps ou d'argent). C'est une chance incroyable d'avoir fait ta rencontre et j'espère que notre collaboration et amitié pourront encore durer pour de longues années.

Je remercie également le Docteur Alain Colige et le Professeur Philippe Delvenne pour leur accompagnement au fil des années de cette thèse et leurs jugements très critiques de l'avancée de ma thèse et de ses expérimentations.

Si ce travail a pu être mené à bien, ce n'est pas seulement grâce à la collaboration de cliniciens et de chercheurs du Giga Cancer et du CHU de Liège. Nous avons pu bénéficier de la collaboration des Docteurs Michel Coibion et Véronique Jossa, du CHC à Rocourt, qui nous ont permis d'avoir un accès à des parties de tumeurs de cancers du sein triples-négatifs à la sortie de la salle d'opération. Je me réjouis également que ce travail ait été le fruit d'une collaboration avec l'équipe du Docteur Elisabetta Marangoni de l'institut Curie de Paris qui, outre le partage de certaines de ses « PDX » avec notre équipe, a également suivi notre travail à maintes reprises et a, à presque chaque contact, ouvert de nouvelles pistes d'intérêt. Cette collaboration franco-belge a abouti à la publication de deux études dans « Clinical Cancer Research » et une troisième publication est actuellement en soumission. Enfin, je ne saurais assez remercier le Docteur Jean Radermacher, pour d'une part son amitié depuis des années, et d'autre part toutes les heures à revoir ensemble les lames histologiques de cette recherche. Jean, ton professionnalisme et ta haute compétence ainsi que tes idées originales ont rehaussé bon nombre de nos analyses et je garde un souvenir joyeux des journées passées ensemble à l'Institut de Pathologie et Génétique (IPG) de Gosselies.

Je ne saurais oublier de remercier Cassandra Yip qui dès mon arrivée au laboratoire m'a « écolé » sur les techniques. Je crois avoir élargi le panel de ses connaissances d'erreurs possibles à la réalisation de western-blot et elle a su palier à mes imprécisions, m'apprendre

différentes manipulations et a également guidé mes réflexions sur la MT4-MMP et l'EGFR avec à la fois beaucoup de gentillesse et d'exactitude. Laetitia Montero-Ruiz a ensuite dès son arrivée dans le laboratoire assuré une continuité des résultats lors de mes périodes cliniques et lorsque nous étions simultanément au laboratoire, sa présence a mené à une augmentation très impressionnante d'obtentions de résultats. Non seulement tu es incroyablement douée au laboratoire (une vraie fée) mais tu as su rapidement faire l'unanimité sur ta personnalité rayonnante. Merci Laetitia et Cassandre pour tout ce que vous avez apporté à ce travail. Merci aussi à Medhi, membre de la team «MT4-MMP », pour sa contribution au travail.

Laetitia n'est pas la seule fée du laboratoire. Nous pouvons également compter sur Isabelle Dasoul, Emilie Feyereisen et Erika Konradowski pour nous aider dans les périodes de rush. Un tout grand merci à Isabelle et Emilie car les derniers mois avant la publication de l'article, le nombre de marquages à réaliser était important et nous n'avions de cesse d'avoir de nouvelles idées alors que vous étiez déjà très occupées. Merci également à Silvia Blacher pour son aide dans la quantification des résultats mais aussi pour ses multiples conseils littéraires, cinématographiques et sa passion dans son travail et quand elle mentionne son Argentine.

S'il m'est impossible de citer toutes les personnes du LBTD, je souhaite particulièrement remercier Quentin, Thomas et Lionel pour l'amitié que nous avons tissée au laboratoire et en dehors. De même, Isabelle, merci de m'avoir accueilli dans le « petit bureau du coin » qui est trop chaud en été, trop froid en hiver mais toujours chaleureux quand tu y es présente. Merci à Irina pour les longues discussions, l'écoute dont tu fais preuve et tes précieux conseils. Bruxelles a bien de la chance de t'avoir désormais et je ne doute pas une seconde que tu y réaliseras de grandes recherches. Enfin, je tiens à citer Karin et Hélène qui rendent plus agréable le travail au quotidien et nous accueillent toujours avec sourire au secrétariat.

Je suis également très reconnaissant envers la Fondation Léon Fredericq qui, par ses actions et l'octroi de bourses, accélère le travail des chercheurs liégeois ! Par ailleurs, merci aux institutions telles que le FNRS (et le Télévie) ou le centre anti-cancéreux de nous permettre de ne pas toujours nous inquiéter du volet financier. Merci aussi aux « ladies against cancer » qui par l'organisation de leur journée de golf ont amélioré les subsides de cette thèse.

Sur le plan clinique, un tout grand merci à l'ensemble des superviseurs d'oncologie médicale (les Docteurs Bourhaba, Collignon, Freres, Gennigens, Gonne, Lousberg, Marchal, Martin, Onesti, Rorive et le Professeur Sautois) qui m'ont donné envie de choisir l'oncologie puis m'ont accompagné dans le développement de connaissances et aptitudes. Merci au Docteur Laurence Lousberg qui a accepté avec beaucoup de sympathie de reprendre des plages de consultation afin de me permettre de rédiger. Merci Laurence également pour tes pointes de taquinerie toujours très subtiles et pour ton soutien lorsque tu sens que des plus jeunes que toi sont affectés par la perte de patients. Un merci tout spécial au Docteur Joëlle Collignon pour sa supervision bienveillante au quotidien cette dernière année, sa compréhension de ma tendance à vouloir tout faire en même temps et sa canalisation de cet aspect. Par ailleurs, vous m'apprenez à réfléchir à la littérature avec un regard très critique et à la manière de prendre en charge des patients avec à la fois beaucoup d'humanité et de

rationnel. Je tiens aussi à souligner le travail au quotidien des secrétaires, équipes infirmières (CHU de Liège et CHR de Huy) et des data managers sans qui la boutique « ne tournerait pas. Merci enfin à mes co-assistantes Alix, Marie L. et Aurélie : votre soutien et votre esprit d'équipe ont été précieux tout au long de cette année. Par ailleurs, votre amitié et celle des jeunes assistants (Jalal, Alixe, Marie S, Valentine, Fernand, Charles, Chloé) m'ont permis de me détendre quand j'en avais besoin. L'oncologie liégeoise a de belles années devant elle!

Je remercie mes amis et ma famille et particulièrement mes parents qui ont toujours été des modèles pour leur pratique humaine de leur métier, ont dû me supporter pendant mes années d'étudiant stressé en médecine et qui ont par la suite toujours été intéressés par l'évolution de mes résultats. Merci pour votre amour et votre attention au quotidien. Merci Marie-José d'avoir été là depuis ma plus petite enfance et de m'avoir entouré de ta tendresse ainsi que d'avoir partagé mes bonheurs et mes déceptions. Merci également à mes amis des études de médecine (Denis, François, Matthieu) mais aussi ceux hors médecine (« les masta copous » et particulièrement à Laurent, Tristan et Joseph que j'ai eu plus l'occasion de voir cette dernière année) car ils ont toujours été des piliers pour m'aider à rebondir dans les périodes parfois moins faciles. Merci à Virginie pour ton amitié indéfectible. Enfin, merci à Jean-Luc et Jean-Philippe d'avoir été également très présents lors de mes problèmes de santé de 2018: la période sans appui a paru moins longue aussi grâce à vous et les gars je n'en doute pas : « Standard Champion » dans les 2 années à venir !

Pierre Foidart, Mai 2019



« l'onco-team des assistants 2018-2019 »



« la team MT4-MMP »



« les masta copous »



« mes parents et Marie-José »

Abréviations

A

ACR : collège américain de radiologie

ADAM : a disintegrin and metalloproteinase

ADC : Antibody-drug-conjugate

AI : inhibiteurs de l'aromatase → les AI non-stéroïdiens (NSAI)

AJCC-UICC : the American Joint Committee on Cancer et l'Union Internationale Contre le Cancer

AR + (-): Expression positive (négative) des récepteurs aux androgènes

AREG : Amphiréguline

ASCO : Société américaine d'oncologie

B

BET : Bromodomain and Extra-Terminal domain

BI-RADS (Breast Imaging-Reporting And Data System)

BL1 : Basal-like 1

BL2 : Basal-like 2

BLIA : Basal-like immune activated

BLIS : Basal-like immune suppressed

BRCA 1 ou 2 : BReast CAncer gene susceptibility 1 ou 2

C

CA 15.3 : Carbohydrate Antigen 15.3

CDK : Cyclin-Dependant-Kinase

CIP/KIP : CDK-interacting protein/kinase inhibitory protein

voie CLIC/GEEC : CLathrine Independent Carriers/GPI-enriched Early Endosomal Compartments

CNAs : altérations du nombre de copies de gènes

CRISPR-Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crisper associated protein

CTLA-4 : Cytotoxic-T-lymphocyte-antigen-4

D

DCIS : Ductal Carcinoma *In Situ* = carcinome canalaire *in situ*

DFS : Disease Free Survival : survie sans maladie

DNMT : méthyltransférases de l'ADN

E

EBCTCG : Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group

EGF : Epidermal Growth Factor = facteur de croissance épidermique

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse

EPG : Epigène

EPR : Epiréguline

ER+ (-) : Cancer mammaire (n') exprimant (pas) les récepteurs hormonaux

ESMO : Société européenne d'oncologie médicale

F

FDA : Food and Drug Administration

FNA : Fine needle aspiration

G

ancre GPI : glycosylphosphatidylinositol

H

HBEGF : Heparin-binding EGF-like growth factor

HDAC : Histone Déacétylase

HER : Human Epidermal growth factor Receptor

HR : Recombinaison homologue

I

IARC : Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer

IDC : Invasive Ductal Carcinoma = Carcinome canalaire invasif (encore appelé carcinome *Not Otherwise Specified* (NOS))

IGF1 : Insulin growth factor-1

IHC : Immunohistochimie

ILC : Invasive Lobular Carcinoma = Carcinome lobulaire invasif

IM : Immunomodulatory

IMC : Indice de Masse Corporelle

INK4 : INhibitors of CDK4

L

LAR : Luminal Androgen Receptor

LCIS : Lobular Carcinoma *In Situ* = carcinome lobulaire *in situ*

M

M ou MES : Mesenchymal

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MMPs : métalloprotéinases matricielles → MMPi : inhibiteur pharmacologique des MMPs

MSL : Mesenchymal stem-like

N

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NSCLC : cancer du poumon non à petites cellules

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS : Overall Survival : survie globale

ORR : Objective Response Rate : taux de réponse

→ on y distingue les CR (Complete Response : réponse complète) et les PR (Partial Response : réponse partielle)

P

PARP : PolyADP-Ribose Polymerase → PARPi : inhibiteur de PARP

pCR : réponse pathologique complète

PD-1 : Programmed cell-death 1

PD-L1 : Programmed death-ligand 1

PDX : patient-derived-xenograft → PDX-TNBC : PDX dérivée d'une tumeur TNBC

PFS : progression free survival : survie sans progression

PR : Récepteur à la progestérone

R

Rb : protéine du Rétinoblastome

RE : Réticulum endoplasmique

RT-PCR : Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction

S

SD : Stable disease : maladie stable

SERD : Selective Estrogen Receptor Downregulators/Degraders

SERM : Selective Estrogen Receptors Modulators

siRNA : small interfering RNA

T

TGF- α , β : transforming growth factor α , β

TILs : Tumor-infiltrating lymphocytes = lymphocytes intra-tumoraux

TIMP : a tissue inhibitor of metalloproteinases = inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase

TKI : Inhibiteurs de tyrosine kinase

TNBC : Triple Negative Breast Cancer = Cancer du sein triple négatif

Table des matières

Abréviations

Préliminaires

Introduction 11

1. Epidémiologie	13
1.1. Dans le monde	13
1.2. En Belgique	13
1.3. Incidence selon l'âge	14
2. Facteurs de risques de développer un cancer du sein	15
2.1. Facteurs constitutionnels	15
2.2. Facteurs hormonaux	15
2.3. Facteurs liés à la surexposition en oestrogènes	16
2.4. Antécédents personnels ou familiaux de pathologies mammaires	17
2.5. Mode de vie	18
2.6. Antécédents de radiation ionisante	18
2.7. Facteurs aux données non concluantes ou ne majorant pas le risque	18
2.8. Facteurs protecteurs	18
3. Histologie-anatomie du tissu mammaire normal et pathologique	18
3.1. Anatomie-histologie du sein	18
3.2. Types histologiques du cancer du sein	20
3.3. Carcinogénèse	21
4. Dépistage	23
4.1. Le dépistage par mammographies (Mammotest®)	23
4.2. Autres modalités de dépistage	25
5. Du diagnostic, à la caractérisation (immuno-)histologique et moléculaire	26
5.1. Découverte de la maladie	26
5.2. Confirmation du diagnostic, évaluation du type histologique et du grade	27
5.3. Analyses complémentaires : le recours aux immunohistochimies	28
5.4. La classification moléculaire et son lien avec la classification immunohistologique	29
6. Stadification	33
6.1. Bilan à réaliser devant un cancer à priori localisé (Guidelines de l'ESMO)	33
6.2. Stades	33
6.3. Evaluation de la taille de la tumeur primaire (T), du statut ganglionnaire (N) et métastatique (M)	34
6.4. TNM 8 ^{ème} édition (AJCC-UICC 2017)	35
6.5. Stades anatomiques TNM 8 ^{ème} édition (AJCC-UICC 2017) [94]	36
6.6. Stades pronostiques pathologiques et cliniques TNM 8 ^{ème} édition (AJCC-UICC 2017)	36
7. Facteurs pronostiques et prédictifs	36
7.1. Facteurs pronostiques principaux	37
7.1.1. Caractéristiques liées à la patiente	37
7.1.2. Caractéristiques de la tumeur autres que génomiques/transcriptomiques	38
7.1.3. Caractéristiques génomiques/transcriptomiques de la tumeur	39
7.2. Facteurs prédictifs principaux	40

8. Traitements actuels des cancers du sein	41
8.1. Traitements locorégionaux	41
8.1.1. Chirurgie	41
8.1.2. Radiothérapie	42
8.2. Traitements systémiques en situation adjuvante	42
8.2.1. Hormonothérapie	42
8.2.2. Thérapies ciblées anti-HER2	44
8.2.3. Chimiothérapie	44
8.3. Traitements systémiques en situation néoadjuvante [63]	45
8.4. Traitements systémiques en situation métastatique [159]	45
9. Difficultés actuelles et perspectives du traitement des TNBC	46
9.1. Particularités des TNBC	46
9.2. L'hétérogénéité des TNBC	47
9.2.1. Mieux connaître les TNBC au niveau génique	47
9.2.2. Hétérogénéité au niveau transcriptomique : classifications moléculaires	48
9.3. Pistes d'amélioration de prise en charge des patientes atteintes de TNBC	52
9.3.1. Considérer à part les TNBC exprimant les récepteurs aux androgènes	52
9.3.2. Les anticorps conjugués à des agents cytotoxiques (ADC : antibody drug conjugates)	53
9.3.3. Cibler les voies de signalisation génétiquement altérées	54
9.3.4. Considérer les mutations BRCA germinales et les phénotypes BRCAness	55
9.3.5. Le recours à l'immunothérapie	56
9.3.6. Agir au niveau épigénétique	58
9.4. En conclusion	59
10. L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	60
10.1. Structure et ligands des récepteurs ErbB	60
10.2. Activation, internalisation des récepteurs ErbB	61
10.3. Rôles physiologiques de l'EGFR	64
10.4. Implication de l'EGFR dans le cancer	64
10.5. Traitements ciblés contre l'EGFR dans les TNBC	65
10.5.1. Les anticorps monoclonaux anti-EGFR	65
10.5.2. Les inhibiteurs tyrosine-kinase	67
10.6. En conclusion	67
11. La MT4-MMP (=MMP-17) dans les TNBC	68
11.1. Classification des matrix métalloprotéinases	69
11.2. Particularités de la MT4-MMP	71
11.2.1. Structure	71
11.2.2. Substrats et inhibiteurs	71
11.2.3. Biosynthèse et trafic	72
11.2.4. Expression naturelle et fonctions physiologiques	73
11.2.5. Implication dans le cancer du sein	73
11.2.6. Les inhibiteurs pharmacologiques des MMPs (MMPi)	76
11.3. En conclusion	76
12. Les inhibiteurs du cycle cellulaire (inhibiteur des CDK4/6) pour traiter les TNBC	77
12.1. La régulation du cycle cellulaire	77
12.1.1. La progression du cycle cellulaire	77
12.1.2. Les inhibiteurs physiologiques du cycle cellulaire	79
12.2. La perte de régulation du cycle cellulaire en cas de cancer	80
12.3. Les inhibiteurs pharmacologiques des CDK	81
12.3.1. La place actuelle des inhibiteurs CDK 4/6 dans les cancers ER+/HER2-	81
12.3.2. La place potentielle des inhibiteurs CDK 4/6 dans les cancers HER2+	83
12.3.3. La place potentielle des inhibiteurs CDK 4/6 dans les TNBC	83
12.3.4. L'avenir proche des CDK 4/6	88

Plan et objectifs

Résultats

93

1. Première partie

94

- 1.1. Taux de co-expression de la MT4-MMP et de l'EGFR dans les TNBC 94
- 1.2. Recherche de corrélation entre l'expression de la MT4-MMP et/ou de l'EGFR et les caractéristiques clinicopathologiques des patientes 94
- 1.3. Relation entre la MT4-MMP et la survie et rôle de biomarqueur prédictif à la chimiothérapie de la MT4-MMP 94
- 1.4. Confirmation *in vitro* du rôle de biomarqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie de la MT4-MMP : uniquement pour les agents ciblant l'ADN 94
- 1.5. Confirmation *in vivo* du rôle de biomarqueur prédictif de réponse à l'Erlotinib et à l'Epirubicine de la MT4-MMP 95

2. Deuxième partie

106

- 2.1. Validation de l'intérêt clinique de l'axe MT4-MMP/EGFR/Rb : taux de co-expression des 3 biomarqueurs dans les TNBC 106
- 2.2. Démonstration *in vitro* de la sensibilité des cellules co-exprimant les 3 biomarqueurs à l'Erlotinib et au Palbociclib ainsi qu'à leur combinaison 106
- 2.3. Confirmation *in vivo* du caractère de biomarqueur prédictif de réponse au traitement par Erlotinib et/ou Palbociclib de la co-expression de la MT4-MMP, de l'EGFR et de Rb 107

3. Troisième partie : revue sur la MT4-MMP

128

4. Quatrième partie : articles issus de la collaboration avec l'équipe du Docteur Elisabetta Marangoni

128

Discussion et perspectives

129

Bibliographie

137

Annexes

167

Annexe 1 : Revue sur la MT4-MMP

168

Annexe 2 : Article issu de la collaboration avec l'équipe du Docteur Elisabetta Marangoni

181

Préliminaires

Cette thèse de médecine translationnelle aborde les divers aspects du cancer mammaire selon les principes du « from bed to bench and from bench to bed ».

Dans l'introduction, l'aspect clinique y tient donc une place importante de même que la génétique, les classifications moléculaires, les traitements ciblés, l'immunothérapie et bien entendu les éléments dont la connaissance est indispensable à la compréhension de la recherche originale présentée : TNBC, EGFR, MT4-MMP et cycle cellulaire. Dans la partie « Résultats », nous décrivons notre recherche originale. Dans la partie « Discussion et perspectives », nous revenons sur les échecs des précédentes stratégies de recherche traditionnelle concernant l'EGFR et les MMPs et tentons de donner des perspectives sur le rôle de biomarqueurs de la MT4-MMP et les possibles futures recherches à mener pour traduire en clinique ces acquis précliniques et améliorer éventuellement l'efficacité des traitements proposés aux patientes. Nous avons choisi de différencier la discussion et les perspectives de celles décrites dans les différents articles récemment publiés et que vous trouverez dans la partie « Résultats » de cette thèse.

Introduction

Introduction

1. Epidémiologie

1.1. Dans le monde

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC) ont estimé, via le projet GLOBOCAN 2012, l'incidence des cancers à travers le monde en 2012 à 14,1 millions de cas. En parallèle, ils ont évalué la mortalité due aux cancers à 8,2 millions d'individus. Selon l'OMS, en 2011, les cancers ont d'ailleurs causé plus de décès que l'ensemble des maladies coronariennes et des accidents vasculaires cérébraux [1].

Tous sexes confondus, le cancer du sein est le second cancer le plus diagnostiqué en 2012 (1,67 millions) derrière le cancer du poumon (1,82 millions). Il représente le cinquième cancer le plus meurtrier (6,4%) derrière le cancer du poumon (19,4%), l'hépatocarcinome, le cancer gastrique et les cancers colorectaux. Chez la femme, à travers le monde, il est de loin le cancer le plus fréquent (25,2% de tous les cancers) et il s'agit

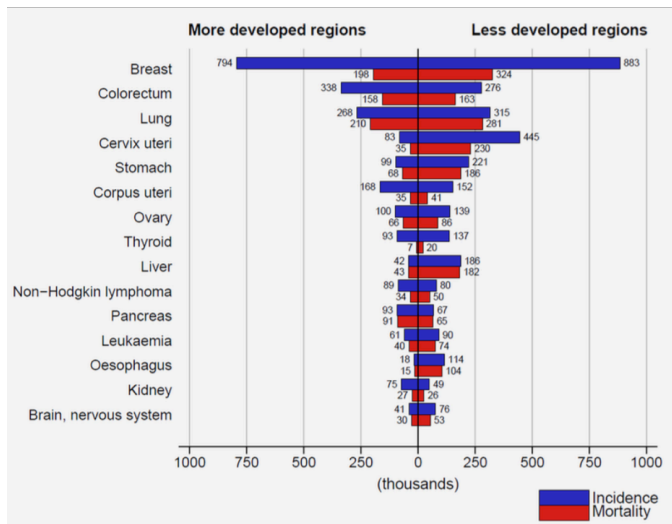


Fig 1: Incidence en nombre absolu et mortalité chez la femme (nombre de cas estimés en milliers) des cancers en 2012 dans les régions développées ou moins développées du monde. D'après Fray et al. 2014 [1].

également de la première cause de décès par cancer (14,7%). Cependant, en ne se concentrant que sur les pays les plus développés, le cancer du poumon dépasse le cancer du sein en terme de mortalité chez la femme (fig 1) [1].

L'incidence à travers le monde est la plus haute en Amérique du nord, Australie et Nouvelle-Zélande et dans l'Europe du nord et de l'ouest alors qu'elle est la plus faible en Asie et Afrique sub-saharienne en raison de l'industrialisation des sociétés (surpoids, âge de la ménarche et de la lactation, moindre nombre de grossesses et âge plus élevé lors de la première grossesse) [2]. L'incidence de cancer du sein est d'ailleurs plus importante aux USA parmi les migrants de 2^{ème} génération comparée aux migrants de 1^{ère} génération et augmente dans les 3^{ème} et 4^{ème} générations [3]. Vu le vieillissement de la population, l'incidence mondiale des cancers en général et donc du cancer du sein va augmenter d'ici 2035 [4].

1.2. En Belgique

En Belgique, un homme sur trois et une femme sur quatre sont atteints d'un cancer avant l'âge de 75 ans. Respectivement, 78% des hommes et 67% des femmes ont au moins 60 ans lors du diagnostic (www.kankerregister.org). Les projections indiquent un accroissement de l'incidence des cancers de 17% entre 2014 et 2025 (passant de 67,820 à 79,140 cas). Cette majoration atteint même 22% en se focalisant sur les femmes contre 12% chez les hommes. Cette différence entre sexes est essentiellement due à la plus forte majoration d'incidence de

Introduction

cancers du poumon chez la femme, un moindre taux de cancers de prostate et à l'augmentation attendue de cancers du sein chez la femme qui passeront de 10,466 cas en 2014 à 12,125 cas en 2025 (+15,9%)[5].

Le cancer du sein est actuellement le cancer le plus fréquent chez la femme en Belgique où il représentait, en 2013, 35% des diagnostics de cancer et le restera en 2025. Une femme sur huit en sera affectée. Proportionnellement à la population, nous détenons malheureusement la 1^{ère} place européenne en terme d'incidence de ce cancer devant les Pays-Bas et le Royaume-Uni. Il est également, de par sa forte prévalence, le cancer le plus meurtrier chez la femme, y entraînant 20% des décès par cancer en 2013 [6]. Comme dans le reste de l'Europe, le taux de mortalité diminue à la faveur d'un diagnostic plus précoce (en partie grâce au dépistage par mammographie) et d'un élargissement de l'éventail de thérapies systémiques disponibles. En Belgique, ce taux a régressé de 2% annuellement de 2004 à 2013 [6–8]. Au 31 décembre 2013, la survie à 5 ans chez les femmes était de 90% et pas moins de 80.099 femmes étaient en vie après un diagnostic de cancer du sein entre 2004 et 2013, représentant tout de même 1,4% de la population féminine belge [6].

La projection d'ici 2025 de l'incidence du cancer du sein varie selon l'âge [5, 6] :

- **patientes de plus de 70 ans** : une forte majoration d'incidence du cancer du sein est attendue. Elle augmente annuellement de 2%. Dans cette tranche d'âge, les tumeurs sont généralement plus volumineuses. Heureusement, c'est surtout parmi des tumeurs de stade I, que l'accroissement d'incidence est le plus marqué.
- **patientes de 50 à 69 ans** : faible élévation du nombre de cas.
- **patientes de 25 à 49 ans** : une faible régression y est espérée.

Il est important de signaler qu'aucune augmentation significative du risque même de cancer par individu n'est anticipée et que la majoration d'incidence du cancer du sein peut être totalement imputable à la hausse attendue de la population féminine et son vieillissement.

1.3. Incidence selon l'âge

En Belgique, l'âge moyen des patientes au diagnostic est de 62 ans [9]. Il est intéressant de regarder la courbe des âges des diagnostics de cancers du sein en Belgique et aux USA (fig 2 et 3). Une augmentation exponentielle de cas est observée à partir de 35-40 ans et la moitié des cas sont retrouvés entre 50 et 70 ans [6, 10].

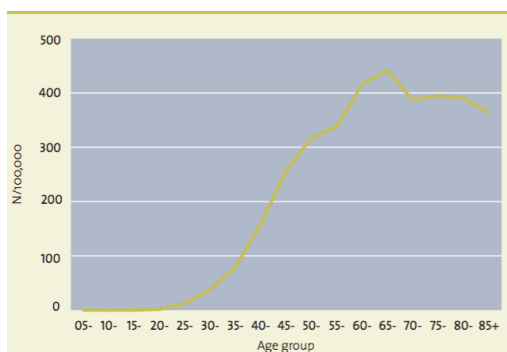


Fig 2: Taux d'incidence de cancer du sein suivant l'âge par 100.000 personnes. D'après le Cancer Burden in Belgium 2004-2013 [6].

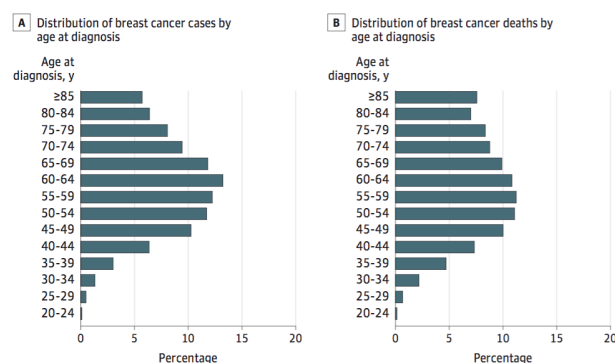


Fig 3 : A) Distribution de l'incidence de cancers du sein (%) selon l'âge au diagnostic. B) Distribution des décès liés aux cancers du sein (%) selon l'âge au diagnostic. D'après Oeffinger et al, 2015 [10].

Introduction

2. Facteurs de risques de développer un cancer du sein

Environ la moitié des cas de cancers du sein peuvent être au moins partiellement reliés à des facteurs de risque bien identifiés (âge de la ménarche ou de la ménopause, maladie mammaire proliférative,...). Par ailleurs, une histoire familiale de cancer du sein est retrouvée dans cinq à dix pourcents des cas. Enfin, ces risques sont modulés par des aspects démographiques ou environnementaux et le mode de vie, bien que ces paramètres n'aient pas une association franchement démontrée avec le risque de développer un cancer du sein.

2.1. Facteurs constitutionnels

Le **sexe féminin** confère un risque 100 fois supérieur au développement de cancer du sein comparé au sexe masculin. Ce risque augmente avec **l'âge**. S'il est de 1,9 % jusqu'à 49 ans (une femme sur 52), il passe à 6,8% à partir de 70 ans (une femme sur 15). Au cours d'une vie, le risque cumulatif est de 12,4% (une femme sur 8) [3].

Une **grande taille** est également un facteur de risque et ce peu importe le statut ménopausique de la femme [11–13]. Ainsi, une taille supérieure à 175 cm est associée à une probabilité de présenter ce cancer de 20% supérieure à une taille inférieure à 160 cm [11]. Il se pourrait que cela soit un reflet de l'importance de la nutrition pendant l'enfance et la puberté [13].

La **couleur de peau blanche** génère une légère hausse de risque. Il ressort, des données «United States Cancer Statistics» (USCS) pour les années 2005-2009, que l'incidence de cancers du sein est plus grande parmi les femmes de couleur blanche (122 sur 100.000) comparée à celles de couleur noire (116 sur 100.000). Cependant, ces dernières présentent plus fréquemment des cancers régionaux ou avancés (45% vs 35%) et un taux de mortalité plus important de 41% (32 vs 22 pour 100.000 femmes) en raison d'un moindre screening, d'un accès plus restreint aux traitements, d'un suivi inférieur et du caractère immunohistochimique plus agressif de leur cancer [14].

Plus **la densité mammaire** augmente, plus le risque est important. Elle n'est par contre pas associée à un type histologique particulier de cancer ou à la mortalité [15–17].

2.2. Facteurs hormonaux

Des **taux élevés d'oestrogènes endogènes** accroissent le risque de cancer du sein (surtout ceux exprimant les récepteurs hormonaux tels que les récepteurs aux oestrogènes (ER+)):

- **corrélation abondamment établie après la ménopause** : risque relatif (RR) de 2 à 2,6 entre le plus faible quartile et le plus haut quartile en terme de taux d'oestradiol [18, 19].
- **données moindres pour les femmes préménopausées**. Dans l'étude « Nurses'Health Study II », posséder un taux d'oestrogènes dans le quartile le plus élevé confère un risque de cancer du sein 2,4 plus élevé que s'il est dans le quartile le plus faible [20]. Ce sont les seuls taux d'oestradiol en phase lutéale qui sont associés à ce risque (les autres oestrogènes, y compris l'oestradiol libre, ou la progestérone lors de l'ensemble du cycle ou l'oestradiol en phase folliculaire ne le sont pas) [21].
- les os étant riches en récepteurs aux oestrogènes, plus **la densité osseuse** est élevée, plus le risque de cancer du sein augmente [22, 23].

Introduction

Les **androgènes à des taux élevés** sont aussi associés à un risque accru de cancer du sein tant avant [20] qu'après la ménopause [18] et plusieurs études indiquent que ce risque concerne spécifiquement les cancers ER+ [20, 24].

Les taux sériques de **progestérone** sont inversement liés à un risque de cancer chez la femme avant la ménopause alors qu'aucune corrélation n'est déterminée après [25].

Dans une analyse des données de 17 études prospectives, le taux d'**insulin growth factor-1 (IGF1)** a été corrélé à une majoration du risque de cancer du sein, peu importe le statut ménopausique (semblant se restreindre aux cancers ER+) [26]. Encore plus étonnamment, si le diabète n'est pas un facteur de risque de cancer du sein [27], avoir des **taux élevés endogènes d'insuline** s'avère être un facteur de risque indépendant de cancer du sein chez des femmes ménopausées non diabétiques et ne prenant aucune substitution hormonale [28].

Enfin, **l'exposition in utero au diéthylstilbestrol**, employé jusque 1971 contre les menaces de fausse couche, fait l'objet de controverses. Pour certains, elle double le risque de cancer du sein (étude sur 4.653 femmes exposées) [29]. A l'inverse, une étude sur 12.091 femmes néerlandaises exposées, ne démontre aucune majoration de risque [30].

2.3. Facteurs liés à la surexposition en oestrogènes

Certaines situations majorant le taux d'oestrogènes sont elles même également des facteurs de risque. Ainsi :

- **l'obésité (Indice de Masse Corporelle ou IMC ≥ 30 kg/m²) et la prise de poids autour de la ménopause** sont des facteurs de risque identifiés dans de multiples études chez la femme postménopausée, particulièrement pour les cancers ER+ [19, 31, 32], en raison de la conversion par l'aromatase adipocytaire des précurseurs androgéniques en oestrogènes [19] et de l'hyperinsulinémie liée à cet excès d'IMC [28]. A l'inverse, **avant la ménopause, présenter un IMC élevé diminue le risque** de cancer du sein [11, 12] : un IMC ≥ 31 kg/m² le réduit de 46% en comparaison à un IMC < 21 kg/m² [11].
- certaines situations reproductives sont associées à un risque accru :
 - la **ménarche précoce** : le risque est plus faible si elle survient après 15 ans qu'avant l'âge de 13 ans, que ces cancers soient ER+ (Hazard Ratio : 0,76) ou non [13, 33] .
 - la **ménopause tardive** [33].
 - la **nulliparité** confère un risque relatif (RR) de 1,2 à 1,7 en comparaison à la parité. L'effet protecteur des grossesses débute dix ans après le premier accouchement et s'accroît avec le nombre de celles-ci [33, 34]. Remarquons que l'association avec **l'infertilité** est elle plus sujette à controverses : certaines études relatent qu'elle diminue le risque de cancer du sein en raison de troubles anovulatoires [35], d'autres mentionnent l'absence de lien ou une légère élévation du risque [36].
 - **âge lors du premier accouchement à terme** : si celui-ci est de 20 ou 25 ans, réduction respective du risque de cancer du sein (et ce jusqu'à l'âge de 70 ans) de 20% et 10% en comparaison aux femmes nullipares. Une hypothèse est que la poursuite de différenciation cellulaire dans les glandes mammaires qui a lieu lors et après grossesse protège du cancer par réduction de la proportion de cellules souches. En revanche, le risque est similaire si la mère a ≥ 35 ans au premier accouchement et pourrait même se

Introduction

majorer ensuite car la stimulation proliférative a alors lieu sur des seins totalement développés et plus sujets à des dégâts cellulaires [33, 34].

- la **contraception orale** : la plupart des études épidémiologiques ne mettent pas en évidence d'accroissement du risque de cancer mammaire chez les personnes qui utilisent ou ont utilisé des contraceptifs oraux oestro-progestatifs de quelque nature que ce soit, et quelle que soit la durée [37].
- le **traitement hormonal substitutif de la ménopause** : une augmentation modérée de l'incidence du cancer mammaire est observée chez les femmes utilisant un traitement hormonal estro-progestatif substitutif (RR de 1,24 soit 5 cancers supplémentaires pour 1000 femmes traitées pendant 5 à 6 ans) [38].

2.4. Antécédents personnels ou familiaux de pathologies mammaires

Les **pathologies bénignes** peuvent augmenter le risque de développer un cancer ultérieurement sans que ce ne soit nécessairement dans le site même de la lésion bénigne. Schématiquement, on les classe en trois catégories [39]:

- les lésions non prolifératives (kystes, modification apocrine papillaire, hyperplasie légère) : RR de 1 à 1,25.
- les lésions prolifératives sans atypies (hyperplasie canalaire usuelle, papillomes intracanaux simples ou multiples, fibroadénome,...) : RR de 1,88.
- les hyperplasies atypiques canalaux ou lobulaires : RR de 4,24.

Un **antécédent personnel de cancer mammaire ou de carcinome canalaire *in situ* (DCIS = Ductal Carcinoma *In Situ*)** confère un RR pouvant atteindre 4 dans certaines séries en fonction de l'âge de la patiente (majoré si < 40 ans) et du statut en récepteur hormonal du cancer lors de ce premier événement [40, 41].

Des **antécédents familiaux de cancer du sein** augmentent considérablement le risque chez un individu féminin : il est environ doublé si il y a un cas d'un parent au 1^{er} degré et triplé s'il y en a deux. L'âge des proches au moment de leur diagnostic a également un impact : risque triplé si < 30 ans et 1,5 fois majoré si > 60 ans [42]. Il est actuellement estimé que 5 à 10% des cancers du sein ont un terrain génétique et dans 25% de ces cas, une mutation germinale des gènes **BRCA 1 ou 2** (Breast Cancer gene susceptibility 1 ou 2) est retrouvée. Il s'agit d'une mutation de transmission autosomique dominante avec perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs qui normalement assurent la recombinaison homologue de cassures doubles-brins. Selon les séries, le risque de développer un cancer du sein avant l'âge de 70 ans chez un porteur de mutation **BRCA** est de 45-87% (risque un peu supérieur si **BRCA 1** que **BRCA 2**). Le diagnostic est le plus souvent posé avant 50 ans (âge moyen de 40 et 43 respectivement pour **BRCA 1** et **2** dans l'étude du consortium CIMBA) et ces cancers expriment plus rarement les récepteurs hormonaux (jusqu'à 78% de cas ne les exprimant pas en cas de mutation **BRCA1**) [43, 44]. **D'autres gènes** peuvent conférer un risque élevé (**TP53, CDH1, PTEN, STK11, RAD51C/D**) ou faible/modéré (**ATM, CHEK 2, BRIP1, PALB2**) de cancer du sein. Ils sont le plus souvent impliqués dans le maintien de l'intégrité génomique et la réparation de l'ADN et peuvent être associés à des syndromes entraînant plusieurs cancers comme le Syndrome de Li-Fraumeni (**TP53**), le syndrome de Cowden (**PTEN**) ou celui de Peutz-Jeghers (**STK11/ LKB1**) [43]. Les cancers héréditaires surviennent à un âge plus jeune que les sporadiques.

Introduction

2.5. Mode de vie

La **consommation d'alcool** est largement reconnue comme facteur de risque tant à faible dose (< 1 unité/jour) qu'à haute dose (≥ 3 unités/jour) où elle élève le risque de près de 50 %. L'association est statistiquement reconnue pour les cancers de type Luminal A et HER2, mais pas pour les autres sous-types intrinsèques moléculaires [45]. Notons que dans une étude européenne sur 250.000 femmes à travers huit pays, 5% des cancers du sein lui sont attribués [46]. Le **tabagisme** est aussi un facteur de risque indépendant. Avoir fumé au moins 20 paquets-années ou avoir initié son tabagisme 5 ans avant son premier enfant entraîne jusqu'à 35% de risque supplémentaire [47]. Enfin, il apparaît que le travail nocturne cause un RR d'environ 1,5 et cela a été associé à de moindres taux de métabolites de la mélatonine [48].

2.6. Antécédents de radiation ionisante

Des antécédents d'irradiation thoracique soit accidentelle (ex : Tchernobyl) ou à visée curative (Lymphome de Hodgkin, Sarcome des tissus mous) durant l'enfance ou le début d'âge adulte confèrent un risque soutenu de cancer du sein ultérieur. Chez ces patientes, l'emploi de chimiothérapies alkylantes n'augmente pas le risque en raison de leur effet de suppression de fonction ovarienne [49, 50]. Les irradiations à visée diagnostique semblent n'accroître le risque que chez des patientes avec prédisposition héritées (BRCA)[51].

2.7. Facteurs aux données non concluantes ou ne majorant pas le risque

Il n'y a pas encore de données suffisamment convaincantes pour établir un lien de diminution du risque de cancer avec une alimentation méditerranéenne et riche en fruits et légumes ou la prise de soja et phyto-oestrogènes. A l'inverse, une alimentation riche en graisse ou en viande rouge (> 5 fois/semaine) sont parfois incriminées mais les données restent assez controversées. Il est désormais prouvé qu'il n'y a pas d'association avec la prise de caféine. La différence d'incidence à travers le monde semble tenir de l'industrialisation des régions à haute incidence. Le tabagisme passif reste un facteur de risque controversé. Il n'y a pas d'évidence ou une évidence faible d'association avec certains médicaments comme le calcium et la vitamine D, les antioxydants, les AINS, et les biphosphonates. Enfin, les ligatures tubaires et les avortements n'ont pas été reliés à un risque de cancer du sein [52].

2.8. Facteurs protecteurs

L'allaitement maternel diminue le risque de cancer du sein probablement en postposant le retour à des cycles ovulatoires [53]. **L'exercice physique** réduit également ce risque, essentiellement après la ménopause, sauf en cas de recours à une thérapie hormonale substitutive [54]. Les bienfaits de l'exercice physique sont liés à la perte de poids mais également à une normalisation des taux d'oestrogènes ou d'insuline et d'IGF1 [55].

3. Histologie-anatomie du tissu mammaire normal et pathologique

3.1. Anatomie-histologie du sein

Le sein comporte deux systèmes. Il y'a d'une part le **système de soutien**, constitué de tissu conjonctif et d'adipocytes dont la proportion respective varie avec le temps. Ainsi, s'il est essentiellement fibreux avant la ménopause et donc dense, le sein devient ensuite plus grasseux. D'autre part, **du tissu glandulaire** (« la glande mammaire ») se développe à la

Introduction

puberté pour assurer la lactation et involue à la ménopause. Il est constitué d'une quinzaine de lobes composés de lobules, lesquels sont formés d'acini (alvéoles) disposés en grappes. De la profondeur à la surface, est ainsi observée une structure arborescente de canaux de taille croissante allant des unités ducto-lobulaires (tubulo-alvéoles mammaires) vers des canaux galactophores intralobulaires puis intralobaires et enfin interlobaires. Les canaux issus de chaque lobe s'ouvrent isolément au niveau du mamelon (fig 4). Lobules et canaux sont fréquemment le siège d'une cancérisation [56].

Jusqu'aux canaux intralobaires, le tissu glandulaire possède deux couches. La couche interne est faite de cellules épithéliales cubiques sécrétoires (**luminales**) qui, dans les acini, assurent la production du lait. Celui peut progresser en réponse à un stimulus de succion grâce à l'action des cellules myoépithéliales qui forment la couche externe (**basale**). Le tout repose sur une membrane basale riche en laminine et protéoglycans et marquant la séparation avec le tissu conjonctif (fig 5). Les canaux interlobaires sont revêtus d'un épithélium pavimenteux stratifié [56].

Le sein est principalement vascularisé par les artères/veines thoraciques (mammaires) internes et externes, venant respectivement (ou rejoignant) des artères/veines sous-clavières et axillaires. Son drainage lymphatique est de haute importance, compte tenu de son rôle dans la propagation de métastases. Près de 90% de la lymphe aboutit aux ganglions axillaires et le plus souvent en premier lieu aux ganglions pectoraux (antérieurs) de la chaîne mammaire externe [57].

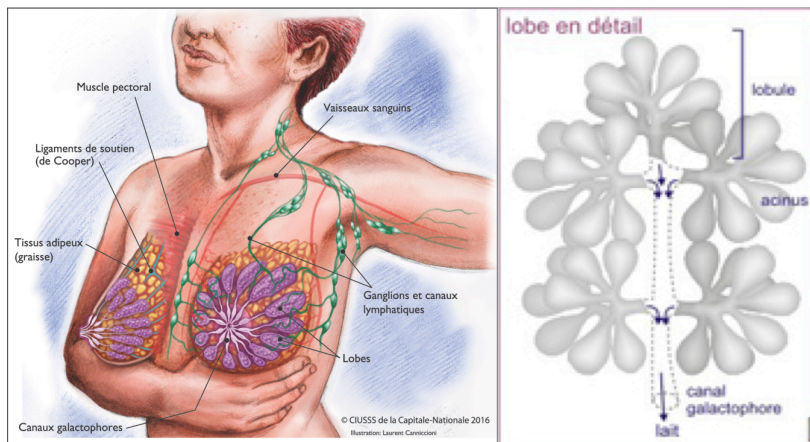


Fig 4 : Anatomie mammaire et lobe.
Adapté de <http://www.depistagesein.ca/sante-anatomie>.

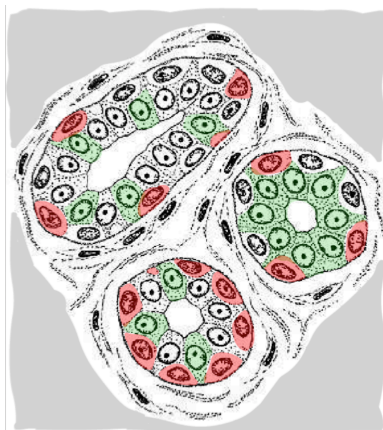


Fig 5: Histologie de l'unité ducto-lobulaire où sont retrouvées des cellules épithéliales (vert) et des cellules myoépithéliales (rouge). Ces unités sont séparées par un tissu conjonctif intralobulaire.

Adapté de l'université de la Sorbonne.
<http://www.chups.jussieu.fr>.

Introduction

3.2. Types histologiques du cancer du sein

En fonction de l'origine tissulaire tumorale, **différents types histologiques de cancers invasifs du sein** (fig 6 et 7) sont distinguables. Le carcinome canalaire invasif (IDC), encore appelé carcinome *Not Otherwise Specified* (NOS) dans la classification OMS 2012, est de loin le plus fréquent (70 à 80% des cas). Nous retrouvons ensuite le carcinome lobulaire invasif (ILC, 8 à 10% des cas) puis les formes mixtes (canalaire et lobulaire, 7%). Viennent enfin les formes rares ; cancers mucineux ou « colloïdes » (2,4%), tubulaires (1,5%), médullaires (1,2%), (micro)papillaires (1%), métaplasiques, cribriformes ou encore les carcinomes inflammatoires. **Cette classification impacte le comportement biologique des cancers** (prolifération, mode de dissémination,...) [56].

A côté des formes invasives, il convient de mentionner les **formes *in situ***. Le carcinome canalaire *in situ* (DCIS), ou carcinome intracanaire, représente jusqu'à 25% des néoplasies mammaires diagnostiquées aux USA et on y distingue les bas grades des hauts grades. La prévalence exacte du carcinome lobulaire *in situ* (LCIS) est moins établie en partie en raison de critères diagnostiques variant fortement d'une étude à l'autre : elle est cependant bien inférieure à celle du DCIS [58, 59]. Nous pouvons déjà mentionner que l'extension de DCIS accompagnant un carcinome invasif est un facteur pronostic important chez les patientes subissant une chirurgie conservatrice. Cette notion n'est pas valable pour le LCIS [60].

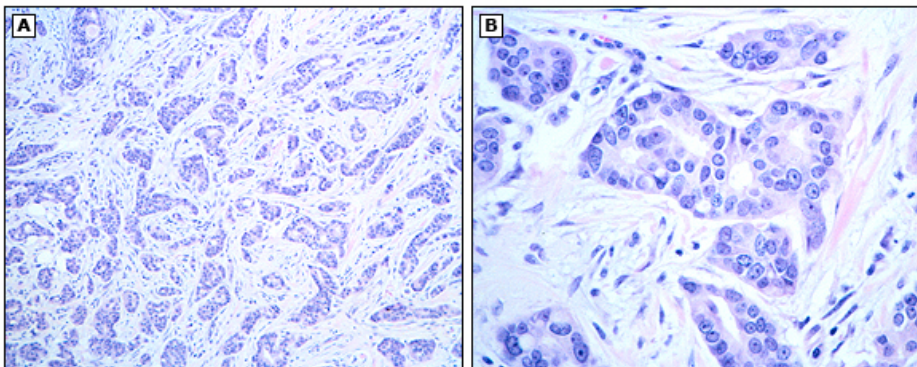


Fig 6 : Carcinome canalaire invasif (invasive ductal carcinoma, IDC) modérément différencié (grade II)
A : à faible grossissement, visualisation de cellules tumorales infiltrant le stroma en niche avec maintenance d'une différenciation glandulaire partielle.

B : à plus fort grossissement, visualisation d'un pléomorphisme nucléaire.
(Stuart Schnitt, MD, <https://www.uptodate.com>).

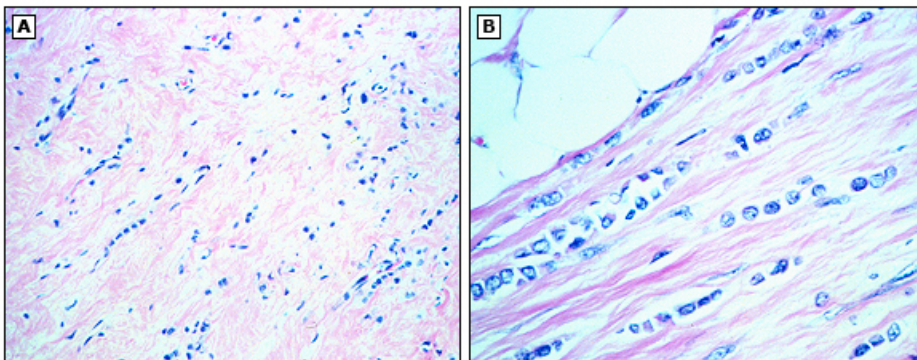


Fig 7: Carcinome lobulaire invasif (invasive lobular carcinoma, ILC)

A : à faible grossissement, visualisation de petites cellules tumorales infiltrant le stroma en solitaire ou en file indienne.

B : à plus fort grossissement, les cellules tumorales apparaissent petites et uniformes en apparence.
(Stuart Schnitt, MD, <https://www.uptodate.com>).

Introduction

3.3. Carcinogènèse

Il s'agit d'un processus continu de plusieurs étapes se déroulant sur des années, voire des décennies, où s'additionnent des altérations moléculaires conférant à certaines « cellules souches cancéreuses » un phénotype de plus en plus agressif. A partir d'un lobule mammaire normal, on peut observer la survenue de microcalcifications intracanales qui peuvent mener à une hyperplasie canalaire atypique. Celle-ci est le premier événement pathologique qu'il convient de distinguer d'autres hyperplasies bénignes ne menant pas à des processus malins ultérieurs. A la faveur de modifications génétiques et épigénétiques, on observe l'apparition d'une dysplasie et une évolution vers un DCIS qui peut par la suite devenir un carcinome invasif lorsque les cellules malignes passent la membrane basale (fig 8). S'il n'est pas certain que le DCIS est un précurseur requis avant l'apparition d'un cancer canalaire invasif, celui-ci est fréquemment accompagné de lésions adjacentes de DCIS au diagnostic. Pour le carcinome lobulaire, on peut également observer antérieurement l'apparition d'une hyperplasie lobulaire atypique puis d'un LCIS qui est considéré actuellement comme un facteur de risque de cancer invasif [56, 58].

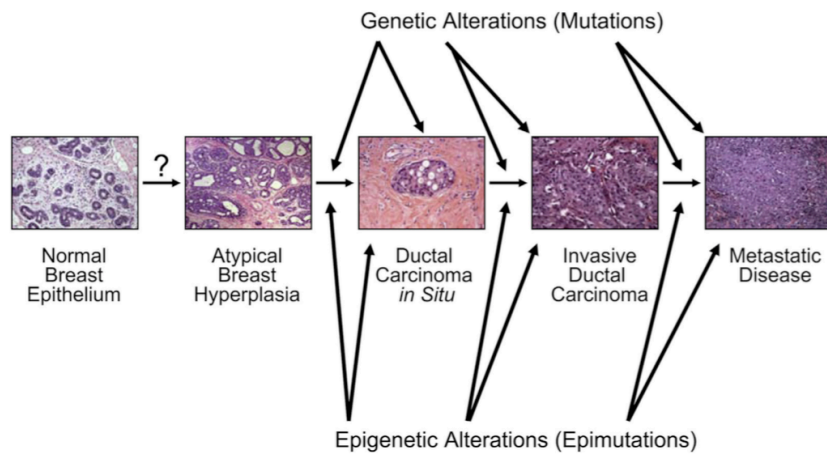


Fig 8 : Etapes de la carcinogènèse du cancer canalaire invasif. D'après Rivenbark et al., 2013 [58].

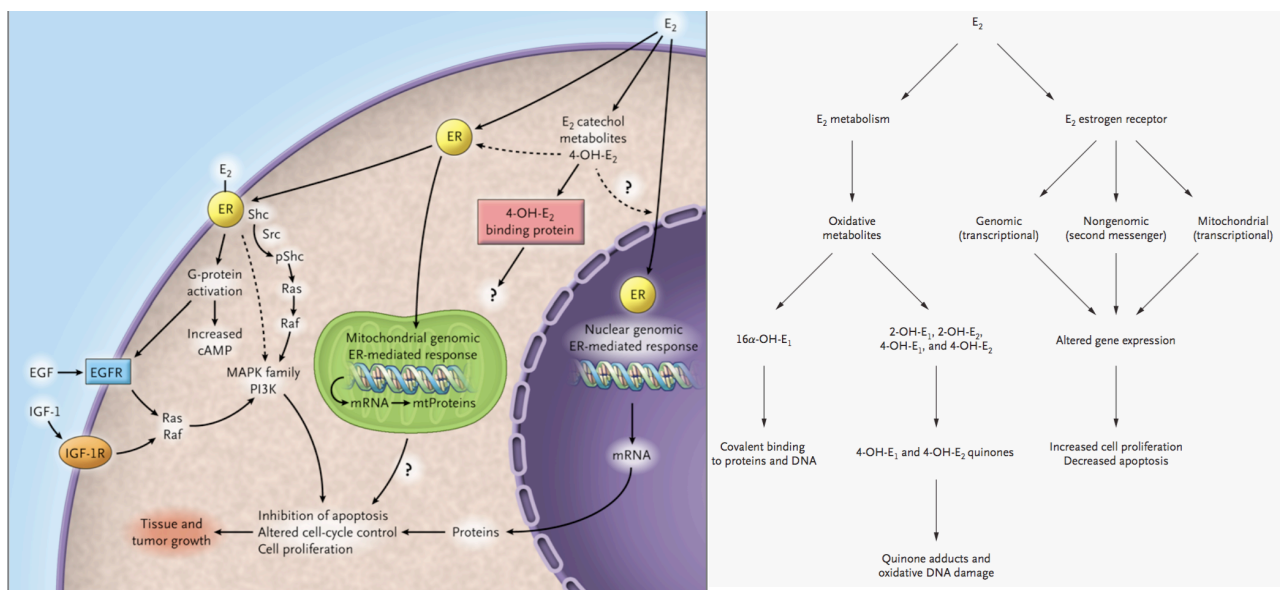


Fig 9 : Voies de la carcinogènèse imputables aux œstrogènes. D'après Yager et al., 2006 [25].

Introduction

A des taux élevés, les œstrogènes sont carcinogènes. En effet, la prolifération cellulaire et l'apoptose dans les tissus mammaires vont être modifiés sous l'effet (fig 9) [25] :

- de la **signalisation génomique nucléaire médiée par des récepteurs aux œstrogènes** ($ER\alpha$ et $ER\beta$). Après liaison d'un œstrogène au récepteur $ER\alpha$ du cytosol, le complexe formé migre dans le noyau, se dimérise, recrute des protéines co-régulatrices et lie les « éléments de réponse aux œstrogènes » dans les régions promotrices des gènes sensibles aux œstrogènes. Ceci entraîne la transcription de gènes exprimés en présence d'œstrogènes. Par ailleurs, des récepteurs $ER\beta$ ont également été retrouvés au niveau mitochondrial laissant suspecter l'existence d'une signalisation génomique mitochondriale. Une signalisation non génomique se fait également par l'intermédiaire de récepteurs $ER\alpha$ et $ER\beta$ présents au niveau de la membrane plasmique, permettant des échanges croisés avec d'autres voies de signalisations médiées par l'IGF-1R ou l'EGFR et l'HER2. Ces échanges pourraient majorer les résistances à l'hormonothérapie [61].
- de **métabolites oxydatifs** de type quinone de certains œstrogènes (ex : oestradiol) entraînent des lésions d'ADN par liaison avec les purines *in vitro* et *in vivo* sur rongeurs. Ces adduits de l'ADN causent des mutations cancérigènes. Ce rôle doit encore être validé dans le cancer mammaire humain. Néanmoins, il a déjà été montré que l'homozygotie pour l'allèle codant une forme de faible activité de la catéchol O-méthyltransférase, enzyme permettant de dégrader les métabolites avant formation de quinone, est significativement associée à un risque de cancer du sein chez l'humain.

Les caractéristiques du phénotype agressif acquises après mutations de protooncogènes (gain de fonction) et de gènes suppresseurs de tumeurs (perte de fonction) peuvent être résumées par les célèbres « Hallmarks » du cancer (fig 10) décrits par Hanahan et Weinberg en 2000 et revus en 2011 [62]. L'excès de **stimulation des voies de signalisation de la prolifération** cellulaire (1), **l'échappement aux signaux suppresseurs de croissance** (2), la **résistance à l'apoptose** (3) et l'acquisition d'un **potentiel répliatif illimité** (4) entraînent une prolifération cellulaire excessive qui mènent à **l'instabilité génique** (5) favorisant l'accumulation de mutations et l'acquisition de nouvelles propriétés pro-tumorales. Celles-ci sont aussi obtenues suite à la libération de **molécules bioactives par les cellules inflammatoires associées à la tumeur** (6). Face à cette croissance importante, les cellules cancéreuses libèrent des facteurs **angiogènes** (7) afin d'assurer un apport suffisant en nutriments et oxygène. En outre, les cellules tumorales privilégient la glycolyse au détriment de la respiration aérobie cellulaire même en condition de

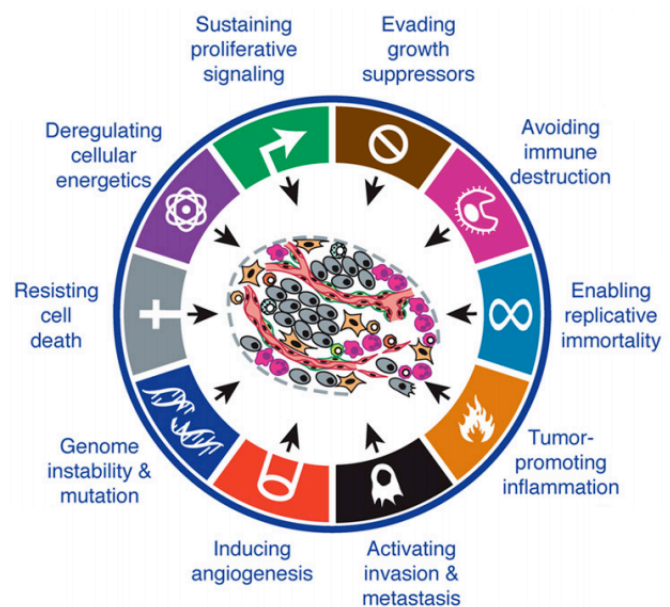


Fig 10 : Les Hallmarks du cancer. D'après Hanahan et Weinberg, 2011 [62].

Introduction

normoxie. Cette **dérégulation métabolique** s'appelle l'effet Warburg ; la glycolyse produit moins d'énergie mais le fait plus rapidement et ne nécessite pas d'oxygène. Les cellules tumorales acquièrent ensuite la **possibilité d'envahir les tissus avoisinants** (en franchissant la membrane basale) **et à distance** (par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques) (9). Tant au niveau du site primaire que dans la circulation ou à distance, seules les cellules cancéreuses **échappant au système immunitaire** (10) survivent et font croître la tumeur primaire ou forment des métastases.

4. Dépistage

La plupart des pays européens (dont la Belgique), organisent le dépistage gratuit par mammographie tous les deux ans pour les femmes entre 50 et 69 ans inclus (Mammotest®) [63]. Au vu de l'augmentation exponentielle de cas observés à partir de 40 ans, on pourrait s'étonner de la tranche d'âge couverte par ce programme. La décision, encore objet de controverses, est le fruit d'un compromis entre bénéfices et désavantages de ce dépistage. La finalité d'un dépistage est la détection des cancers à un stade précoce, chez un patient asymptomatique, assurant un accès plus rapide à des traitements locaux (si possible conservateurs) et systémiques et réduisant surtout la morbidité et la mortalité [64–66].

4.1. Le dépistage par mammographies (Mammotest®)

Le bénéfice est la réduction de la mortalité des cancers du sein. L'ampleur de celle-ci varie fortement suivant les méthodes épidémiologiques et statistiques retenues. Une méta-analyse britannique (2012) de 11 essais randomisés évalue, après un suivi de 13 ans, la réduction du risque de mortalité à 20% lorsqu'on applique le dépistage à intervalle régulier (de 12 à 33 mois) entre 50 et 70 ans avec un décès prévenu tous les 235 femmes dépistées [64]. Une méta-analyse (2015), menée par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) de 20 études cas-contrôles, estime cette réduction à 23 % quand on invite à réaliser une mammographie tous les 2 ans de 50 à 69 ans. Elle relevait également une moindre mortalité (non quantifiée) si on applique le programme à des patientes de 70 à 74 ans [65]. Enfin, une méta-analyse de la Cochrane indique une diminution de mortalité de 15% après 13 ans de suivi [67].

Malheureusement, ce dépistage est loin d'être dénué de **désavantages** :

- l'analyse du programme SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results), pour les femmes de plus de 40 ans aux USA entre 1975 et 2012, démontre une inversion du rapport de détection tumeurs larges (cancers invasifs $\geq 2\text{cm}$)/petites tumeurs (cancer invasif $< 2\text{cm}$ ou *in situ*) depuis l'introduction de la mammographie. Il est désormais de 32 /68 %. Elle a également entraîné une hausse importante de diagnostics ; l'augmentation absolue de détection de petites tumeurs ayant fortement surpassé la régression de détection des larges tumeurs (fig 11) [66]. La mammographie engendre donc un **sur-diagnostic** en objectivant des cancers de faible taille dont beaucoup n'étaient pas amenés à devenir cliniquement évidents et donc à menacer la vie. L'ampleur de ce sur-diagnostic varie fortement suivant la période de temps considérée dans les études ou encore suivant l'analyse statistique. Dans la méta-analyse britannique de 2012 elle est évaluée à 11% estimant que chaque décès évité s'accompagne d'un excès d'explorations et traitements invasifs chez 3 femmes. La méta-analyse de l'IARC l'évalue à 6,5% tandis que la méta-analyse de la Cochrane

Introduction

l'estime à 30% et retient que sur 2000 femmes dépistées pendant 10 ans, un décès sera évité au prix de 10 sur-diagnostic et sur-traitements [64–67].

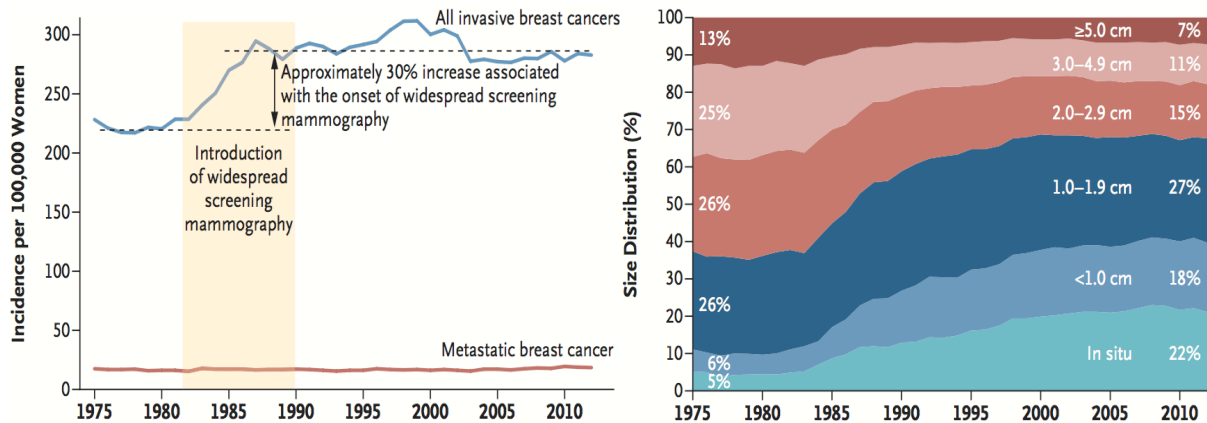


Fig 11 : G : Hausse de l'incidence des cancers du sein invasifs après introduction de la mammographie. D : Modification de la distribution des tailles de cancers du sein chez des femmes de > 40 ans entre 1975 et 2012. D'après Welch et al., 2016 [66].

- malgré le respect de critères d'exigence (dont la lecture par deux radiologues indépendants et expérimentés) [68], sa **puissance de discrimination du cancer est médiocre**. Utilisant une échelle de malignité sur 7 points, l'analyse prospective de Pisano et al. (2005) sur 42.760 patientes ayant subi une mammographie digitale ou numérique montre que, globalement, les deux modalités s'équivalent et que la discrimination reste faible. En présence de seins denses ou avant 50 ans, la mammographie digitale s'avère plus efficace (tab. 1) [69].

	Population globale		< 50 ans		Seins denses		Pré- et péri-ménopause	
	Digitale	Numérique	Digitale	Numérique	Digitale	Numérique	Digitale	Numérique
Area under the ROC curve	0,78 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,84 ± 0,03	0,69 ± 0,05	0,78 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,82 ± 0,03	0,67 ± 0,05
Sensibilité %	41	41	49	35	38	36	47	38
Spécificité %	98	98	97	98	97	97	97	98

Tab 1 : Puissance de discrimination des mammographies digitales et numériques. ROC= receiver operating characteristic. D'après Pisano et al., 2005 [69]

- elle génère des **faux positifs** générateurs d'anxiété (risque cumulatif de 20% après 10 mammographies entre 50 et 70 ans). Heureusement moins de 5% des cas faux positifs subiront une exploration invasive [65].
- elle **impacte faiblement l'incidence des cancers avancés** (atteinte ganglionnaire ou à distance), l'ayant réduite de 8% chez les femmes de > 40 ans du programme SEER [70].
- elle entraîne des **radiations ionisantes** : le risque cumulatif de décès sur cancers du sein imputables à ce dépistage est de 1 à 10 pour 100.000 femmes suivant l'âge de début, la fréquence et la durée du dépistage. Cela reste au moins 100 fois inférieur au nombre de décès qu'il prévient. Le risque est supérieur en cas de prédisposition génétique [65].

Au final, la moindre mortalité due aux cancers du sein semble bien plus liée à l'évolution des traitements systémiques qu'au dépistage (d'un facteur d'au moins 2/3). En effet, plusieurs arguments vont dans ce sens. Outre la faible réduction d'incidence des cas

Introduction

avancés, on observe une faible différence de réduction de mortalité entre différents pays réalisant à des degrés divers le dépistage en Europe et Amérique du nord. Par ailleurs, aux USA, la réduction de mortalité chez les femmes jeunes ne subissant pas de dépistage est plus importante que celle de la population dépistée. Enfin, la plupart des cancers dépourvus de dépistage ont également vu leur mortalité se réduire depuis 1970 [66, 70, 71].

4.2. Autres modalités de dépistage

- L'examen clinique et l'auto-palpation sans mammographie sont insuffisants [65].
- **L'échographie** ne rencontre actuellement aucun consensus. Pour l'IARC, son emploi en cas de sein dense, lorsque la mammographie est négative, n'améliore pas la survie. Les données sont limitées quant à sa capacité à majorer la détection de cancers. Elle augmente en revanche les faux positifs [63, 65].
- La **mammographie avec tomosynthèse** (3 dimensions) améliore la détection des cancers tant invasifs qu'*in situ* mais au prix d'une plus grande irradiation. Elle pourrait réduire les faux-positifs mais n'a pas d'impact sur la mortalité du cancer du sein [65].
- **Ajouter une IRM à la mammographie pour les cas à haut risque** : l'IARC ne conclut pas à une réduction de mortalité du cancer du sein chez les femmes porteuses de mutation BRCA 1/2 (sensibilité supérieure mais moindre spécificité du dépistage). De même, on ne retient pas de hausse de détection de cancers chez des patientes avec LCIS ou prolifération atypique. En revanche, la société européenne d'oncologie médicale (ESMO) stipule que chez les femmes ayant une histoire familiale de cancer du sein (avec ou sans mutation BRCA), l'ajout de l'IRM permet de détecter des cancers à un stade plus précoce (réduction de 70% du risque d'avoir un stade II ou plus). Elle recommande (niveau III, A) de réaliser une mammographie annuelle avec une IRM simultanément en commençant à un âge qui est de 10 ans inférieur à celui du cas le plus jeune dans la famille. Cependant elle reconnaît que l'impact sur la mortalité n'est pas encore connu [63, 65].
- **Aucun marqueur sanguin n'est actuellement validé**. Le CA 15.3 (*Carbohydrate Antigen 15.3, partie soluble d'une glycoprotéine membranaire surexprimée par les cellules cancéreuses mammaires*) est souvent employé après diagnostic pour suivre l'efficacité d'un traitement ou détecter une rechute. Vu l'absence de démonstration de gain de survie de ce dosage, l'ESMO ne le recommande pas y compris à cet égard [63].
- De nouvelles techniques de dépistage/diagnostic (mammographie 3D, échographie 3D, élastographie « shear wave », mammographie rehaussée de contraste ou spectrale) sont encore en cours d'évaluation. Si elles s'avéraient efficaces, elles seront probablement plutôt destinées aux patientes aux seins denses (et donc plus souvent chez des femmes jeunes) [63].

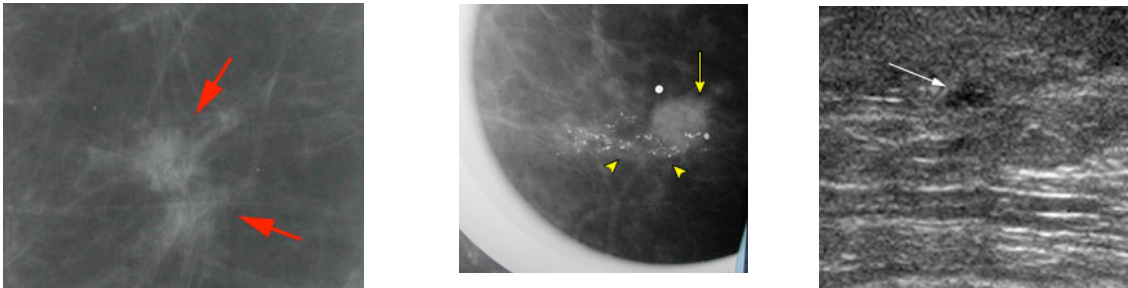
Introduction

5. Du diagnostic, à la caractérisation (immuno-)histologique et moléculaire

5.1. Découverte de la maladie

Le dépistage par **mammographie** mène désormais à la grande majorité des diagnostics [72]. Schématiquement, elle met en lumière deux grands types de lésions suspectes [73] :

- les **masses au niveau du tissu mou** (fig 12). On peut notamment différencier des lésions spiculées (cancer invasif dans > 90 % des cas) d'une lésion ovale circonscrite (cancer dans < 2% des cas).
- les **microcalcifications** de 0,1 à 1 mm, en groupe 4 à 5 lésions/mm³ (fig 13), présentes dans 60% des cas diagnostiqués par mammographie. Elles sont le seul élément tangent d'un cancer invasif dans 20% des cas et correspondent à des calcifications intracanalaires de zones nécrotiques ou se retrouvent en cas de cancer sécrétant de la mucine (ex : IDC de type cribriforme ou micropapillaire). L'organisation linéaire des calcifications est beaucoup plus suspecte qu'une organisation plus ronde ou plus grossière.



G : Fig 12 : 2 masses spiculées adjacentes interconnectées. Aspect caractéristique d'un carcinome tubulaire confirmé par la biopsie. (Lisa E Esserman, MD, <https://www.uptodate.com>).

Centre : Fig 13 : masse de haute densité spiculée (flèche) avec des calcifications hétérogènes linéaires (tête de flèche). Aspect évocateur de DCIS confirmé par biopsie. (Lisa E Esserman, MD, <https://www.uptodate.com>).

D : Fig 14 : Lésion hypoéchogène (flèche) correspondant à un processus cancéreux. (Pierre J Sasson, MD <https://www.uptodate.com>).

Le collège américain de radiologie (ACR) a établi la classification BI-RADS (Breast Imaging-Reporting And Data System) qui, en fonction de l'aspect de ces 2 types de lésions, donne une probabilité de cancer et oriente la prise en charge (tab 2)[74].

Catégorie	Probabilité de cancer (%)	Prise en charge
0 : données incomplètes :	/	nécessité de nouvelle mammographie ou de comparaison à une antérieure
1 : négatif	0	Poursuite du dépistage classique
2 : bénin	0	
3 : probablement bénin	> 0 mais ≤ 2	Suivi à 6 mois ou poursuite du dépistage
4 : suspect 4a : faible suspicion 4b : suspicion modérée 4c : suspicion élevée	> 2 mais < 95 > 2 mais ≤ 10 > 10 mais ≤ 50 > 50 mais < 95	Biopsie requise
5 : Très suggestif de malignité	≥ 95	
6 : malignité (prouvée par biopsie)	/	Excision chirurgicale selon bilan d'extension

Tab 2 : Classification BI-RADS. D'après D'Orsi CJ et al, 2013 [74].

Introduction

L'échographie peut aider au diagnostic en montrant, en cas de cancer, une lésion spiculée hypoéchogène et accompagnée de calcifications (fig 14) [75].

A côté du dépistage, dans les cas où les cancers sont « occultes » à la mammographie (15% des cas, souvent sur sein dense) la **palpation d'une masse indurée**, non mobilisable, en est en général le signe révélateur. Ceci peut survenir lorsqu'il s'agit de cancers d'intervalle apparaissant entre deux mammographies consécutives (30% des cas) [72]. Certains cas sont révélés par un **écoulement** qui sera très suspect s'il devient sanguinolent. Des **modifications cutanées du sein** (peau orange, fossette, ulcère, érythème, voire même mastite inflammatoire carcinomateuse) sont également le plus souvent le témoin d'une maladie avancée.

5.2. Confirmation du diagnostic, évaluation du type histologique et du grade

Toute lésion suspecte doit être prouvée bénigne [63]. Une biopsie est réalisée à l'aiguille fine (FNA : « fine needle aspiration ») ou creuse (« core needle biopsy »). Le pathologiste confirme la nature cancéreuse de la lésion, atteste de son caractère *in situ* ou invasif, donne sa nature histologique et son « grade histopronostique », témoin du degré de différenciation et d'agressivité. Le grade de **Scarff-Bloom et Richardson modifié par Ellis et Elston**, et adopté

Caractère histologique	Score
A : Formation de tubules	
• > 75% de la tumeur	1
• 10-75% de la tumeur	2
• < 10% de la tumeur	3
B : Pléiomorphisme nucléaire *	
• cellules petites, uniformes	1
• modification modérée de taille/forme	2
• irrégularités marquées	3
C : Activité mitotique **	
• faible	1
• modérée	2
• élevée	3

dans les critères de Nottingham, est le plus répandu et se fonde sur trois critères histologiques pour établir un score et donner un grade de I à III (tab 3) (fig 15) [76]. La détermination du grade est opérateur-dépendante. Par ailleurs, le grade 2 correspond probablement à un mélange de zones de haut et bas grade et sa valeur pronostique est donc difficilement évaluable [77]. Enfin, le pathologiste indique la présence éventuelle d'une **invasion lymphovasculaire péri-tumorale** [63].

Tab 3 : Grades histopronostiques. D'après Elston et Ellis, 1991 [76].

* les nucléoles reflètent la condensation de chromatine.

** à ajuster selon le champ microscopique.

Grade I : score 3-5 : bien différencié
→ Pronostic favorable

Grade II : score 6-7 : modérément différencié
→ Pronostic intermédiaire

Grade III : score 8-9 : faiblement différencié
→ Pronostic défavorable

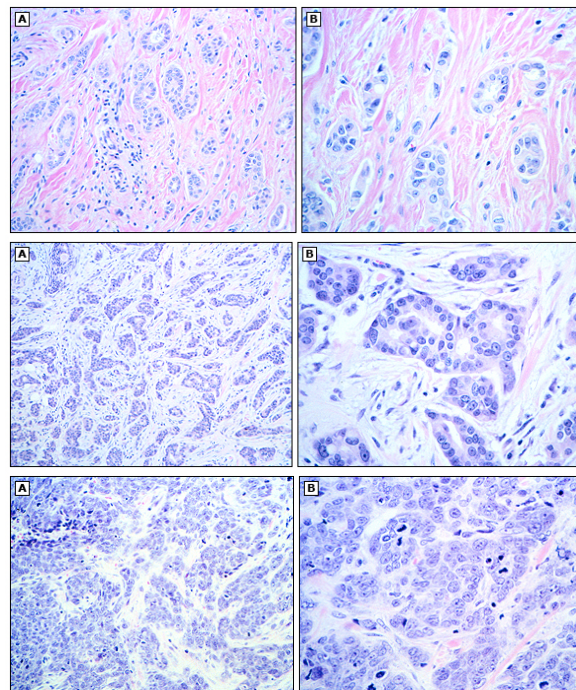


Fig 15 : Grade I (panels supérieurs), Grade II (panels médians) et Grade III (panels inférieurs) avec pour chaque Grade une vue à faible grossissement (A) et grossissement élevé (B). (Stuart Schnitt, MD, <https://www.uptodate.com>)

Introduction

5.3. Analyses complémentaires : le recours aux immunohistochimies

Le cancer du sein est très hétérogène et correspond à un ensemble de maladies malignes différenciables par leur expression génique distincte d'un sous-groupe à l'autre. Cette distinction a un impact sur le comportement biologique de la tumeur et donc sur son pronostic ainsi que son traitement. La biopsie mammaire permet, par le recours à des techniques d'immunohistochimie (IHC), de mentionner l'absence ou la présence de certains biomarqueurs au sein de la tumeur :

- les **récepteurs aux œstrogènes (ER α et ER β) et à la progestérone (PR-A et PR-B)** : situés dans le cytosol, les récepteurs hormonaux sont liés par un ligand hormonal liposoluble permettant le démasquage d'un site de liaison à l'ADN sur le récepteur. Le complexe ligand-récepteur migre alors dans le noyau, se dimérise et se lie aux « éléments de réponse aux hormones », dans la région régulatrice (promotrice) des gènes responsables des actions physiologiques des œstrogènes et/ou de la progestérone. Leur positivité permet d'envisager une hormonothérapie. Le pathologiste doit alors estimer le pourcentage de cellules tumorales positives pour ces récepteurs ainsi que le degré d'intensité de marquage (score de 1 à 3). La société américaine d'oncologie (ASCO) et le collège des pathologistes américains (CAP) ont édités des « guidelines » de bonne préparation des tissus, réalisation et lecture des IHC afin de réduire la variabilité d'un centre à l'autre. Actuellement, le marquage doit être présent dans plus de 1% des cellules tumorales pour considérer que la tumeur est positive pour les récepteurs hormonaux [78]. Les techniques récentes de mesure de mRNA (northern blot et RT-PCR) ou les analyses géniques semblent efficaces mais ne sont pas encore recommandées pour remplacer l'IHC [79, 80].
- le **récepteur HER2 (HER2/neu ou ERBB2)** : cette glycoprotéine appartient à la famille des récepteurs membranaires au facteur de croissance épidermique (EGF), fondamentaux dans l'activation d'un signal de transduction contrôlant la croissance cellulaire épithéliale et la différenciation. Si le récepteur est présent sur une cellule normale, **l'amplification du gène HER2 et la surexpression sont en revanche pathologiques** avec excès de la prolifération cellulaire. Des thérapies dirigées contre HER2 peuvent alors être employées. L'amplification du gène peut être observée par hybridation *in situ* tandis que la surexpression membranaire de la protéine est objectivée par IHC. A nouveau, l'ASCO et la CAP ont émis des « guidelines » quant à la détermination du statut HER2 d'une tumeur. L'algorithme actuellement recommandé est ainsi présenté ci-dessous (fig 16). En premier lieu, un score de marquage à l'IHC allant de 1 à 3 est déterminé. Comme la concordance entre l'IHC et l'hybridation *in situ* est de 95% pour les scores IHC de 0, 1 ou 3+, l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) ou chromogénique est effectuée uniquement quand le score à l'IHC est de 2. Le nombre de spots correspondant au nombre de copies du gène HER2 est alors défini en parallèle à l'évaluation du nombre de centromères du chromosome 17 (CEP17). Les cas avec un score de 3+ à l'IHC ou avec 6 copies du gène ou un ratio HER2/CEP17 ≥ 2 sont ainsi retenus comme surexprimant l'HER2 [81].

Introduction

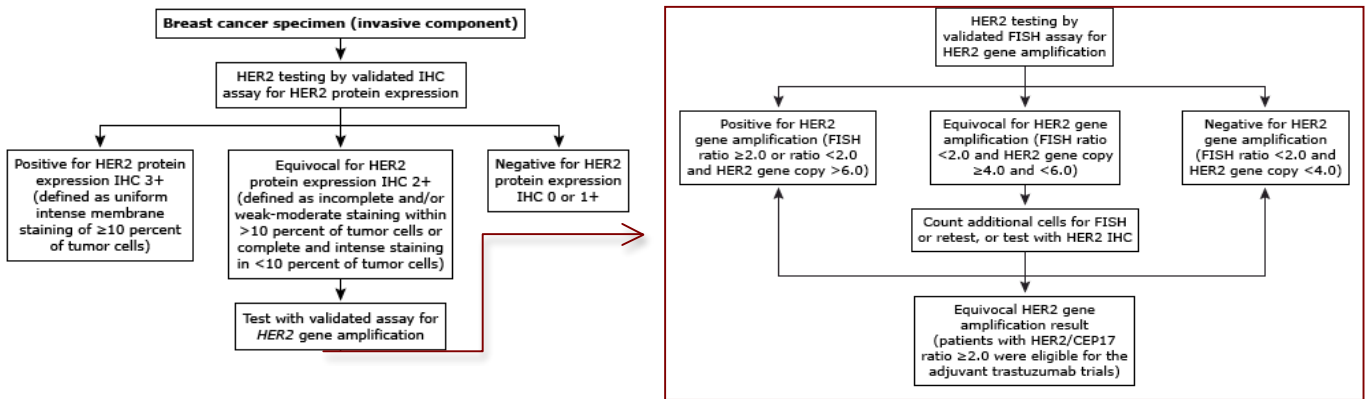


Fig 16 : Recommandations pour l'évaluation de la surexpression d'HER2. D'après Wolff et al, 2013 [81].

Les cancers du sein peuvent ainsi être caractérisés en différents sous-types à l'IHC en fonction de leur expression des 3 biomarqueurs et de multiples études en ont établi la proportion. Par exemple, Parise et al. ont montré que parmi 61.309 cas diagnostiqués entre 1999 et 2004 [82] :

- 80% étaient positifs pour les récepteurs hormonaux.
- 23% surexprimaient l'HER2 (dont 67% étaient positifs pour ER/PR).
- 13% des cas étaient négatifs pour les 3 biomarqueurs et sont donc appelés « triple-négatifs » (TNBC pour « Triple Negative Breast Cancer »).

Globalement, à travers les nombreuses études, la surexpression de HER2 et le sous-type TNBC sont tous deux retrouvés dans 15% à 20% de cas. La fréquence des sous-type varie selon l'origine ethnique des patientes. Ainsi, dans l'étude « Carolina Breast Cancer Study », la proportion de TNBC était supérieure chez les patientes afro-américaines en comparaison aux patientes de couleur de peau blanche (22% vs 11%) [83].

Enfin, on recherche également par IHC le pourcentage de présence du **marqueur de prolifération Ki67** qui est exprimé par les cellules en cycle (en phases G1, G2, S et M). Il est évalué en tenant compte des valeurs moyennes de son propre centre et on l'indique ainsi comme élevé ou bas en suivant le plus fidèlement possible les recommandations internationales (grandes difficultés de standardisation de son interprétation) [84].

5.4. La classification moléculaire et son lien avec la classification immunohistologique

L'essor de la génomique (étude de l'ADN) a permis l'analyse simultanée de l'expression de milliers de gènes par la cellule cancéreuse. En 2001, une classification moléculaire des cancers du sein fut proposée par Charles Perou et Therese Sørlie sur base de l'analyse des microarray d'ADN complémentaire (cDNA). Elle est basée sur différents « clusters » de gènes liés à l'expression des récepteurs aux œstrogènes, à l'expression de l'HER2, à la prolifération et à un « cluster » unique référencé comme le « cluster basal » (fig 17). Elle comportait alors **5 sous-types intrinsèques principaux** : « Luminal A », « Luminal B », « Basal-like », « HER2/ERBB2+ » et « Normal-Like » [85, 86]. Il s'agit donc d'une classification distincte de celle réalisable par IHC.

Introduction

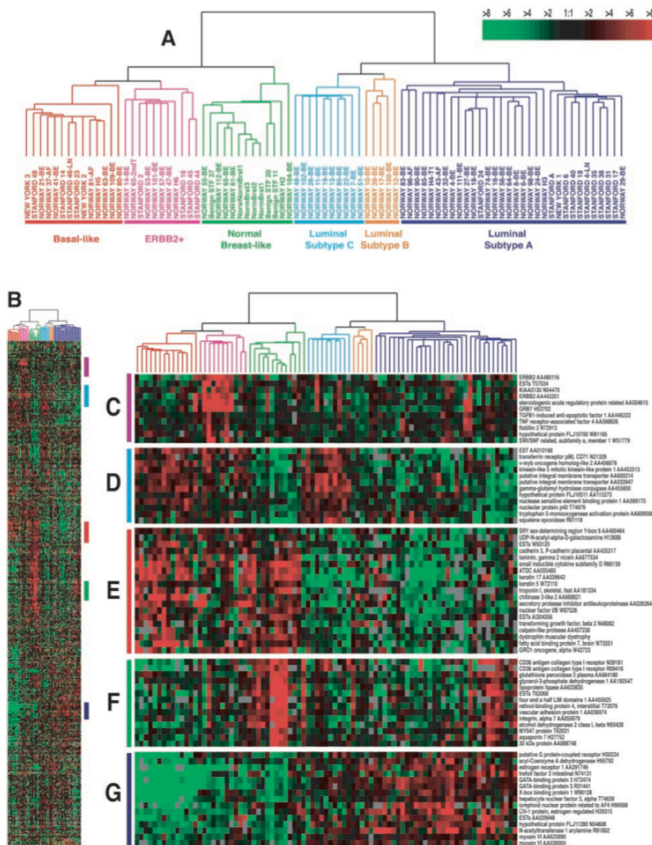


Fig 17 :
A : 5 sous-types moléculaires définis par l'emploi de 476 cDNA (6 si on tient compte d'un luminal C).

B : Diagramme complet.

C-G : Zoom sur différents cluster de gènes avec :

- * C=cluster ERBB2,
- * D= Cluster de signification encore indéterminée, * E=Cluster basal
- * F=Cluster « normal breast-like »,
- * G= cluster luminal

D'après Sørlie et al., 2001 [86].

Celle-ci est plus aisée à comprendre en se rappelant l'histologie du sein et les 2 constituants de l'épithélium des lobules et des canaux que différenciables par IHC :

- Les cellules luminales marquées par des anticorps dirigés contre les cytokératines 8 et 18.
- Les cellules basales myoépithéliales marquées par des anticorps ciblant les cytokératines 5,6 et 17.
- Le tissu de soutien fait de cellules non-épithéliales fibreuses ou d'adipocytes.

Ainsi, certains gènes étaient exprimés par l'un des deux types cellulaires mais pas par l'autre et vice-versa. Le « cluster » d'expression génique caractéristique des cellules basales incluait les cytokératines 5 et 17, l'intégrine $\beta 4$ et la laminine, tandis que celui des cellules luminales comprenait les facteurs de transcription des récepteurs aux œstrogènes [85].

Dès lors, on comprend que les sous-types intrinsèques ont d'abord été schématiquement divisés en 2 groupes selon l'expression de gènes liés aux récepteurs hormonaux, et que ceci corroborait l'impression clinique de la communauté scientifique que les cancers ER-positifs et ER-négatifs dérivait de cellules différentes. On pouvait ensuite analyser l'expression d'HER2 [86]. Ces sous-types sont associés à des comportements biologiques distincts, soulignant à nouveau le caractère hétérogène de la pathologie cancéreuse mammaire [87].

Le terme « luminal » des sous-types de tumeurs Luminal A et B a donc été choisi en raison de la similarité du profil d'expression de gènes entre les tumeurs et les cellules épithéliales luminales d'un tissu mammaire normal. **Ainsi, les sous-types Luminal A et B expriment les**

Introduction

cytokératines 8 et 18. Ils sont de loin les sous-types majoritaires, comprennent la grande majorité des cancers ER-positifs et sont **caractérisés par l'expression positive en ER et PR.**

Ces 2 sous-types sont distinguables au niveau moléculaire [86, 87] :

- les **tumeurs « Luminal A »** ont une haute expression des gènes liés aux ER et une faible expression des gènes du cluster HER2 et des gènes liés à la prolifération.
- les **tumeurs « Luminal B »** expriment plus faiblement les gènes liés aux ER, ont une expression variable des gènes du « cluster HER2 » et une plus haute expression des gènes du « cluster de prolifération ».

Les autres sous-types moléculaires intrinsèques expriment tous faiblement les gènes liés aux ER et les marqueurs de type luminal. Il s'agit [86, 87] :

- des **tumeurs « Basal-like »** dont le nom se réfère à la similarité de leur profil d'expression de gènes avec celui des cellules épithéliales basales (myoépithéliales) du sein normal puisqu'elles expriment les cytokératines 5, 6 et 17. Elles ont par ailleurs une faible expression des gènes du « cluster HER2 » et sont donc négatives pour les 3 biomarqueurs ER, PR et HER2. La plupart, mais pas la totalité (discordance pouvant aller jusqu'à 30%) des tumeurs basal-like sont donc des TNBC et inversement.
- des **tumeurs « HER2-enriched »** qui se caractérisent en outre par une haute expression des gènes du « cluster HER2 » et du « cluster de prolifération » et une faible expression du « cluster basal ». Elles ne sont pas totalement synonymes des tumeurs cliniquement reconnues comme HER2 et 30% d'entre elles seront ainsi cliniquement HER2-négatives.
- des **tumeurs « Normal-like »** exprimant des gènes des tissus non-épithéliaux et adipeux.
- des **tumeurs « Claudin-low »**, définies en 2007, présentent des caractéristiques mésenchymateuses. En effet, elles expriment faiblement les claudines 3, 4, 7 (protéines des jonctions serrées), le CD24 (marqueur épithélial) l'E-Cadhérine (glycoprotéine d'adhésion intercellulaire calcium-dépendante) et sont enrichies pour les marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (N-Cadhérine, vimentine, CD44), des gènes des réponses immunes (ex : CD4). Elles acquièrent des propriétés de cellules souches cancéreuses (CD44+CD24-/low) ce qui est le cas lors de l'EMT d'une tumeur [88].
- des **tumeurs Interferon-Rich**, identifiées en 2007, qui expriment fortement des gènes d'un « cluster » de réponse immunitaire (dont 14 gènes liées à des fonctions d'interferon). La plupart sont à l'IHC des TNBC de relativement bon pronostic [89].

Si la caractérisation moléculaire se distingue de la classification réalisable par IHC, de nombreux auteurs ont établi des liens entre les 2. Ainsi, Aleix Prat et al. (avec comme dernier auteur à nouveau Charles Perou) montrèrent par exemple en 2007 qu'à travers 3 banques de données, les tumeurs « Claudin-low » représentaient 7 à 17% de tous les cancers du sein et étaient principalement des TNBC à l'IHC (61 à 71%). Inversement, la majorité des TNBC à l'IHC étaient des tumeurs de sous-type moléculaire « Basal-like » (39 à 54%) ou « Claudin-low » (25 à 39%) mais un certain nombre de cas étaient des sous-types « HER2-enriched » (7 à 14%), « Luminal B » (4 à 7%), « Luminal A » (4 à 5%) et « Normal-like » (1%) [88].

Il est donc désormais acté que le cancer du sein doit être considéré comme un conglomérat d'au moins 4 à 5 sous-types intrinsèques selon l'expression génique (Luminal A, Luminal B, Her2-enriched, Basal-Like et Claudin-low). Cependant, comme le profiling des tumeurs n'est

Introduction

pas encore largement réalisé en pratique quotidienne (en partie pour des raisons économiques et pratiques), la classification proposée par Perou et Sørlie a été corrélée aux connaissances cliniques et histologiques en vigueur et prise en compte lors du consensus de Saint Gallen à partir de l'édition 2011 (tab 4) [90]. Elle est désormais reconnue par l'ESMO. En 2012, le TCGA (The Cancer Genome Atlas network) a en outre déterminé la prévalence des différents sous-types moléculaires parmi 507 cancers du sein (résultats inclus dans le Tab 4) [91]. Il convient de mentionner que le séquençage total des tumeurs amènera à peaufiner cette classification. Par ailleurs, l'analyse moléculaire des cancers du sein pourrait être encore enrichie des découvertes réalisées dans les domaines de l'épigénétique, de la transcriptomique, de la protéomique et de la métabolomique.

Sous-type moléculaire et prévalence selon le TCGA	Correspondance clinico-pathologique (basée sur l'IHC)	Remarques
Luminal A → 44 %	Luminal A-like ER+, HER2-, PR élevé, Ki 67 bas	Le Ki67 doit être interprété en considérant les valeurs du laboratoire (ainsi si la valeur moyenne de Ki67 est de 20%, 30% est une valeur à considérer élevée et 10% est à considérer comme basse). Le cut-off suggéré pour PR est de 20%.
Luminal B → 24 %	<ul style="list-style-type: none"> • Luminal B-like HER2-négatif <ul style="list-style-type: none"> ○ ER+, HER2- et PR bas ou Ki67 élevé ○ Signature de haut risque moléculaire (si disponible) • Luminal B-like HER2-positif <ul style="list-style-type: none"> ○ ER+, HER2+, peu importe PR et Ki67 	
HER2 + → 11%	HER2-Positive (non luminal) HER2+, ER- et PR-	
Basal-like → 19%	Triple-négatif (canaulaire) ER-,PR-, HER2-	Chevauchement de 80% entre la clinique-IHC de TNBC et le sous-type basal-like.

Tab 4 : Corrélation entre le sous-type moléculaire et les données clinicopathologiques. D'après Senkus et al, 2015 [63] et Goldhirsch et al, 2011 [90] en incluant les données de prévalence du TCGA 2012 [91].

Introduction

6. Stadification

6.1. Bilan à réaliser devant un cancer à priori localisé (Guidelines de l'ESMO) (tab 5) [63]

Evaluation	Anamnèse et Examens
- de l'état de santé général	- Histoire personnelle de maladies, de cancer et familiale de cancers (sein, ovaire) - Statut ménopausique : fondamental ! Si doute : dosage sérique d'E2 et FSH - Examen clinique général - Biologie : * hémogramme, * fonction rénale * fonction hépatique * cardiaque (NT-proBNP) si emploi envisagé de trastuzumab ou d'anthracyclines, * marqueurs osseux (calcium, phosphatase alcaline) - Echographie cardiaque transthoracique ou scanner multi-coupes si emploi envisagé de trastuzumab ou d'anthracyclines : évaluation de la FEVG
- de la tumeur primaire	- Histoire de la maladie (rapidité d'apparition/évolution) - Palpation bimanuelle en évaluant la taille - Mammographie bilatérale - Echographie mammaire - IRM mammaire uniquement dans des cas précis (vide infra) - Biopsie : l'idéal est une « core biopsy » sous échographie ou guidage stéréotaxique. Si cela n'est pas possible, il faut au moins faire une FNA ➔ caractère <i>in situ</i> /invasif, histologie, grade, biomarqueurs (ER, PgR, HER2, Ki67)
- des aires ganglionnaires régionales	- Palpation bimanuelle (aire axillaire est le premier relais le plus fréquent) - Echographie ➔ si suspicion d'atteinte : au moins une biopsie par FNA écho-guidée
- du potentiel métastatique	- anamnèse : douleurs osseuses ?, signes neurologiques ?, statut respiratoire ? - Examen clinique hépatique (hépatomégalie, lésion dure), pulmonaire, osseux. - Examen neurologique uniquement si symptômes (céphalée inhabituelle,...)

Tab 5 : Bilan à réaliser devant un cancer à priori localisé. Adapté de Senkus et al, 2015 [63]. (E2=Œstradiol, FSH=Follicule-Stimulating Hormone, FEVG=fraction d'éjection du ventricule gauche, ER : récepteurs aux estrogènes, PgR= Récepteurs à la progestérone, HER2 = Human Epidermal Growth Factor Receptor-2).

6.2. Stades

Le stade est évalué en se référant au système de classification TNM (Tumor, Nodes, Metastases) de l'AJCC-UICC (the American Joint Committee on Cancer et l'Union Internationale Contre le Cancer). Jusqu'à la 7^{ème} édition, la stadification était ainsi uniquement réalisée sur les critères anatomiques du TNM. La 8^{ème} édition, effective au 1^{er} janvier 2018 ajoute les biomarqueurs à l'IHC (ER, PR, HER2) et le grade pour émettre désormais 3 stadifications comprenant un stade anatomique et deux stades pronostiques :

Introduction

- **le stade pronostique clinique** : applicable à toutes les patientes avant tout traitement et requérant une évaluation clinique et iconographique ainsi qu'une biopsie pour réaliser les IHC et l'évaluation du grade.
- **le stade pronostique pathologique** : applicable à toutes les patientes après une résection chirurgicale comme premier traitement et requiert également un rapport pathologique (IHC et grade) [92].

Dans le TNM anatomique, on distingue :

- Le cTNM : stade clinique avant opération.
- Le pTNM : stade pathologique après l'opération.
- L'ypTNM : stade pathologique après une opération successive à une chimiothérapie néoadjuvante.

Le remplacement de la stadification anatomique par une stadification pronostique pathologique sur une large cohorte de patientes (>300.000) conduit à un changement de stade chez près de 40% des patientes. Ces stadifications pronostiques doivent être privilégiées quand elles sont réalisables [92].

6.3. Evaluation de la taille de la tumeur primaire (T), du statut ganglionnaire (N) et métastatique (M)

Outre l'évaluation clinique, il convient de réaliser une mammographie bilatérale ainsi qu'une échographie des seins et des aires ganglionnaires régionales (la seule palpation clinique des aires ganglionnaires a une très faible valeur prédictive négative de l'ordre de 50-60%) (tab 5).

L'IRM du sein , non recommandée initialement en routine, est à considérer en cas [63]:

- d'histoire familiale de cancer du sein avec mutation *BRCA* / dépistage chez une femme porteuse de la mutation.
- de patiente porteuse d'implants mammaires.
- d'ILC ou de suspicion de multifocalité/multicentricité (surtout quand le cancer est lobulaire).
- de discordance entre examen clinique et imagerie conventionnelle ou absence de conclusion franche (ex : atteinte ganglionnaire avec une tumeur mammaire primaire occulte).
- chimiothérapie néoadjuvante ou pour évaluer la réponse à une première thérapie systémique.

La plupart des patientes se présentant avec un cancer du sein ont une maladie confinée au sein (stade I ou II) avec atteinte ganglionnaire absente ou limitée (moins que 3 ganglions touchés). Les métastases à distance asymptomatiques sont alors très rares et il n'y a pas lieu, en l'absence de symptômes, de doser les marqueurs tumoraux ou de faire un staging radiologique. Une biologie assez générale avant toute chirurgie ou thérapie systémique est réalisée[63].

En revanche, on peut réaliser un bilan par **scanner injecté thoraco-abdomino-pelvien** (ou scanner thoracique et échographie abdominale) et une **scintigraphie osseuse** [63] :

Introduction

- en cas de grosse tumeur primaire (ex : $\geq 5\text{cm}$), biologie agressive (LDH élevés).
- en cas d'atteinte ganglionnaire évidente avant même le recours à l'échographie.
- devant des plaintes ou signes cliniques suggestifs d'une atteinte osseuse, pulmonaire, abdominale et bien plus rarement neurologique.

Le PET/CT corps entier (Positron Emission Tomography-Computed Tomography) ne doit pas être effectué pour une maladie loco-régionale au vu de sa faible sensibilité (60%) en comparaison à la technique du ganglion sentinelle suivie d'un éventuel curage axillaire [93]. Il peut cependant remplacer un staging par imagerie conventionnelle pour des patientes à haut risque candidates pour une chimiothérapie néoadjuvante ou en cas de maladie localement avancée ou inflammatoire en raison d'un haut risque de dissémination métastatique [63].

6.4. TNM 8^{ème} édition (AJCC-UICC 2017) (tab 6) [94]

Tumeur primaire (si tumeurs multiples, évaluer la plus grande et ajouter suffixe « m » au T)	
Tx	La tumeur primaire n'est pas évaluable
T0	Pas d'évidence de tumeur primaire
Tis	Carcinome <i>in situ</i> (remarque : le LCIS est désormais considéré comme un facteur de risque de développer ultérieurement un cancer du sein) Tis (DCIS) Carcinome canalaire <i>in situ</i> Tis (Paget) Maladie de Paget du mamelon sans carcinome invasif/DCIS du parenchyme mammaire. (un carcinome du parenchyme avec maladie de Paget associée est caractérisé selon sa taille mais il convient de mentionner la présence de la maladie de Paget)
T1	Tumeur ≤ 20 mm dans sa plus grande dimension T1mi : Tumeur $\leq 1\text{mm}$, T1a : $1\text{mm} < T \leq 5\text{mm}$, T1b : $5\text{mm} < T \leq 10\text{mm}$, T1c : $10\text{mm} < T \leq 20\text{mm}$
T2	$20\text{mm} < \text{Tumeur} \leq 50$ mm dans sa plus grande dimension
T3	Tumeur > 50 mm dans sa plus grande dimension
T4	Extension tumorale à la paroi thoracique/peau (ulcération ou nodules macroscopiques) et ce peu importe la taille de la tumeur (l'invasion du seul derme n'est pas un T4) T4a : extension à la paroi (l'invasion/adhérence du seul muscle pectoral ne compte pas) T4b : ulcération et/ou nodules satellites ipsilatéraux et/ou œdème (incluant la peau d'orange) cutané T4c : T4a+T4b T4d : carcinome inflammatoire : modifications cutanées impliquant au moins 1/3 de la peau du sein.
Ganglions régionaux (axillaires dont les intramammaires ipsilatéraux, mammaires internes, supraclaviculaires) Il existe une classification clinique cN et une pathologique pN. Une atteinte d'autres aires ganglionnaires (ex : cervicale, axillaire controlatérale doit être considérée comme une atteinte à distance (M1) * Micrométastases : amas cellulaires ≤ 2 mm, métastases : au moins un amas cellulaire $> 2\text{mm}$ ** Les suffixes (sn) et (f) devraient être ajoutés au N lorsqu'une confirmation est faite par biopsie du ganglion sentinelle ou par biopsie FNA/core needle sans résection ultérieure de ganglions	
pNX	Aires régionales non évaluables (préalablement rééquées ou pas d'évidement)
pN0	Pas d'envahissement des aires ganglionnaires régionales pN0 : pas de métastase identifiée ou uniquement des cellules tumorales isolées (ITCs) pN0(i+) : ITCs ou amas cellulaires $\leq 0,2\text{mm}$ (détection à l'Hématoxiline-Eosine (H-E) ou par IHC) pN0(mol+) : biologie moléculaire positive (RT-PCR positive) mais histologie négative (H-E et IHC)
pN1	Micrométastases ou métastases dans maximum 3 aires ganglionnaires régionales, et/ou aires mammaires internes négatives à la clinique mais avec micro- ou macrométastases détectées à la suite de la biopsie du ganglion sentinelle pN1mi : micrométastases (environ 200 cellules, $> 0,2$ mm mais $\leq 2\text{mm}$) pN1a : métastases dans 1 à 3 aires ganglionnaires avec au moins une métastase ($> 2\text{mm}$) pN1b : métastases dans les aires mammaires internes ipsilatérales sentinelles (excluant les ITCs) pN1c : pN1a + pN1b

Introduction

pN2	Métastases (au moins un amas > 2mm) dans 4 à 9 ganglions axillaires (pN2a) ou aires mammaires internes ipsilatérales positives à l'imagerie/clinique en l'absence d'atteinte axillaire histologique (pN2b)
pN3	Métastases dans au moins 10 ganglions axillaires ou atteinte des ganglions sous-claviculaires (niveau axillaire III de Berg), ou ganglions mammaires internes ipsilatéraux positifs à l'imagerie avec atteinte des niveaux axillaires de Berg I et/ou II, ou atteinte de plus de 3 ganglions axillaires et atteinte des ganglions de la chaîne mammaire interne (micro- ou macrométastases) détectée sur le ganglion sentinelle sans signe clinique, ou atteinte des ganglions sus-claviculaires ipsilatéraux pN3a : Métastases dans au moins 10 ganglions axillaires ou dans les ganglions sous-claviculaires pN3b : pN1a ou pN2a avec cN2b (ganglions mammaires internes positifs à l'imagerie) ou pN2a + pN1b pN3c : Métastases dans les ganglions sus-claviculaires ipsilatéraux
Métastases à distance	
M0	Pas de métastase à distance tant cliniquement qu'à l'imagerie
M1	Métastases déterminées cliniquement/à l'imagerie et/ou métastases > 0.2mm prouvée histologiquement

Tab 6 : Système TNM selon l'AJCC-UICC 8^{ème} édition [94].

6.5. Stades anatomiques TNM 8^{ème} édition (AJCC-UICC 2017) [94]

0 : Tis N0 M0

IA : T1 N0 M0 **IB** : T0-1 N1mi M0

IIA : T0-1 N1 M0 , T2 N0 M0 **IIB** : T2 N1 M0 , T3 N0 M0

IIIA : T0-3 N2 M0 , T3 N1 M0 **IIIB** : T4 N0-2 M0 **IIIC** : T0-4 N3 M0

IV : T0-4 N0-3 M1

L'emploi de cette stadification n'est plus recommandé en pratique clinique puisque les biomarqueurs sont désormais part entière des classifications pronostiques pathologiques et cliniques.

6.6. Stades pronostiques pathologiques et cliniques TNM 8^{ème} édition (AJCC-UICC 2017) [94]

Ces stades incluent désormais le grade et des biomarqueurs (ER, PR et HER2). Ils sont consultables dans le manuel de l'AJCC-UICC 2017 publié début 2018.

7. Facteurs pronostiques et prédictifs

Si le développement et l'emploi des thérapies systémiques ont amélioré la survie du cancer du sein en éradiquant des micrométastases et en prévenant des récurrences, certaines patientes auraient pu ne se voir proposer que les traitements locaux de chirurgie et radiothérapie et ont été excessivement confrontées aux thérapies systémiques et à leurs effets secondaires. A l'inverse, d'autres patientes ont vu leur tumeur, à tort, jugée non redevable d'une thérapie systémique et ont été sujettes à des récurrences inacceptables. Le cancer du sein est certainement la pathologie maligne où l'utilisation de facteurs prédictifs et pronostiques doit être poussée à son paroxysme avant décision d'une stratégie thérapeutique. Par définition, un **facteur prédictif** indique la probabilité de réponse à une modalité thérapeutique donnée tandis qu'un **facteur pronostique** renseigne sur le devenir clinique au moment du diagnostic (en terme de survie globale ou de survie sans maladie) indépendamment de tout traitement systémique et est donc corrélé à l'histoire naturelle de la maladie. Comme nous allons le voir, certains facteurs sont à la fois prédictifs et pronostiques [95].

Introduction

Pour être employé couramment, un marqueur doit avoir prouvé sa **validité analytique** (précision et fiabilité, reproductibilité), sa **validité clinique** (distinction des tumeurs en 2 groupes ou plus selon leur histoire naturelle ou leur biologie) et son **utilité clinique** pour traiter le patient (employer le marqueur pour diriger le traitement améliore son devenir) [96]. Ainsi un facteur pronostique est intéressant en pratique clinique si [97]:

- Il fournit une valeur pronostique significative et indépendante et que cela a pu être prouvé après son emploi clinique.
- Sa détermination est reproductible, largement réalisable et avec un contrôle de qualité.
- Son résultat est aisément interprétable par le clinicien.
- Sa mesure ne consomme pas de tissu nécessaire pour d'autres tests (surtout les tests pathologiques dont les IHC).

7.1. Facteurs pronostiques principaux

7.1.1. Caractéristiques liées à la patiente

L'âge au diagnostic et l'aménorrhée chimio-induite :

- < 35 ans : moindre survie à 5 ans des patientes de 20-34 ans (n=471) dans l'étude de *Fredholm H et al* (plus de 20.000 patientes), en comparaison à celle des patientes plus âgées et ceci même après ajustements statistiques par rapport aux stades, grades ou sous-types à l'IHC et aux traitements reçus (les jeunes patientes ayant en général un stade plus élevé avec une maladie ER-négative et plus de traitements agressifs). Les différences sont plus marquées pour les tumeurs de faible taille [98]. Partridge et al ont en outre montré en 2016, parmi 17.575 patientes atteintes d'un cancer de stade I à III, qu'un jeune âge (cut-off à 40 ans dans cette étude) a un impact sur la survie en cas de sous-type moléculaire Luminal mais pas pour un sous-type HER2 [99].
- > 65 ans : facteur démontré comme péjoratif sur la survie tant dans des études rétrospectives sur population [100] que dans un essai randomisé (« TEAM trial ») [101] et ce en raison d'un stade plus avancé, de comorbidités importantes et de l'absence de consensus sur les traitements à appliquer.
- L'aménorrhée chimio-induite et persistante chez une patiente préménopausique est de bon pronostic [102].

Des **critères raciaux** jouent également : les patientes afro-américaines ont une mortalité supérieure aux Etats-Unis notamment dans le programme SEER et de moindres taux de réponse pathologique complète (pCR) en cas de TNBC ou de maladie HER2+ après chimiothérapie néoadjuvante. Les patientes afro-américaines ont plus fréquemment un TNBC à l'IHC et un sous-type moléculaire Basal-like que les blanches [3, 103–105].

Le sexe masculin confère un moindre pronostic principalement en raison de tumeurs de stade plus élevé au diagnostic.

Le **tabagisme** augmente la mortalité. Son arrêt après diagnostic permet d'améliorer la survie (mais celle-ci reste inférieure à celle des patientes n'ayant jamais fumé)[106].

La **densité mammaire** n'a aucun impact pronostique [16].

Introduction

7.1.2. Caractéristiques de la tumeur autres que génomiques/transcriptomiques

Les stades pronostiques du TNM sont de loin le facteur pronostique le plus important. L'amélioration de la connaissance de la biologie des cancers a conduit à intégrer les biomarqueurs dans leur stadification. La **8^{ème} édition du TNM** (AJCC-UICC 2017), effective au 1^{er} janvier 2018 tient ainsi compte pour le cancer du sein, outre le classique TNM anatomique, du grade histologique ainsi que des biomarqueurs à l'IHC (ER, PR et HER2) et établit un stade anatomique et deux stades pronostiques : un clinique et un pathologique.

Il est recommandé de désormais recourir à ces deux derniers stades. La stadification pathologique mène à une meilleure répartition pronostique d'un groupe de patientes et à affiner le pronostic individuel de chaque patiente. Les données de survie employant la 8^{ème} édition du TNM n'étant pas encore disponibles, nous devons nous fier à des données de survie établies en utilisant le TNM de la 7^{ème} édition qui est très similaire à la stadification anatomique de la 8^{ème} édition [92].

- En Belgique, au diagnostic, plus de 80% des patientes ont une tumeur de stade I ou II. La survie est alors supérieure à 90% [5]. L'analyse du programme SEER pour les années 2008-2014 indique une survie à 5 ans aux USA de 98,7% pour les stades localisés (I-II), de 85,3% pour un stade III et de 27% pour un stade IV [107]. Remarquons qu'au diagnostic, environ 5% des cancers du sein présentent une dissémination à distance et que 30% des cas diagnostiqués à un stade précoce vont développer des métastases [108]. Tout **stade** confondu elle est de 89,7% [107]. On comprend aisément que les cancers diagnostiqués par mammographie sont de meilleur pronostic que ceux diagnostiqués cliniquement en raison d'un moindre stade. La **taille de la tumeur primaire** a un impact par elle-même sur la mortalité et une tumeur inflammatoire T4d est par exemple de très mauvais pronostic. Un **envahissement ganglionnaire** est un facteur pronostique indépendant particulièrement négatif : cela a été abondamment démontré en cas de macrométastases axillaires et a été également prouvé dans une méta-analyse de 58 études pour les micrométastases (pN1mi) mais n'a pas été objectivé en présence de cellules tumorales isolées [3, 109].
- Plus le **grade** histologique est élevé, moins le pronostic est favorable [110].
- **L'expression de ER confère un meilleur pronostic** tant en terme de survie globale, que de survie sans maladie. Cet avantage des tumeurs ER+ a plusieurs explications :
 - elles sont en général bien différenciées, ont une moindre fraction de cellules en division et sont plus souvent diploïdes [111, 112].
 - elles présentent moins de mutations, de perte ou d'amplification des gènes liés aux cancers du sein et conférant un moindre pronostic (p53, EGFR, HER2) [113–115].
 - en cas de récurrence à distance, leur dissémination se fait (pour des raisons non élucidées) préférentiellement au niveau des os, de tissus mous alors que les tumeurs ER- ont une dissémination plus habituelle au niveau hépatique et cérébral, sites associés à une espérance de vie plus courte [116].

Le risque de récurrence en cas de maladie ER+ est moindre les 5 premières années. En revanche, il devient supérieur à celui des maladies ER- après 5-8 ans [117, 118]. Ainsi Colleoni et al. ont montré que parmi 4000 patientes atteintes d'un cancer du sein opérable, le risque annuel de récurrence était de 9.9% pour les cas ER+ contre 11.5% pour les ER-. Ensuite, l'avantage s'inversait (5-10 ans : 5.4 vs 3.3% ; 10-15 ans : 2.9 vs 1.3% ; 15-20

Introduction

ans : 2.8 vs 1.2%). En cas de maladie ER/PR +, il n'est pas rare d'observer des rechutes même 20 ans après diagnostic [63].

- **L'expression de PR est également de bon pronostic** et cela indépendamment de l'expression d'ER (les cas ER+ PR- sont en général plus agressifs et du sous-type moléculaire Luminal B) [119, 120].
- **Initialement, la surexpression/amplification d'HER2 était considérée de mauvais pronostic** y compris en cas d'absence d'envahissement ganglionnaire ou de tumeur < 1cm [121, 122]. L'avènement des thérapies ciblées anti-HER2 a permis d'atténuer ce caractère péjoratif.

D'autres facteurs pronostiques hors de la stadification TNM sont à considérer.

- **Le type histologique influence le pronostic.** Ainsi, si on considère les deux types les plus fréquents, dans une étude sur 9000 patientes, le risque de rechute est moindre de 16% pour les carcinomes lobulaires lors des six premières années de suivi puis est supérieur à celui des canalaire de 54% par la suite [123].
- La réponse après thérapie néoadjuvante s'avère importante. L'obtention d'une **réponse pathologique complète (pCR)** est de bon pronostic [63]. La pCR se définit par l'absence de maladie invasive résiduelle tant au niveau mammaire que ganglionnaire après thérapie néoadjuvante. Par rapport à une réponse partielle, une pCR est corrélée à une meilleure OS (« overall survival » = survie globale), surtout en cas de TNBC et de maladie ER-/HER2+ pour laquelle le Trastuzumab a été associé à la chimiothérapie néoadjuvante [124].
- **L'invasion péritumorale lymphovasculaire** : les rapports les plus récents tendent à la considérer comme une caractéristique présente simultanément aux facteurs de mauvais pronostic. Isolément, elle ne semble pas impacter la survie [125].
- **Ki67** : malgré le manque de standardisation entre les différents centres dans son évaluation, deux grandes méta-analyses concluent au rôle de ce marqueur de prolifération cellulaire en tant que facteur pronostique indépendant [126, 127]. Une des deux a repris 46 études (comportant 12.155 patientes) et démontre que des taux élevés de Ki67 sont associés à un haut risque de récurrence et une moindre survie, peu importe le statut ganglionnaire [126]. Néanmoins, son emploi en tant que biomarqueur pronostique en clinique reste l'objet de controverses et l'ASCO recommande d'ailleurs d'éviter les marqueurs de prolifération pour juger du pronostic [128].
- La **présentation simultanée de plusieurs tumeurs mammaires invasives non métastatiques** fait également l'objet de débats avec certains auteurs conférant à cette situation un pronostic péjoratif [129] et d'autres auteurs ne lui reconnaissant aucun caractère pronostique [130].

7.1.3. Caractéristiques génomiques/transcriptomiques de la tumeur

Avec l'émergence de la génomique et de la transcriptomique et la capacité de séquencer des génomes jusque dans leur totalité, de nouveaux tests pronostiques ont vu le jour. Actuellement l'ASCO appuie l'emploi de certains tests [131] :

- le **Recurrence Score (RS)** : il se fonde sur le test Oncotype Dx® qui évalue l'expression de 21 gènes à partir de la tumeur. Les résultats sont alors inclus dans une formule aboutissant à ce score. Il informe sur le risque de récurrence dans les 10 ans et le bénéfice de

Introduction

la chimiothérapie pour chaque cas. Il s'agit du test pronostique moléculaire le plus validé et il est actuellement indiqué uniquement pour les patientes avec une maladie ER+/HER2-indemne d'atteinte ganglionnaire [131].

- l'**EndoPredict** : il se base sur la détection d'ARN et réalise une RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) de 11 gènes pour arriver à un score pronostique. Sa valeur pronostique a été reconnue comme indépendante et il semble utile pour identifier les patientes ER+/HER2- à faible risque de récurrence à long terme et sans chimiothérapie [132].
- le **Breast Cancer Index** : ce test combine deux profils de signatures géniques et permet de prédire le risque de récurrence au delà de 5 ans d'un cancer ER+ avec ou sans atteinte ganglionnaire.
- le **PAM50 (Predictor Analysis of Microarray 50)** : il utilise 50 gènes pour donner le sous-type intrinsèque du cancer du sein et permet de générer un score de risque de récurrence (score ROR : risk of recurrence) pour les maladies ER+ qu'il stratifie en maladie à faible, moyen ou haut risque de récurrence [133, 134].
- le **MammaPrint (le profil de 70 gènes d'Amsterdam)** : il emploie 70 gènes et a été validé pour prédire un risque de récurrence chez des patientes atteintes de cancer ER+/HER2-sans atteinte ganglionnaire ou avec atteinte ganglionnaire limitée (maximum 3 ganglions touchés). Des études observationnelles indiquent que ce test pourrait en réalité identifier les patientes à faible risque de récurrence indépendamment du statut ganglionnaire, du grade et des récepteurs ER et HER2.

Il est intéressant de noter que selon le NCCN (National Comprehensive Cancer Network), seul le RS a été validé pour prédire le bénéfice de l'ajout d'une chimiothérapie adjuvante dans la réduction du risque ultérieur de récurrence [135].

7.2. Facteurs prédictifs principaux

Idéalement, il conviendrait de ne proposer un traitement qu'aux patientes chez qui il serait efficace et d'éviter toute toxicité chez les autres. Afin d'identifier ces patientes pour chaque modalité de traitement, les cliniciens disposent de facteurs prédictifs. L'expression de ER/PR et la surexpression/amplification de HER2 sont les seuls biomarqueurs prédictifs couramment employés actuellement.

L'expression de ER permet de sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une hormonothérapie. Cela a été démontré par une méta-analyse d'essais randomisés en situation adjuvante du Tamoxifène (Nolvadex®), un SERM (Modulateurs Sélectifs des Récepteurs des œstrogènes), réalisée par l'EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group). Pour un suivi de 15 ans, le Tamoxifène réduit significativement le risque de récurrence de 39 % et celui de décès de 30% chez les patientes atteintes de cancer ER+ alors qu'il n'a aucun impact en cas de maladie ER-. Le bénéfice y est indépendant de l'âge, du statut ganglionnaire, de l'emploi d'une chimiothérapie adjuvante ou, de manière plus surprenante, de l'expression de PR. En effet, le bénéfice de l'hormonothérapie chez les patientes atteintes d'un cancer PR+ repose fortement sur l'expression de ER et il ne semble pas que le statut PR possède une valeur prédictive indépendante, spécialement si le statut ER est connu [136].

Introduction

La surexpression/amplification de HER2 permet de prédire les patientes pouvant bénéficier d'une thérapie ciblée par Trastuzumab (Herceptine®) et ce tant en situation néoadjuvante [63] qu'en situation adjuvante [137] ou métastatique [138–140].

Il n'y a actuellement pas de marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie qui soit validé. Une méta-analyse de 123 essais randomisés concernant la chimiothérapie adjuvante (incluant plus de 100.000 patientes) a conclu que le bénéfice de la chimiothérapie est indépendant de l'âge, des récepteurs hormonaux, du grade, de la taille tumorale, de l'atteinte ganglionnaire et de l'emploi de Tamoxifène en adjuvant [141]. Néanmoins, en l'absence de récepteurs hormonaux et de surexpression/amplification de HER2, l'emploi d'une chimiothérapie est de vigueur, d'autant que la taille tumorale excède 1cm, qu'il y ait atteinte ganglionnaire ou que le Ki67 soit élevé [63]. Les tests génomiques/transcriptomiques cités ci-dessus représentent une piste certaine pour trouver un biomarqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie mais aucun n'a encore été validé à cet égard [63].

8. Traitements actuels des cancers du sein

8.1. Traitements locorégionaux

8.1.1. Chirurgie

Il s'agit de la pierre angulaire du traitement locorégional du cancer du sein. Dans la mesure du possible, un traitement conservateur est privilégié. Il consiste soit en une tumorectomie où un retrait de la tumeur palpable et du tissu avoisinant est réalisé, soit en une quadrantectomie (mastectomie segmentaire) pour des lésions plus étendues. Cependant, une mastectomie représente dans certaines situations le traitement de choix :

- taille importante de la tumeur en regard de la taille du sein.
- cancers multifocaux et multicentriques.
- souhait de la patiente.
- antécédent de radiothérapie thoracique ou contre-indication à la radiothérapie.
- récurrence après traitement conservateur.

La mastectomie totale implique le retrait de l'ensemble de la glande mammaire incluant l'aréole et le mamelon mais n'emporte pas les muscles de la paroi thoracique sous le sein. Elle peut également être réalisée bilatéralement en l'absence de cancer, de manière prophylactique en cas de mutation BRCA [63].

En l'absence d'envahissement ganglionnaire suspecté à l'examen clinique et à l'échographie, une biopsie du ganglion sentinelle est réalisée. Le ganglion sentinelle est le premier relais lymphatique ganglionnaire à être affecté en cas de dissémination ganglionnaire du cancer. Si l'analyse du ganglion sentinelle s'avère rassurante, il n'y a pas lieu de réaliser un curage ganglionnaire puisque cette attitude offre alors le même taux de survie et de contrôle régional qu'un curage axillaire [142, 143]. En revanche, si elle s'avère positive ou qu'une adénopathie avait été démontrée par l'examen clinique ou l'échographie, un curage ganglionnaire axillaire emportant au minimum 10 ganglions doit être effectué [63] et entraîne alors un risque de développement d'un lymphoedème du membre supérieur de 25% [144].

Introduction

8.1.2. Radiothérapie

Lorsqu'un **traitement chirurgical conservateur** a été réalisé, il convient d'y associer par la suite une radiothérapie complémentaire. Celle-ci permet à l'attitude conservatrice d'obtenir une survie à 10 ans équivalente à celle d'une mastectomie, voire même supérieure [144]. Une radiothérapie externe de 45-50 Gy en 25-28 séances est ainsi administrée sur l'ensemble de la glande mammaire (Whole Breast Radiation Therapy = WBRT) [63]. Elle assure une réduction significative du risque de récurrence à 10 ans et de décès à 15 ans [144]. L'extension des champs de radiothérapie aux aires ganglionnaires régionales (aires supra- et infra-claviculaires, chaîne mammaire interne) est également indiquée en cas d'envahissement axillaire initial ou de maladie à haut risque [145, 146].

Après mastectomie, en l'absence d'atteinte ganglionnaire, la radiothérapie externe n'est pas indiquée. En revanche, elle est effectuée en cas d'atteinte ganglionnaire axillaire puisqu'elle réduit le risque de récurrences à 10 ans de 10% et de décès à 20 ans de 8% [147].

8.2. Traitements systémiques en situation adjuvante

Ils sont envisagés afin d'éradiquer d'éventuelles micrométastases ou cellules résiduelles après le traitement local, afin de réduire le risque de récurrence ou encore, en situation métastatique, afin de ralentir la progression de la maladie. Suivant le type de cancer du sein, différents traitements systémiques vont être préconisés et débutés 4-6 semaines après la chirurgie (tab 7) [63].

Correspondance clinico-pathologique (basée sur l'IHC) des sous-types intrinsèques	Traitement adjuvant
Luminal A-like ER+, HER2-, PR élevé, Ki 67 bas	Hormonothérapie + parfois chimiothérapie si : ○ grade III ○ Tumeur T3 ou ≥ 4 ganglions atteints
Luminal B-like HER2-négatif ○ ER+, HER2- et PR bas ou Ki67 élevé	Hormonothérapie + Chimiothérapie
Luminal B-like HER2-positif ER+, HER2+, peu importe PR et Ki67	Hormonothérapie + Chimiothérapie + traitement anti-HER2
HER2-Positive (non luminal) HER2+, ER- et PR-	Chimiothérapie + traitement anti-HER2
Triple-négatif (canaulaire) ER-, PR-, HER2-	Chimiothérapie seule

Tab 7 : Traitement systémique selon le sous-type de cancer du sein. D'après Senkus et al, 2015 [63].

8.2.1. Hormonothérapie

Elle réduit l'impact des œstrogènes au niveau des cellules cancéreuses par réduction de leur action ou de leur taux. Ainsi, 3 modes d'hormonothérapie peuvent être retenus [148] :

- les **anti-œstrogènes** réduisent la liaison des œstrogènes à leurs récepteurs :
 - les **SERM** : Selective Estrogen Receptor Modulators » : suivant les tissus, ils sont antagonistes (tissus cancéreux mammaires) ou agonistes (os, endomètre).
→ En oncologie, il s'agit du Tamoxifène (Nolvadex®) (fig 18).

Introduction

- **les SERD** : Selective Estrogen Receptor Downregulators/Degraders qui agissent uniquement comme antagonistes et amènent à la dégradation spécifique des ER.
→ Leur chef de file est le Fulvestrant (Faslodex®).
- **les inhibiteurs de l'aromatase (AI)** (fig 18) : ils inhibent les aromatasases, présentes dans de nombreux tissus périphériques (muscles, foie, tissus adipeux, cerveau) et qui mènent à la conversion de substrats androgéniques en œstrogènes. Cette conversion est la première source d'œstrogènes chez la femme ménopausée. Il s'agit :
 - d'un AI stéroïdien irréversible : Exemestane (Aromasin®).
 - des AI non-stéroïdiens réversibles (NSAI) : Létrozole (Femara®), Anastrozole (Arimidex®).
- la **suppression de la fonction ovarienne** réduit également les taux d'œstrogènes et est réalisée soit « physiquement » par ovariectomie bilatérale/irradiation des ovaires, soit par administration d'un agoniste LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone).

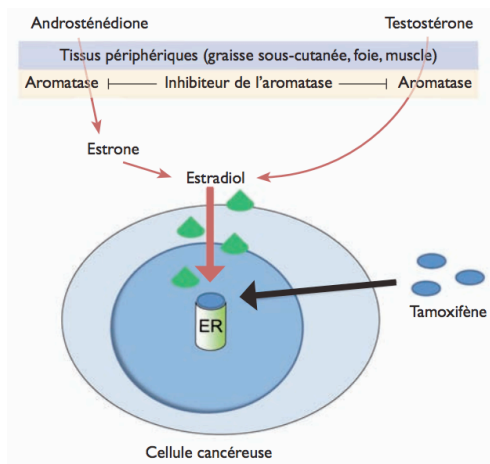


Fig 18 : Mécanisme d'action du Tamoxifène et des inhibiteurs de l'aromatase. D'après Odermatt et al, 2013 [148].

L'hormonothérapie est donc envisagée pour les cancers du sein ER+. Le choix de l'hormonothérapie dépend du statut ménopausique de la patiente et des effets secondaires liés à chaque type [63]:

- **chez les patientes pré-ménopausées** : le Tamoxifène est le standard. Une méta-analyse de l'EBCTCG incluant plus de 20.000 patientes a montré que son emploi à raison d'un comprimé par jour pendant 5 ans diminue significativement le risque de récurrence à 10 ans et de décès à 15 ans [136]. Appliqué pendant 10 ans, le Tamoxifène amène à une réduction encore plus marquée de ces risques [149]. En revanche, l'ajout de la suppression de la fonction ovarienne au Tamoxifène pendant 5 ans n'entraîne pas d'amélioration de la survie sans maladie [150]. S'il y a contre-indication ou craintes des effets secondaires du Tamoxifène (thromboses, hyperplasie de l'endomètre), l'emploi d'AI associé à un agoniste LHRH comme la Gosérelina (Zoladex®) peut être envisagé.
- **chez les patientes post-ménopausées** : le Tamoxifène et les AI sont deux options valables. Un traitement par AI pendant 5 ans est le standard. Il permet une réduction supplémentaire de décès par cancer du sein de 15% par rapport au Tamoxifène [151]. Sa prolongation jusqu'à 10 ans améliore encore significativement la survie sans maladie [152]. Les effets secondaires des AI sont principalement les arthromyalgies et une réduction de la densité osseuse (risque d'ostéoporose).

Introduction

8.2.2. Thérapies ciblées anti-HER2

La surexpression/amplification de HER2 permet à la cellule tumorale d'activer des voies de signalisation intracellulaire menant à la différenciation et la croissance tumorale. Cependant, cette protéine représente également une cible de traitement intéressante puisqu'elle est plus fortement exprimée par les cellules cancéreuses que les tissus normaux. Le Trastuzumab (Herceptine®), anticorps monoclonal recombinant développé fin des années 1990, représente la première thérapie ciblée anti-HER2. Son traitement à raison de une fois toutes les 3 semaines pendant un an (en association avec la chimiothérapie par Taxane puis seul) a démontré sa plus-value par rapport à l'emploi de la seule chimiothérapie adjuvante. Dans une méta-analyse de la Cochrane de 8 essais randomisés, publiée en 2012 et incluant près de 12.000 patientes, l'ajout du Trastuzumab pendant un an améliore très significativement l'OS et la DFS (« disease free survival » = survie sans maladie). Le bénéfice en OS est obtenu en réalisant un schéma d'administration simultanée à la chimiothérapie mais n'est pas présent en cas de schéma séquentiel [153]. Trois essais ont étudié l'administration pendant seulement 6 mois du Trastuzumab et deux d'entre eux (PHARE trial et HORG trial) ont montré que cette stratégie ne permettait pas d'obtenir une non infériorité par rapport à l'administration pendant un an du Trastuzumab [154, 155]. A l'inverse, la prolongation du Trastuzumab pour une période de 2 ans n'est pas supérieure au traitement pendant un an (HERA trial) [156]. Actuellement, en situation adjuvante, il n'y a pas encore d'indication d'associer une seconde thérapie ciblée anti-HER2. Cependant, l'étude de phase III APHINITY a démontré que l'ajout à la chimiothérapie et au Trastuzumab, du Pertuzumab (Perjeta®), un anticorps monoclonal qui bloque spécifiquement l'hétérodimérisation de l'HER2 avec d'autres membres de la famille des récepteurs HER (Human Epidermal growth factor Receptor), augmente la DFS (« Disease Free Survival » : survie sans maladie) chez des patientes atteintes d'un cancer ER- ou avec atteinte ganglionnaire [157]. Enfin, il est important de retenir que le Trastuzumab requiert un suivi de la fonction cardiaque au moins tous les 3 mois puisqu'il entraîne un risque d'insuffisance cardiaque congestive et de diminution de l'éjection ventriculaire gauche [153].

8.2.3. Chimiothérapie

Le schéma standard de chimiothérapie adjuvante dans les cancers du sein comporte 4 cycles de 2 semaines à base d'anthracyclines (Doxorubicine ou Epirubicine) associées au Cyclophosphamide et de 12 cures hebdomadaires à base de taxanes (Paclitaxel ou Docétaxel). Dans l'ensemble, ce schéma assure une réduction de 20 à 25% de la mortalité liée au cancer du sein [63, 141].

La chimiothérapie adjuvante est indiquée dans presque tous les cancers HER2+ et les TNBC. En cas de cancer Luminal A, la chimiothérapie ne sera administrée que dans de rares conditions (envahissement ganglionnaire important, grade III, tumeur volumineuse). A l'inverse, les cancers Luminal B représentent dans la majorité des cas une indication de chimiothérapie mais des tests moléculaires tels que l'oncotype-Dx® pourraient à l'avenir être plus largement utilisés et permettre aux cliniciens d'évaluer le risque de rechute du cancer Luminal B et le besoin de chimiothérapie adjuvante [63, 158].

Introduction

8.3. Traitements systémiques en situation néoadjuvante [63]

Un traitement systémique néoadjuvant (avant chirurgie) est proposé en cas de maladie localement avancée ou de tumeur volumineuse mais opérable, tout particulièrement quand la mastectomie est indiquée et que le traitement systémique peut réduire l'importance de l'exérèse chirurgicale. L'application des thérapies systémiques avant la chirurgie n'entraîne pas de modification de survie. Tous les traitements disponibles en adjuvant peuvent être envisagés en situation néoadjuvante :

- la chimiothérapie doit être délivrée dans son ensemble avant chirurgie et comporte le même schéma standard qu'en situation adjuvante.
- le Trastuzumab doit être initié au moment de passer à la chimiothérapie par Taxanes. Il sera poursuivi en postopératoire pour atteindre la durée de 1 an de traitement.
- chez des femmes ménopausées, une hormonothérapie peut être proposée en néoadjuvant dans certaines situations (en général pour des personnes âgées avec souhait d'épargne de la chimiothérapie). Les AI sont alors le premier choix et il convient de les prescrire pour au moins 4 à 8 mois avant la chirurgie.

Différentes adaptations des traitements systémiques ont été étudiées afin d'améliorer le taux de pCR et la survie au long terme. Ainsi le double blocage de HER2 par l'ajout de Pertuzumab ou de Lapatinib (Tyverb®) augmente significativement le taux de pCR mais son bénéfice à long terme n'est pas encore établi et il n'est dès lors pas indiqué. Il en va de même avec l'ajout de Carboplatine à la chimiothérapie néoadjuvante en cas de TNBC (cet ajout serait surtout intéressant en cas de mutation BRCA).

8.4. Traitements systémiques en situation métastatique [159]

En situation métastatique, le traitement est adapté également au type de cancer du sein :

- ainsi, à l'exception d'une situation de crise viscérale, les cancers ER+ HER2- sont d'abord traités par hormonothérapie combinée à un inhibiteur du cycle cellulaire avant de passer à des lignes d'hormonothérapie combinée à l'Everolimus (Affinitor®), un inhibiteur de mTOR ou d'abord à l'Alpelisib, inhibiteur de PI3K α en cas de mutation de *PI3KCA* (uniquement selon un medical need program en Belgique). Lorsque toutes les lignes comportant de l'hormonothérapie sont épuisées, un passage à la chimiothérapie est indiqué.
- pour les cancers HER2+, la première ligne comporte le double blocage de HER2 par Trastuzumab + Pertuzumab associée au Docetaxel selon le protocole de l'étude de phase III CLEOPATRA [160]. Les lignes ultérieures comportent différents traitements anti-HER2 comme le Trastuzumab Emtansine (T-DM1, Kadcyla®), une combinaison du Trastuzumab avec un inhibiteur des microtubules appelé le DM1 dont l'efficacité a été prouvée dans l'étude de phase III TH3RESA [161], et le Lapatinib (Tyverb®), un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de HER2 [162].
- les TNBC sont traités dans la très grande majorité des cas par chimiothérapie seule bien que, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, les anticorps conjugués à de la chimiothérapie semblent prometteurs, que les TNBC avec mutations BRCA pourraient être traités par inhibiteur du PARP et que la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé

Introduction

en mars 2019 l'Atezolizumab (Tecentriq®) en combinaison au Nab-Paclitaxel (Abraxane®) à la suite de l'étude IMPASSION-130 présentée au congrès de l'ESMO 2018 [163].

Nous pouvons dès lors constater que tant en situation curative qu'en situation métastatique, les TNBC sont traités quasi exclusivement par la chimiothérapie vu leur manque de cible cliniquement relevante.

9. Difficultés actuelles et perspectives du traitement des TNBC

9.1. Particularités des TNBC

Les TNBC, représentent 15-20% de tous les cancers du sein dont ils sont le sous-type le plus agressif et revêtent des particularités qu'il convient de souligner :

- ils **concernent des patientes plus jeunes**, touchant plus fréquemment des patientes de moins de 40 ans que ne le font les cancers hormonosensibles. Ainsi, une étude épidémiologique réalisée sur des patientes d'Atlanta révèle un risque deux fois plus important de présenter un TNBC chez les femmes de moins de 40 ans que chez celles de plus de 50 ans. Dès lors, leur incidence est plus importante parmi les femmes atteintes d'un cancer avant la ménopause [82, 164–168].
- pour des raisons encore peu claires, aux Etats-Unis, les **patientes hispaniques ou de couleur de peau noire présentent plus de TNBC** [82, 166–168].
- ils présentent des **mutations BRCA 1/2** dans près de 20% des cas (mutation germline dans 10% des cas, mutation BRCA 1 plus fréquente) alors que moins de 6% de tous les cancers du sein en arborent. Les guidelines NCCN remises à jour en Janvier 2019, recommandent la recherche de mutation germinale BRCA chez toute patiente de ≤ 60 ans atteinte d'un TNBC [169–171].
- **leur différenciation est faible**. La majorité des cas de TNBC sont peu différenciés (grade histologique III de Bloom) avec une proportion de grade III lors du diagnostic atteignant de 64,4% à 75,44% selon les études [82, 117, 165, 172]. Ainsi, Katrina Bauer et al. ont démontré, dans leur étude reprenant le registre des cancers en Californie, que la proportion de TNBC de grade histologique III au diagnostic était de 71,1% contre seulement 26,5% pour les autres types de cancers du sein [165].
- leur **prolifération** est plus rapide (avec un Ki67 plus souvent $>14\%$) et ils sont dès lors plus sujets à un diagnostic clinique (ou en tant que cancer d'intervalle) que ne le sont les cancers hormonosensibles plus fréquemment dépistés [117, 172, 173].
- **la chimiothérapie reste la pierre angulaire de leur traitement** et la seule option thérapeutique validée. Bien qu'ils soient les plus chémosensibles avec 35-50% des TNBC atteignant la pCR après chimiothérapie néoadjuvante par schéma anthracyclines-taxanes [124, 174], ils présentent aussi le **plus haut taux de rechutes à distance** : 33.9% versus 20.4% pour les autres types dans l'étude de Rebecca Dent et al. [172]. Leurs **rechutes sont précoces** avec un pic d'incidence dans les 3 premières années suivant le diagnostic. Après 8 ans, le risque de rechute est supérieur en cas de cancer hormonosensible (Rebecca Dent et al. n'ont recensé aucun cas de rechute au delà de 8 ans en cas de TNBC) avec des rechutes parfois encore 20 ans après le diagnostic en cas de cancer hormonosensible. Les

Introduction

rechutes à distance ne s'accompagnent pas le plus souvent d'une rechute locorégionale et elles concernent **plus fréquemment les viscères** en cas de TNBC incluant les poumons, le foie ou le cerveau (alors que les cancers homonosensibles présentent plus fréquemment des rechutes osseuses) [63, 172, 175–177]. La majorité des décès sur TNBC survient endéans les 5 premières années. Le délai entre l'objectivation de la première récurrence métastatique et le décès est très court avec une survie moyenne ne dépassant pas les 18 mois en cas de TNBC contre plus de 42 mois pour les autres types de cancer du sein [163, 178]. De manière générale, la survie globale des TNBC est bien inférieure à celles des autres cancers du sein.

9.2. L'hétérogénéité des TNBC

Le terme de « TNBC » a été employé à l'origine en 2005 et doit toujours être utilisé afin de décrire les cancers invasifs du sein pour lesquels on note une absence de récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone ainsi qu'une absence de surexpression de HER2/amplifications du gène HER2 selon l'ASCO/CAP (Société américaine d'oncologie clinique et Collège américain des pathologistes) et qui ne sont donc pas éligibles à l'hormonothérapie et aux agents anti-HER2, les rendant uniquement traitables par de la chimiothérapie [179]. Les TNBC sont en réalité très hétérogènes et comprennent un large panel d'entités distinguables par génétique, transcriptomique, histologie ou cliniquement. Dès lors, des classifications de sous-types intrinsèques (basés sur des groupes de gènes en microarray comme le PAM50 (voir page 40) et des classifications moléculaires ont été élaborées dans le but de comprendre les résistances aux thérapies ciblées et de mieux définir les options thérapeutiques disponibles pour chaque sous-type de TNBC [180–182].

9.2.1. Mieux connaître les TNBC au niveau génique

Pour rappel, il a été rapidement suggéré que les TNBC correspondent immunohistologiquement au sous-type moléculaire intrinsèque « Basal-like » dont presque 80% des tumeurs sont des TNBC à l'immunohistochimie. En 2007, un nouveau-sous-type de cancer du sein a été identifié et pris en considération à côté des 5 sous-types de la classification de Perou et Sørlie : le sous-type intrinsèque « Claudin-low ». Par immunohistochimie, il s'avère que 70% des cancers « Claudin-low » sont des TNBC. Ce sous-type représente jusqu'à 39% de tous les TNBC et le sous-type basal-like compte pour environ 50% des TNBC (fig 19)[88, 182].

Introduction

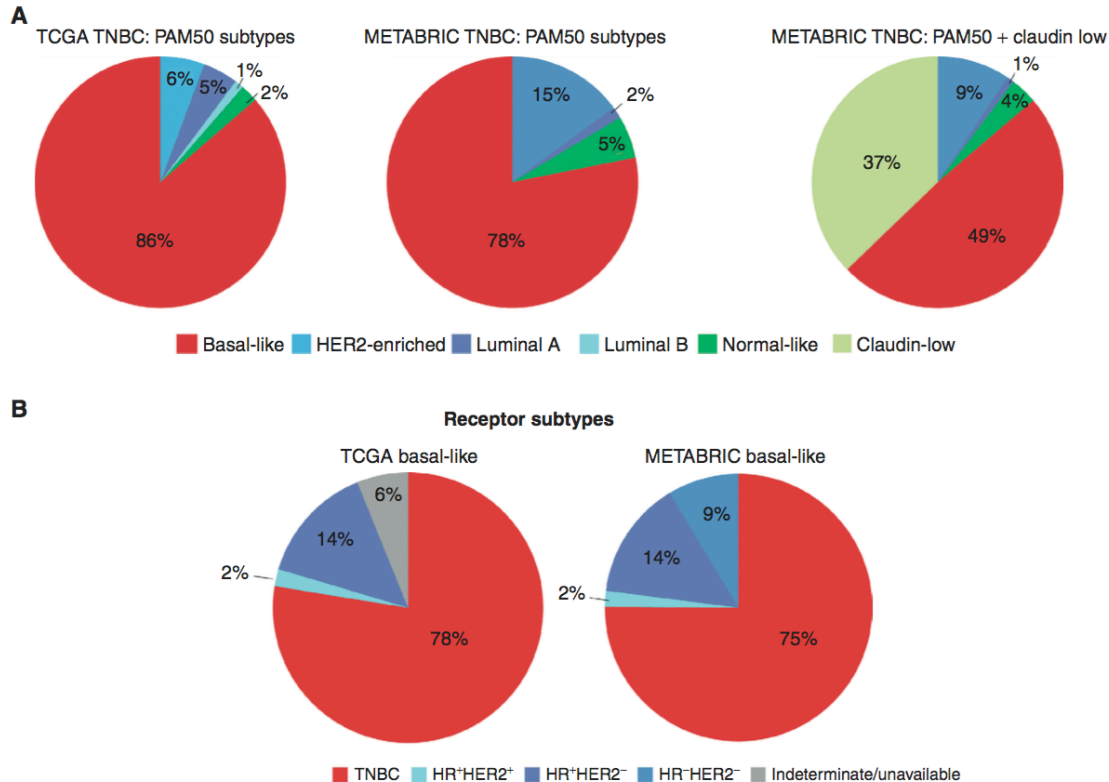


Fig 19 : A : Comparaison de la distribution des sous-types intrinsèques parmi les TNBC en ayant recours au PAM50 \pm claudin-low en employant les données des TNBC issus du TCGA (The Cancer Genome Atlas) et du METABRIC.
 B : Comparaison de la distribution des sous-types de cancers du sein tels que définis par immunohistochimie en employant les données des tumeurs « basal-like » du TCGA et du METABRIC (en ayant eu recours au PAM50 + claudin-low pour définir le « basal-like »).
 D'après Garrido-Castro et al. 2019 [182].

Le séquençage de l'ensemble du génome tumoral issu de différentes patientes atteintes de TNBC a démontré que les sous-types moléculaires intrinsèques de TNBC ont une valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie. Les tumeurs « Claudin-low » ont ainsi été associées avec des pCR inférieures (39%) à celles obtenues pour les « Basal-like » (73%). Cela n'entraîne cependant pas de modification de survie [88]. Retenons néanmoins que le séquençage global du génome est actuellement trop onéreux et qu'aucune des signatures du PAM50 n'est validée pour prédire la réponse individuelle à des agents de chimiothérapie que ce soit en situation néoadjuvante ou adjuvante [182].

9.2.2. Hétérogénéité au niveau transcriptomique : classifications moléculaires

A l'instar de Perou et Sørlie qui ont établi une classification moléculaire des cancers du sein, Lehman et al. ont proposé en 2011 une classification moléculaire des seuls TNBC. A l'aide de 21 microarrays, 6 sous-types (tab 8) ont été différenciés par leur expression d'ARN, leurs mutations somatiques et leurs altérations du nombre de copies de gènes (CNAs) (+ un sous-type dit « instable » ou « inclassable » dans 9% des cas). Ces altérations moléculaires ont été regroupées en « clusters » de gènes actifs de certaines voies spécifiques. Ils ont en outre démontré l'implication thérapeutique potentielle de cette classification sur des lignées cellulaires des différents sous-types et les xénogreffes correspondantes [181–184].

Introduction

Sous-type de Lehmann (2011) (prévalence)	Voies/fonctions biologiques impliquées
Basal-like 1 (BL1) (18%)	<ul style="list-style-type: none"> • réponse aux dommages sur ADN • régulation du cycle cellulaire → mutation de TP53 dans 92% des cas → gain/amplification : MYC, CDK6, CCNE1 → délétions : BRCA2, PTEN, MDM2, RB1
Basal-like 2 (BL2) (11%)	<ul style="list-style-type: none"> • signalisations par des facteurs de croissance (EGF, NGF, MET, Wnt/β-caténine, IGF1R) • métaboliques (glycolyse, néoglucogenèse) Rem : majoration de marqueurs suggérant une origine myoépithéliale : TP63 ou MME (CD10)
Immunomodulatory (IM) (21%)	<ul style="list-style-type: none"> • régulation de la réponse immune → signalisation cellulaire (Th1/Th2, NK, TCR et BCR) → signalisation par cytokines (cytokine, IL-12, IL-7) → processing et présentation de l'antigène → transduction du signal (NFκB, TNF, JAK/STAT)
Mesenchymal (M) (21%)	Ces deux sous types partagent des profils d'expression similaires pour certaines voies : <ul style="list-style-type: none"> • motilité cellulaire (régulation de l'actine par les Rho GTPases) • transition épithélio-mésenchymateuse • différenciation cellulaire –croissance (Wnt/β-caténine, TGF-β, ALK)
Mesenchymal stem-like (MSL) (8%)	Mais le MSL se distingue par : <ul style="list-style-type: none"> • l'enrichissement de gènes impliqué dans l'angiogenèse (VEGFR2,...) • l'enrichissement de gènes de cellules souches et de marqueurs des cellules souches mésenchymateuses • une moindre expression de gènes de prolifération • une moindre expression des claudines 3, 4, 7
Luminal Androgen Receptor (LAR) (9%)	<ul style="list-style-type: none"> • profil d'expression similaire à celui du sous-type moléculaire intrinsèque « Luminal » (FOXA1, GATA3, SPDEF, XBP1) • taux élevés d'ARNm et de protéines des récepteurs aux androgènes (AR) ➔ superposition avec les sous-types Luminal A et B dans 82% des cas avec donc enrichissement de gènes → mutations de PIK3CA (55%), KMT2C (19%), CDH1 (13%), NF1 (13%) et Akt1 (13%)

Tab 8: Sous-types moléculaires de la classification initiale de Lehmann et al., 2011 [183], avec les voies et fonctions biologiques concernées. La prévalence de chaque sous-type est issue d'une étude ultérieure de Lehmann et al, 2016 [184]. Adapté de Lehmann et al, 2011 [183].

Ils ont suggéré que les patientes avec un TNBC « Basal-like » devraient être traitées avec des agents causant des dommages à l'ADN, que celles dont la tumeur exprime fortement l'AR pourraient être placées sous Bicalutamide seul ou en combinaison avec un inhibiteur de PI3K et que celles avec une tumeur mésenchymateuse devraient se voir proposer des essais combinant un inhibiteur de Src avec un inhibiteur de PI3K [183]. Plus tard, une étude rétrospective a indiqué un taux de pCR de 50% pour les patientes avec un TNBC BL1 suite à la chimiothérapie néoadjuvante. Ce taux était bien plus faible pour les LAR (10%) ou les BL2 (0%) sans que cela n'impacte l'OS ou la survie sans métastase à distance [185].

En comparant cette classification à celle des sous-types géniques intrinsèques appliquée à l'ensemble des cancers du sein en employant le PAM50, il ressort que (fig 20) [181, 183] :

- les sous-types de TNBC BL1, BL2, IM, M et UNS sont le plus souvent du sous-type intrinsèque basal-like.
- les TNBC MSL sont en grande majorité des sous-types normal-like ou claudin-low.
- le sous-type LAR correspond le plus souvent aux rares TNBC classés comme luminaux ou HER2-enriched car ils en expriment les cytokératines et marqueurs luminaux.

Introduction



Fig 20 : Comparaison des classifications moléculaires appliquées aux TNBC.

A : Prévalence de chaque sous-type en fonction des classifications du PAM50, de Lehmann et de Burstein.

B : Comparaison 2 à 2 des 3 classifications.

BL1= basal-like 1, BL2= basal-like 2, BLIA = basal-like immune activated , BLIS = basal-like immunosuppressed, IM= immunomodulatory, LAR = luminal androgen receptor, LumA = luminal A, LumB = luminal B, M = mesenchymal, MES = mesenchymal, MSL = mesenchymal stem-like, UNC= unclassified correspondant au UNS de Lehmann. D'après Pareja et al., 2016 [181].

Cette classification a été remise en question par d'autres équipes employant également des microarrays [182]. Par microdissection au laser, préalable à l'isolement de l'ARN, Lehmann et son équipe ont eux mêmes indiqué que les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) et les cellules mésenchymateuses associées aux tumeurs ont respectivement influencé la définition des sous-groupes IM et MSL dans leur étude initiale. Ils ont dès lors établi une nouvelle classification dite **TNBCtype-4** ne comprenant plus que 4 sous-types : BL1 dans 35% des cas, BL2 (22%), M (25%), LAR (16%) et 2% de cas non classés.

A nouveau, l'analyse rétrospective indique un taux plus élevé de pCR en cas de tumeur BL1 (41%) en comparaison aux autres sous-types (BL2 à 18% et LAR à 29%) sans impacter cependant la survie. En revanche, si l'on compare les tumeurs BL1 à l'ensemble des tumeurs non-BL1, une différence significative de survie globale apparaît ($p=0,037$). La présentation clinique des TNBC varie également lorsqu'on se réfère à cette classification. Ainsi, les TNBC « Basal-like » sont en général de plus haut grade et concernent des femmes plus jeunes que les autres TNBC (52,6 vs 58,5 ans). Cependant, les TNBC BL1 présentent significativement des stades moins avancés au diagnostic. Enfin, la dissémination ganglionnaire au diagnostic est

Introduction

plus souvent observée pour les tumeurs LAR et les récurrences métastatiques ont un tropisme pulmonaire pour les sous-types M et osseux pour les LAR [184].

Les écueils rencontrés initialement par Lehmann et al. soulignent les limitations d'un séquençage en bloc des tumeurs qui ne permet pas de différencier les cellules tumorales des cellules stromales. Les techniques de séquençage en « single-cell » y parviennent et sont de plus en plus plébiscitées. Elles ont démontré la coexistence de plusieurs sous-types dans la plupart des TNBC. Cela suggère que la signature dominante obtenue lors d'un séquençage en bloc de la tumeur pourrait ne pas informer fidèlement sur les processus biologiques mis en jeu, ne donnant par exemple pas d'informations sur les interactions entre les cellules malignes et stromales. Cette hétérogénéité intratumorale bien supérieure à celle des tumeurs hormonosensibles explique au moins partiellement, la difficulté d'appliquer en routine clinique les tests de microarrays commerciaux sur les TNBC [182].

En 2015, Burstein et al. ont eux aussi proposé une classification basée sur l'expression génique constituée de 4 sous-types [186] :

- Luminal/androgen receptor (LAR) : amplification de *CCND1*.
- Mesenchymal (MES) : amplification de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).
- Basal-like immune suppressed (BLIS) : amplification de *FGFR2*.
- Basal-like immune activated (BLIA) : amplification de CDK1.

Tant en terme de survie sans maladie que de survie spécifique à la maladie, le sous-type BLIS s'avère le plus péjoratif et le sous-type BLIA, celui de meilleur pronostic. Les sous-types BLIS et BLIA apparaissent comme un mélange de différents sous-types de la classification initiale de Lehmann. A nouveau, cela indique la difficulté d'identifier, de manière reproductible, les différents sous-types géniques (fig 2) [181][186].

Actuellement, aucune classification moléculaire des TNBC n'est utilisée en pratique courante et elles restent toutes l'apanage de la science fondamentale. De toute évidence, des classifications plus précises reposant également sur les profils épigénétiques et des mesures quantitatives de l'hétérogénéité intratumorale devraient permettre à l'avenir de définir des sous-types de TNBC plus pertinents au niveau clinique et thérapeutique [182].

Introduction

9.3. Pistes d'amélioration de prise en charge des patientes atteintes de TNBC

9.3.1. Considérer à part les TNBC exprimant les récepteurs aux androgènes

Les tumeurs LAR sont considérées être dans un état cellulaire quiescent en comparaison aux tumeurs basal-like rapidement prolifératives. Dans des modèles expérimentaux, les tumeurs xénogreffes issues de lignées cellulaires LAR (MDA-MB-453, SUM185PE, CAL-148) sont fortement sensibles au Bicalutamide. Il paraît donc légitime de tester des alternatives à la chimiothérapie dans ce sous-type de TNBC.

Plusieurs études de phase II en un seul bras employant des anti-androgènes ont été menées chez des patientes atteintes de TNBC AR + (cut-off : 10% de marquage nucléaire à l'IHC) en situation métastatique ou localement avancée inopérable [187–189] :

Médicament	Efficacité
Bicalutamide (antagoniste du récepteur)	SD (« stable disease » maladie stable) à 6 mois : 19%, Pas de réponse objective
Enzalutamide (antagoniste du récepteur)	CBR à 24 semaines: 28%, ORR : 6/78 = 8% (1 CR, 5 PR) (CBR = « Clinical Benefit Rate » = taux de bénéfice clinique ; CR = réponse complète, PR = réponse partielle)
Abiraterone (inhibiteur de synthèse) + prednisone	CBR à 6 mois : 6/30 : 20% (1 CR et 5 SD) (mais le cut-off souhaité pour rejeter l'hypothèse nulle était de 25%)

Une étude de phase III (NCT02929576) comparant l'Enzalutamide, le Paclitaxel et leur combinaison a été configurée pour des patientes atteintes TNBC avancées et sélectionnées selon une signature génomique pilotée par les androgènes. Elle est actuellement suspendue.

Les TNBC AR+ à l'IHC ont un **taux de mutation du PIK3CA de l'ordre de 36-40%** alors que les AR- n'en présentent que dans 4-9% des cas [190, 191]. Dès lors, de manière similaire à ce qui a été récemment publié pour les cancers ER+, des combinaisons d'inhibiteur anti-androgènes et d'inhibiteur PI3K/mTOR ont été testées et se sont avérées efficaces dans des modèles précliniques [182]. L'étude de phase I NCT03207529 combine ainsi le BYL719 (Alpelisib) à l'Enzalutamide chez des patientes atteintes de cancers du sein métastatique AR + (> 1% de marquage nucléaire) et PTEN + (> 0% de marquage nucléaire).

Enfin, Asghar et al ont montré une **sensibilité comparable des lignées cellulaires LAR aux inhibiteurs des CDK4/6** (CDK : cyclin dependent kinase) à celle de la lignée ER+ MCF7. Cela s'explique par leur faible taux de CDK2 après mitose et donc de leur dépendance en CDK4/6 pour phosphoryler la protéine du Rétinoblastome (Rb) et ré-initier le cycle cellulaire alors que les lignées basal-like présentent après la mitose des taux transcriptomiques élevés de CCNE1 et CDK2 et retournent dans le cycle indépendamment des CDK4/6. L'ajout d'inhibiteurs de PI3K *in vitro* permet de réduire l'activité post-mitotique de CDK2 dans les lignées TNBC non-LAR mutées pour *PIK3CA* et les sensibilise aux inhibiteurs des CDK4/6 [192]. D'ailleurs, des patientes atteintes de TNBC peuvent être incluses dans une étude de phase I évaluant l'efficacité de la combinaison du Palbociclib (inhibiteur des CDK4/6) et du Taselisib (inhibiteur PI3K α) ou du Pictilisib (inhibiteur PI3K α/δ) chez des patientes atteintes de tumeurs solides présentant des mutations au niveau de *PIK3CA* (NCT02389842) [182].

Introduction

9.3.2. Les anticorps conjugués à des agents cytotoxiques (ADC : antibody drug conjugates)

L'identification de protéines plus abondantes à la surface des cellules cancéreuses que des cellules normales a conduit au développement d'anticorps dirigés contre ces protéines conjugués à des agents cytotoxiques. Ces derniers sont ainsi délivrés à haute dose spécifiquement au niveau des cellules exprimant ces protéines. L'agent de liaison doit être stable au niveau sanguin et permettre le relargage rapide de l'agent cytotoxique après internalisation du complexe [193]. Ainsi, une des options thérapeutiques reconnues en seconde ligne métastatique d'un cancer du sein HER2+ est le recours au T-DM1 (Trastuzumab Emtansine) qui délivre le DM1, un agent anti-microtubulaire dérivé de la maitansine, à haute dose au niveau des cellules exprimant l'HER2 (fig 21) [159].

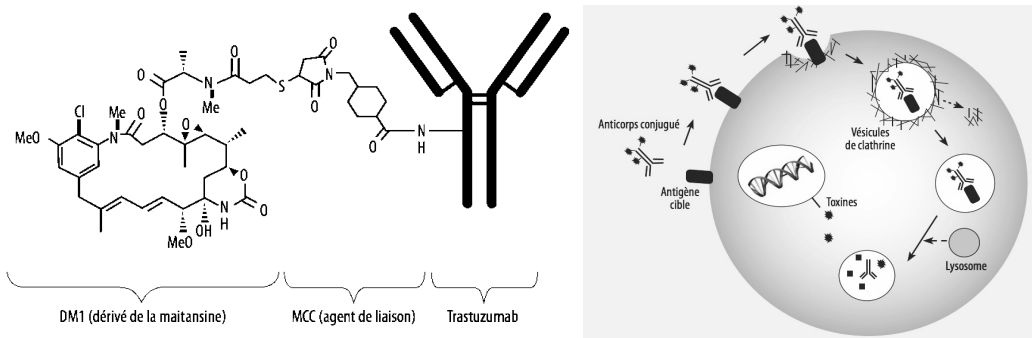


Fig 21 : Composition et mécanisme d'action du T-DM1.

G : Composition du T-DM1, incluant la séquence de liaison [N-maleimido méthyl] cyclohexane-1-carboxylate (MCC). En moyenne, 3,5 molécules de DM1 sont conjuguées à la région constante (Fc) du trastuzumab.

D : Mécanisme d'action du T-DM1 : internalisation de l'anticorps conjugué et libération de l'agent cytotoxique.

D'après Tredan et Reslan, 2012 [193].

Plusieurs cibles semblent fortement exprimées par des cellules des TNBC :

- **LIV-1** : protéine transmembranaire retrouvée chez 68% des TNBC métastatiques et ciblée par le **Ladiratumumab vedotin (SGN-LIV1A)** qui libère en intracellulaire le MMAE (monométhyl auristatine E) suite au clivage de l'agent de liaison par la cathepsine. Le MMAE bloque la polymérisation de la tubuline. Une étude de phase I menée sur 44 patientes TNBC métastatiques déjà lourdement traitées (en moyenne : 3 lignes de chimiothérapie) et publiée en 2018 indique [194] :
 - ORR (« objective response rate » : taux de réponse) : 32% (14/44) avec uniquement des PR, SD : 32% (14/44)
 - CBR à 24 semaines : 36% (16/44), PFS : 11,3 mois.
- **TROP 2** (antigène de surface antitrophoblastique 2) : ce transducteur glycoprotéique transmembranaire du signal calcique est exprimé par près de 90% des TNBC et peut être ciblé par le **Sacituzumab govitecan (IMMU-132)** qui est conjugué au SN-38, métabolite de l'Irinotécane. Bardia et al. ont récemment publié des résultats de l'étude de phase I/II IMMU-132-01 (Basket trial en un seul bras, cancers solides avancés) pour les 108 patients ayant en moyenne reçu 3 lignes de traitement pour un TNBC métastatique et traités par Sacituzumab govitecan [195] :

Introduction

- ORR : 33,3% (36/108), CR : 2,8% (3/108), PR : 30,6% (33/108), SD : 37% (40/108)
- CBR à 6 mois : 45,4% (49/108), durée moyenne de réponse : 7,7 mois, PFS : 5,5 mois, OS : 13 mois.

La FDA a cependant refusé en Janvier 2019 la demande d'acceptation accélérée de ce médicament comme 3^{ème} ligne de traitement des TNBC métastatiques en raison du manque de preuves sur sa sécurité.

Le SGN-LIV1A est actuellement étudié en phase II tandis que l'IMMU-132 est en phase III (ASCENT: NCT02574455). **Au vu de la haute prévalence de ces marqueurs parmi les TNBC, il n'est pas nécessaire de réaliser une IHC avant d'initier le traitement** [182].

9.3.3. Cibler les voies de signalisation génétiquement altérées

En tant qu'entité, les TNBC présentent une haute instabilité génétique avec une moyenne de 1,7 mutations/Mégabase. Les mutations somatiques qui y sont fréquemment retrouvées (> 10% des cas) concernent les gènes suppresseurs de tumeurs *PTEN*, *RB1*, *TP53* contre lesquelles il n'y actuellement pas de thérapeutique efficace. Les oncogènes *PIK3CA* et *Akt3* de la voie PI3K/Akt sont moins fréquemment mutés mais on dispose de thérapies ciblant cette voie. Il existe d'autres mutations somatiques concernant des gènes « driver » retrouvées chez moins de 10% de patients : *NF1*, *BRCA1/2*, *ERBB3*, *ERBB4*, *ALK*. Cela se complexifie si on tient compte que les TNBC ont fréquemment des **CNAs** avec des gains/pertes intercalés le long de tous les chromosomes et quelques fortes amplifications focales (ex : gains de 1q, amplifications de EGFR, perte de *PTEN*). En outre, des **réarrangements structuraux** de gènes tels que la fusion des gènes *NOTCH1* et *NOTCH2* peuvent être retrouvés [181, 182].

La survie en l'absence de pCR étant moindre que celle en cas de pCR après chimiothérapie néoadjuvante, l'identification de nouvelles cibles parmi les tumeurs résiduelles est de haute importance. Balko et al. ont ainsi analysé une série de 74 tumeurs TNBC résiduelles et ont montré la présence d'altérations que l'on peut cibler cliniquement dans > 90% (*PTEN*, *JAK2*, *CDK6*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3* et *IGFR1R*) [196].

A la lecture de ces mutations retrouvées avant et après chimiothérapie et en connaissant les thérapies ciblées disponibles, on peut comprendre plus aisément les différents essais cliniques qui ont été menés chez les patientes TNBC [182] :

- la voie PI3K/Akt/mTOR a été investiguée :
 - l'ajout du Buparlisib (inhibiteur pan-PI3K) au Paclitaxel en 1^{ère} ligne métastatique tend à améliorer la PFS en présence de la mutation *PI3KCA*.
 - la franche amélioration de PFS obtenue par ajout d'Ipatasertib (inhibiteur d'Akt) au Paclitaxel en 1^{ère} ligne métastatique dans l'étude de phase II LOTUS a justifié l'ouverture d'une phase III (IPATunity 130) chez les patientes où la voie est activée.
 - en situation néoadjuvante, l'ajout du MK-2206 à la chimiothérapie augmente considérablement en phase II (I-SPY2) la pCR.
 - l'efficacité des inhibiteurs de mTOR est restreinte à un faible nombre de patientes.
- malgré l'amplification fréquente d'EGFR les phases II et III employant des anti-EGFR en monothérapie se sont avérées décevantes. Cette même amplification et celle de c-Myc qui régule la transcription de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaires (dans près de 40% des tumeurs basal-like), a justifié de tester les inhibiteurs de MEK1/2 bien que

Introduction

les membres de la voie RAS/MAPK (KRAS, HRAS, BRAF et MEK 1/2) ne soient pas fréquemment mutés. Les résultats furent décevants.

- l'emploi d'une monothérapie anti-JAK1 (et de manière moindre anti-JAK2) par Ruxolitinib en phase II n'a pas mené à des réponses objectives. JAK 2 étant plus fréquemment altéré et pouvant mener à la résistance aux inhibiteurs de PI3K/mTOR, il conviendra de tester des inhibiteurs plus sélectifs de JAK2 en combinaison avec des inhibiteurs de la voie PI3K/mTOR.
- on estime que 13% des TNBC pourraient être guidés par les altérations de la voie NOTCH (amplifications, fusions de gènes, mutations). Le PF-03084014, un inhibiteur de γ -sécrétase bloquant la voie NOTCH a été testé en phase I en combinaison du Docetaxel sans sélection préalable et a aboutit à un ORR de 16% parmi les 29 patientes.

Des études randomisées à large échelle ou sur des populations plus larges sélectionnées sur bases d'altérations moléculaires sont encore requises pour évaluer l'effet d'inhibiteurs prometteurs.

9.3.4. Considérer les mutations BRCA germinales et les phénotypes BRCAness

L'absence de *BRCA 1* ou *2* à un état fonctionnel entraîne une déficience de recombinaison homologue (HR) des cassures double-brin rendant les cellules dépendantes des autres systèmes de réparation de l'ADN (tel le système PARP : PolyADP-Ribose Polymerase) et conférant une instabilité génomique. Si celle-ci favorise le développement de cancers à partir de ces cellules, elle peut également être vue comme un talon d'Achille des tumeurs. En effet, les agents tels que les chimiothérapies alkylantes ou les inhibiteurs de PARP (PARPi) induisent des cassures double-brin persistantes et finalement l'apoptose [197]. C'est le principe même de la **léthalité synthétique** dans les tumeurs HR-déficientes. Ainsi :

- l'amélioration significative d'ORR (68% vs 33%) et de PFS (6,8 mois vs 4,4 mois) du bras Carboplatine en regard du bras Docétaxel en cas de TNBC avancés dans **l'étude TNT** (phase III) n'est obtenue que parmi les 43 patients présentant une mutation germinale BRCA 1/2 [198] (PFS : « progression free survival » : survie sans progression).
- les études **OlympiAD** et **EMBRACA** (phases III) ont comparé respectivement l'Olaparib et le Talazoparib (deux PARPi) avec les chimiothérapies standard pour des cancers du sein métastatiques avec mutation germinale de BRCA et déjà confrontés aux anthracyclines/taxanes mais n'ayant pas eu plus de 3 lignes de chimiothérapie [199, 200].
 - ORR en faveur du PARPi (respectivement 59,9% vs 28,8% et 62,6 % vs 27,2%).
 - PFS en faveur du PARPi (respectivement 7 vs 4,2 mois et 8,6 vs 5,6 mois).

Si les ORR obtenus dans ces études sont assez similaires, la séquence idéale de succession des sels de platine ou des PARPi chez ces patients n'est pas connue. En outre, l'efficacité des PARPi chez des patients présentant d'autres défauts de réparation de l'ADN (ex : mutation de PALB2) ou des mutations somatiques de BRCA est en cours d'étude (NCT03344965). De même, la place des PARPi en situation adjuvante chez des patientes avec mutation germinale de BRCA est en cours de recrutement (OlympiA, NCT02032823) [182].

Une meilleure connaissance des mécanismes de résistance à ces traitements en cas de mutation germinale de BRCA devrait améliorer ces taux de réponse. Par ailleurs, la létalité

Introduction

synthétique pourrait être mieux exploitée et de multiples essais cliniques combinant les PARPi avec d'autres inhibiteurs sont en cours parmi les tumeurs solides: inhibiteurs de PI3K/Akt, « checkpoint inhibiteurs » et inhibiteurs de la protéine chaperonne HSP90 qui bloquent la conformation de la protéine BRCA1 et induisent sa dégradation par le protéasome [182].

A côté des mutations germinales, des mutations somatiques et des altérations épigénétiques peuvent inactiver les gènes BRCA ainsi que les autres gènes de réparation de l'ADN dans les cancers sporadiques induisant un phénotype « **BRCAness** » qui pour les cancers du sein ressemble fortement à celui du sous-type intrinsèque « Basal-like » [201]. Cependant, en s'intéressant à ces patients en situation métastatique ou néoadjuvante, les résultats sont contradictoires. Par exemple l'ORR au Carboplatine dans l'étude TNT des patients à haut score de déficience HR ou de phénotype basal n'est pas accru mais la déficience HR prédit par contre un taux de pCR plus élevé avec l'emploi de sels de platine en chimiothérapie néoadjuvante [182]. Ces contradictions pourraient être expliquées par un taux significativement moins élevé de méthylation des promoteurs de BRCA 1/2 dans les métastases que dans les tumeurs primaires ou par la sélection de clones capables de HR après l'administration des agents alkylants dans les TNBC précoces. La définition du statut BRCAness en génomique (définissant un score BRCAness) en est aussi une des pistes d'explication. Actuellement, il n'y a pas de biomarqueur prédictif permettant de guider le choix de la chimiothérapie pour des TNBC sporadiques basal-like qui représentent la majorité des TNBC. **Les caractéristiques menant à une sensibilité des BRCAness aux PARPi et agents lésant l'ADN doivent encore être comprises.** Enfin, les résultats de la cohorte TNBC avancés de l'étude TOPACIO (phase I/II) simple bras qui combine le Niraparib (PARPi) et le Pembrolizumab (« checkpoint inhibiteur ») montrent un ORR encourageant de 28% avec des réponses durables, indépendamment des statuts BRCA/PD-L1 ou d'une exposition préalable aux sels de platine bien qu'un ORR de 60% soit obtenu en cas de mutation BRCA1/2. Une autre étude de phase II (NCT02849496), randomisée, est en cours et compare, chez des patients TNBC métastatiques avec mutation BRCA, l'Olaparib ± Atezolizumab (« checkpoint inhibiteur »). Cette combinaison trouve ses bases rationnelles sur les observations *in vitro* (sur des cellules MDA-MB-231) de la majoration de PD-L1 après exposition aux PARPi et de resensibilisation de ces cellules aux PARPi lorsqu'on les combine aux « checkpoint inhibiteurs ». En outre, l'accumulation de lésions de l'ADN dans le cytosol cause une majoration de l'infiltrat immunitaire au niveau des cellules, indépendamment du statut mutationnel de BRCA [182].

9.3.5. Le recours à l'immunothérapie

De plus en plus de données indiquent que la présence de lymphocytes intra-tumoraux (TILs : « tumor infiltrating lymphocytes ») dans les TNBC représentent un biomarqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie tant en situation néoadjuvante [202] qu'en situation adjuvante où ils améliorent fortement la survie sans maladie et l'OS [203]. Les TNBC présentant un grand nombre de TILs sont considérés comme des « hot tumors » et répondent mieux aux « checkpoint inhibiteurs » en situation métastatique si on les compare aux « cold tumors » où le taux de TILs est moindre : ainsi dans leur étude publiée en Janvier 2019 s'intéressant au traitement par Atezolizumab, Emens et al. démontrent que la présence sur > de 10% de la surface tumorales de TILs entraîne un OS de 12,6 mois vs 6,7 mois si cela est ≤ 10%

Introduction

et que le marquage de PD-L1 (« Programmed death-ligand 1 ») sur ces TILs $\geq 1\%$ majore l'ORR et l'OS en comparaison à un marquage $< 1\%$ (respectivement 12% vs 0% et 10,1 mois vs 6 mois) [204].

La chimiothérapie peut faire passer du statut « cold-tumor » à « hot-tumor » comme cela a été démontré sur des biopsies de même tumeurs TNBC avant et après chimiothérapie néoadjuvante (fig 22). Dans cette étude une tumeur était considérée comme « hot » si les lymphocytes dans la tumeur et/ou le stroma $> 60\%$ de la surface. Le statut « hot tumor » après la chimiothérapie néoadjuvante y est associée à un meilleur pronostic et ce paramètre a été proposé comme un moyen nouveau d'évaluation de l'efficacité des agents de chimiothérapies en néoadjuvant et comme un marqueur identifiant les patients à haut risque de rechute [205]. Il a été constaté que la chimiothérapie augmente la libération d'antigènes tumoraux et que les taxanes en particulier peuvent augmenter l'activité Toll-like-Receptor et l'activité des cellules dendritiques [206].

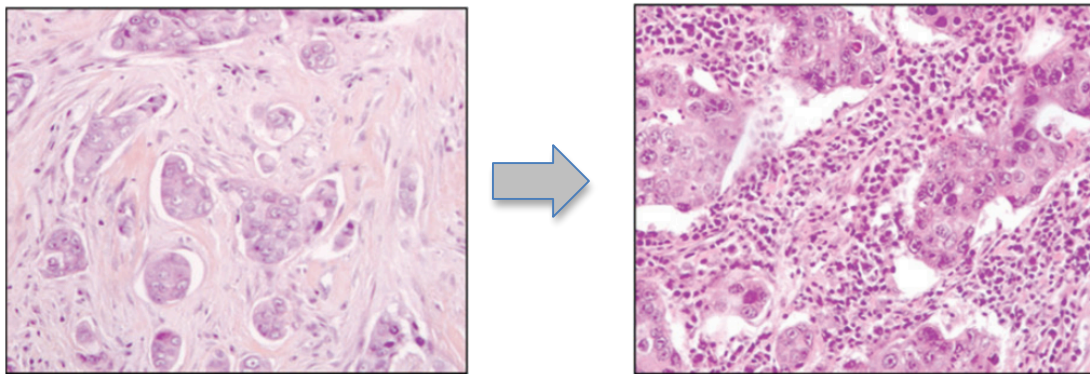


Fig 22 : Changement de la présence des lymphocytes intratumoraux avant chimiothérapie (à G : « cold tumor » sur biopsie à l'aiguille creuse) et après chimiothérapie (à D : « hot tumor » sur la maladie résiduelle). D'après Dieci et al. 2013 [205].

Toutes ces données, associées au constat d'une présence importante de PD-1/PD-L1 dans les TNBC (le PD-L1 étant surtout exprimé par les TILs) [207] a conduit à plusieurs essais thérapeutiques avec des « checkpoint inhibiteurs ». Ceux-ci semblent surtout prometteurs en combinaison avec la chimiothérapie. (PD-1 : « Programmed cell-death 1 »).

Les résultats de l'étude randomisée IMpassion 130 (phase III) ont été publiés fin 2018. Elle s'intéresse à l'ajout de l'Atezolizumab au Nab-Paclitaxel en 1^{ère} ligne métastatique de TNBC. Le Nab-Paclitaxel a été choisi afin de ne pas devoir utiliser de corticoïdes en prémédication comme cela aurait été le cas avec le Paclitaxel : en effet, au moment de l'initiation de l'étude, la communauté scientifique pensait que les corticoïdes réduisaient l'efficacité des « checkpoint inhibiteurs ». Dans cette étude, la population totale est stratifiée selon que l'IHC démontre ou non un taux de PD-L1 $\geq 1\%$ au niveau des cellules immunitaires. L'addition de l'Atezolizumab au Nab-Paclitaxel prolonge l'OS tant dans la population totale (21,3 mois vs 17,6 mois) que dans le sous-groupe PD-L1 positif (25 mois vs 15,5 mois) sans que cela ne soit statistiquement significatif ($p = 0,08$ dans les deux cas). La PFS est en revanche significativement augmentée par l'ajout d'Atezolizumab tant dans la population totale (7,2 mois vs 5,5 mois ; $p = 0,002$) que dans le sous-groupe PD-L1 positif (7,5 mois vs 5 mois ; $p < 0,001$). L'ORR est également significativement plus élevée en cas de traitement incluant l'Atezolizumab, à nouveau pour la

Introduction

population totale (56% vs 45,9 % ; $p = 0,002$) et le sous-groupe PD-L1 positif (58,9% vs 42,6% ; $p = 0,002$) [163]. Une analyse complémentaire des patients PD-L1 négatifs n'a révélé aucune différence en terme d'OS ou PFS [208]. A la lecture de cette étude, le marquage PD-L1 à l'IHC n'est pas un biomarqueur prédictif optimal de réponse à l'immunothérapie. En effet, certaines patientes PD-L1+ ne répondent pas à l'immunothérapie à l'inverse de certaines patientes avec une tumeur négative pour PD-L1. Des efforts considérables sont dès lors effectués en génomique/transcriptomique pour déterminer des biomarqueurs prédictifs que ce soit au niveau des cellules tumorales ou stromales [182]. D'autres études sont en cours et il conviendra de déterminer si la combinaison chimiothérapie-immunothérapie est efficace au delà de la 1^{ère} ligne métastatique. Remarquons néanmoins que des ORR accrus ont été observés avec l'immunothérapie en monothérapie chez des patientes métastatiques indemnes de tout traitement **suggérant de l'employer précocement** [209].

9.3.6. Agir au niveau épigénétique

L'étude de Roll et al. a démontré sur des tumeurs humaines que les TNBC, les tumeurs « Basal-like » et les « Claudin-low » présentent plus fréquemment que les autres cancers mammaires une hyperméthylation des promoteurs de gènes eux-mêmes impliqués dans le contrôle épigénétique de la transcription de nombreux gènes. En conséquence, les TNBC n'expriment pas ou plus faiblement les protéines correspondantes à ces gènes et la régulation de nombreux autres gènes y est perdue [182]. Par ailleurs, ils ont montré que les patients aux cancers caractérisés par une hyperméthylation aberrante de leur ADN vont présenter une moindre survie sans récurrence et ce peu importe le sous-type moléculaire ou le stade du cancer. Jusqu'à 60% des cancers « Basal-like » et 80% des « Claudin-low » ont ainsi cette hyperméthylation [210]. Des différences en termes d'hypométhylations et donc d'augmentation d'expression de gènes défavorables et de modifications d'histones sont également retrouvées entre les différents cancers du sein et concernent fréquemment les TNBC [182].

Jusqu'à présent, les thérapies ciblant les modifications épigénétiques ont été décevantes dans le TNBC. Les études concernaient des inhibiteurs de méthyltransférases de l'ADN (DNMT) comme la Décitabine ou la 5-Azacitidine et des inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC) tels que l'Entinostat et le Vorinostat y compris en combinant les 2 types d'inhibiteurs en cas de TNBC métastatique où aucune réponse n'a été objectivée parmi les 13 patientes traitées en phase II [182].

De nouvelles approches ciblant l'épigénétique sont en cours de développement. Par exemple, un intérêt est porté aux protéines BET à bromodomains (BET : Bromodomain and Extra-Terminal domain) : ces protéines lient les résidus lysine acétylés des histones via ces bromodomains et favorisent la transcription de gènes proches. Les inhibiteurs de ces protéines réduisent cette activité transcriptionnelle par compétition pour les résidus lysine acétylés. Ces inhibiteurs parviennent à réduire fortement la croissance dans des lignées cellulaires de TNBC caractérisées par des aspects « Basal-like » ou « Claudin-low » [211]. Plusieurs de ces inhibiteurs sont actuellement aux premières étapes de la validation clinique, soit en monothérapie, soit en combinaison avec l'immunothérapie (NCT01587703, NCT02391480, and NCT02711137) [182].

Introduction

9.4. En conclusion

Les efforts considérables menés par la communauté scientifique internationale ont permis de mieux comprendre les TNBC. Précédemment considéré comme un seul type de cancer, il s'agit en réalité d'un ensemble de cancers du sein très différents les uns des autres au niveau moléculaire et qui partagent une absence d'expression des récepteurs hormonaux et de surexpression de l'HER2.

De multiples pistes de traitement existent et il conviendra de définir avec précision les patientes pouvant bénéficier au mieux de ces nouvelles stratégies thérapeutiques dans les TNBC.

Avec le séquençage des tumeurs, des cibles potentielles ont été identifiées et représentent un réel espoir de traitement des TNBC lorsqu'elles sont partagées par le plus grand nombre possible de patientes. L'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), étant exprimé par une majorité de TNBC, a rapidement suscité de l'intérêt, d'autant que des thérapies ciblées dirigées contre ce récepteur existaient déjà et étaient employées dans d'autres cancers.

Le chapitre suivant traite donc de l'EGFR et des essais cliniques employant les anti-EGFR seuls ou en combinaison avec la chimiothérapie dans les TNBC.

10. L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Chez l'humain, la famille des protéines ErbB est composée de 4 récepteurs, de type tyrosine kinase, qui sont liés par différents facteurs de croissance dont essentiellement le facteur de croissance épidermique (EGF). Le terme ErbB fait référence à l'homologie des gènes codant ces protéines avec l'oncogène viral v-ErbB de la leucémie érythroblastique aviaire. Le premier récepteur de cette famille découvert, ErbB1, a ainsi été appelé EGFR ou encore « HER1 » (Human Epidermal growth factor Receptor 1). Plus tard, les autres membres de la famille ErbB ont été identifiés et structurellement rapprochés de l'EGFR. Le terme « EGFR » fut cependant consacré pour désigner un seul récepteur. Les autres membres ont donc été appelés HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4).

10.1. Structure et ligands des récepteurs ErbB

Les récepteurs ErbB présentent donc une structure commune avec un domaine extracellulaire qui interagit avec le ligand et se subdivise en 4 sous-domaines, un domaine transmembranaire, un domaine cytoplasmique de type « tyrosine kinase » et une queue C-terminale aux sites multiples de phosphorylation (fig 23) [212–214].

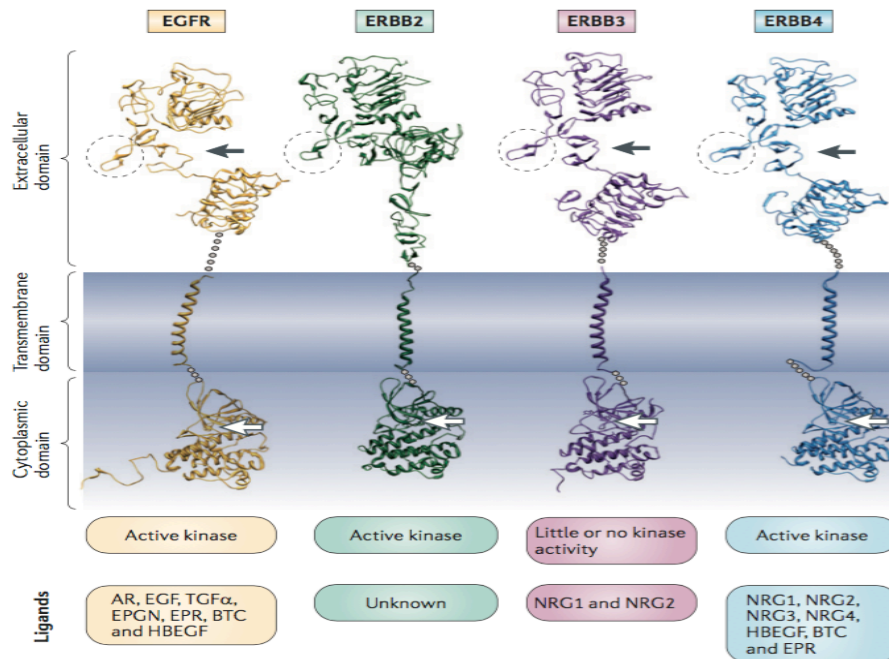


Fig 23 : Structure et ligands des récepteurs ErbB. Le site de liaison du ligand est indiqué par la flèche noire, la boucle de dimérisation par le cercle pointillé et le site de liaison de l'ATP par la flèche blanche. AR = Amphiréguline, BTC = Bêtacelluline, EGF = Facteur de croissance épidermique, EPGN= Epigène, EPR = Epiréguline, HBEGF : Heparin-binding EGF-like growth factor, NRG : Neuroréguline TGF- α = Transforming growth factor α . D'après Yarden et al., 2012 [214].

Des isoformes solubles de l'EGFR ont également été identifiées. Issues d'un clivage protéolytique ou d'un épissage alternatif, elles sont constituées du seul domaine extracellulaire de l'EGFR et peuvent être mesurées dans des fluides biologiques tels que le sérum ou le plasma. Elles sont augmentées dans les cancers. Il semble que ces isoformes ont un potentiel prometteur en tant que biomarqueur de réponse à des thérapies anti-EGFR mais leur implication dans la genèse ou l'agressivité du cancer reste à déterminer. Pour certains auteurs,

Introduction

elles seraient un biomarqueur positif en cas de cancer surexprimant l'EGFR. Pour d'autres, il s'agit de molécules physiologiques ayant un rôle protecteur dans le contrôle de la signalisation médiée par l'EGFR [215–218].

Les ligands des récepteurs ErbB sont les facteurs de croissance de la famille de l'EGF [219–221] subdivisables en 4 groupes selon le(s) récepteur(s) qu'ils lient (tab 9). Aucun ligand n'a encore été identifié pour l'HER2 [222–224]. Ces facteurs de croissance partagent une structure commune : présence d'une pro-région à l'extrémité N-terminale, d'un ou plusieurs motifs EGF assurant la liaison au(x) récepteur(s), d'une région juxtamembranaire, d'un domaine transmembranaire hydrophobe et d'une queue intracytoplasmique à l'extrémité C-terminale. L'amphiréguline (AREG) et l'HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor) sont en outre munis d'un site de liaison à l'héparine, permettant une association aux protéoglycans de la matrice extracellulaire et stabilisant leur interaction avec l'EGFR [225]. Etant donné qu'ils sont initialement synthétisés en tant que précurseurs transmembranaires, un clivage protéolytique doit survenir pour qu'ils agissent en tant que forme soluble mature. Après ce clivage effectué par des métalloprotéinases matricielles, au premier rang desquelles on retrouve les ADAMs, les ligands interagissent avec les récepteurs de manière endocrine, paracrine ou encore autocrine [226–228]. Certains précurseurs activent leur(s) récepteur(s) de manière juxtacrine en restant ancrés à la membrane : c'est le cas de la bêtacelluline, du TGF- α (« transforming growth factor α »), de l'AREG et de l'HB-EGF [229–234].

Récepteur(s) concerné(s)	Ligands
EGFR seulement	EGF, TGF- α , Amphiréguline, Epigène
EGFR et HER4	Bêtacelluline, HB-EGF, Epiréguline
HER3 et HER4	Neurorégulines 1 et 2
HER4 seulement	Neurorégulines 3 et 4

Tab 9 : Les ligands des récepteurs ErbB. D'après Hubert P, 2006 [313].

10.2. Activation, internalisation des récepteurs ErbB

Suite à la liaison du ligand, le récepteur change de conformation et des hétéro- ou homodimères se forment (fig 24). L'HER2 est le partenaire d'hétérodimérisation le plus fréquent. L'activité tyrosine kinase des récepteurs ErbB est accrue par la dimérisation et est la plus forte en cas d'hétérodimérisation HER3/HER2 [235]. Selon le ligand et le partenaire de dimérisation, différents résidus tyrosine sont « autophosphorylés » au niveau du domaine intracellulaire. En effet, le profil de résidus phosphorylés détermine ensuite les effecteurs recrutés au niveau du récepteur. Ceux-ci sont pourvus de domaines SH2 (« Src homology 2 ») ou PTB (« Phosphotyrosine Binding ») assurant la liaison au récepteur et l'initiation de cascades de signalisation intracellulaire dont les principales sont les voies Ras/Ras/MEK/MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinase »), PI3K/Akt/mTOR, JAK2/STAT3 et de la PLC γ Phospholipase C γ) [236]. De médiateur en médiateur, ces voies aboutissent à l'activation de facteurs de transcription qui entraînent l'expression de protéines impliquées dans la différenciation, la prolifération, la survie, l'invasion, la migration, l'adhésion cellulaire et l'angiogenèse [214, 237–239]. Une stimulation est nécessaire pour assurer certaines fonctions physiologiques. Dans les cancers, elle est excessive (vide infra).

Introduction

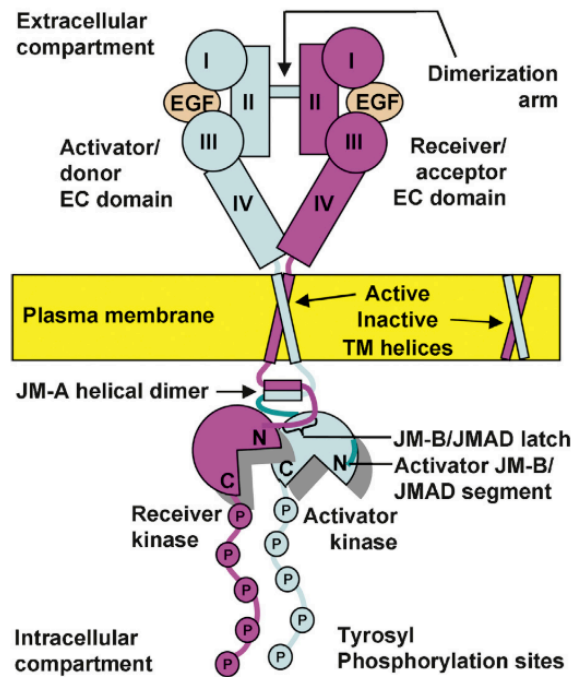


Fig 24 : Dimérisation de l'EGFR. Le ligand se lie aux domaines extracellulaires I et III du récepteur libérant les domaines II et IV qui vont former des ponts disulfures entre les dimères au niveau extracellulaire. Dans le cytoplasme, la dimérisation est stabilisée par les segments juxtamembranaires JM-A. Les deux domaines de tyrosine kinase forment un dimère asymétrique, le lobe C-terminal (C) de l'activateur/donneur kinase (cyan) interagissant avec le lobe N-terminal (N) de la kinase récepteur/accepteur (magenta), conduisant à l'activation de ce dernier. D'après Roskoski, 2014 [237].

L'EGFR possède en outre des effets cellulaires directs indépendants de l'activité kinase via des interactions avec d'autres protéines membranaires ou intracytoplasmiques à proximité. Ainsi, l'EGFR peut réduire les fonctions pro-apoptotiques de la protéine PUMA (p53-Upregulated Modulator of Apoptosis) en empêchant son passage dans la mitochondrie [240]. Par ailleurs, l'EGFR peut stabiliser le SGLT1 (Sodium-Glucose Linked Transporter 1) (« Sodium-Glucose Linked Transporter 1 ») et favoriser la survie cellulaire en augmentant la concentration de glucose intracellulaire (fig 25) [241, 242].

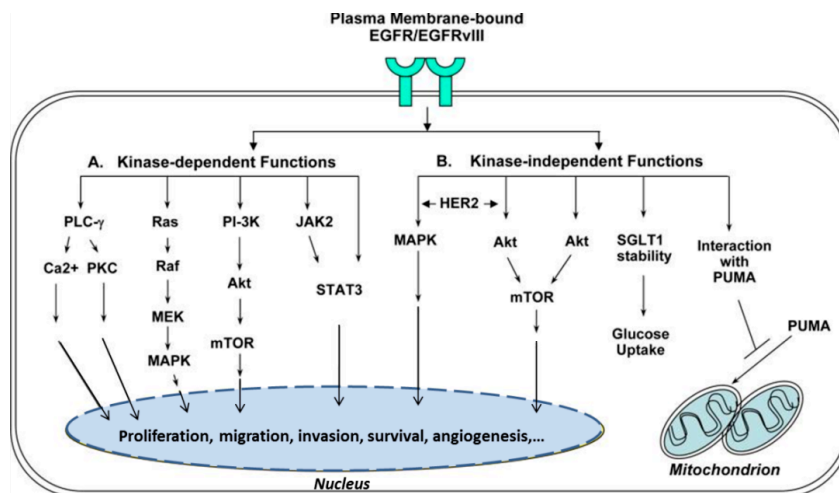


Fig 25 : Les principales voies de signalisation de l'EGFR, dépendantes (A) ou non (B) de ses fonctions kinases. D'après Han, 2012 [242].

Introduction

A la suite de leur activation par un ligand, les récepteurs ErbB sont endocytés et les vésicules d'endocytose fusionnent avec des endosomes. L'EGFR est principalement endocyté via les clathrines [243] mais la voie des cavéoles peut également intervenir et cela est fonction du ligand [244]. Dès lors, en cas de perte d'expression des clathrines, l'endocytose de l'EGFR est totalement absente en réponse à une stimulation par l'EGF alors que celle induite par d'autres ligands comme la bêtacelluline ou l'HB-EGF (Heparin-Binding EGF) n'est que partiellement affectée [245]. Le mode d'endocytose de l'EGFR est en outre influencé par la concentration des ligands : si de faibles concentrations favorisent l'endocytose médiée par les clathrines et son recyclage à la surface cellulaire, de plus fortes concentrations entraînent une endocytose indépendante des clathrines et sa dégradation [246–248].

Le sort de l'EGFR après internalisation a été particulièrement étudié : il peut être recyclé à la surface membranaire, être dégradé par les lysosomes ou encore être dirigé vers le noyau (translocation rétrograde) ou la mitochondrie [249, 250]. Ce devenir est déterminé par la nature du ligand et des effecteurs recrutés :

- sa dégradation est essentiellement consécutive à sa liaison par l'EGF et le recrutement de l'effecteur Cbl qui mène à son ubiquitination et sa dégradation [251–253] mais elle peut également survenir en cas d'activation par la bêtacelluline et l'HB-EGF.
- l'activation par le TGF- α favorise son recyclage membranaire [254].
- une translocation rétrograde vers le noyau à travers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique peut également survenir [255]. L'EGFR y exerce différents rôles :
 - il est un régulateur transcriptionnel de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (cyclin D, B-Myb, cMyc,...), la dissémination métastatique (iNOS = inducible Nitric Oxide Synthase), l'inflammation (COX2 = Cyclo-Oxygenase II) et la résistance aux traitements anti-cancéreux (BCRP = Breast Cancer Resistant Protein) [256–259].
 - il interagit avec la protéine kinase DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase). Si celle-ci peut protéger les cellules cutanées des irradiations des rayons X et ultraviolets, elle protège aussi les cellules tumorales des agents alkylants et des rayons lors de la radiothérapie [260, 261].
 - il phosphoryle et stabilise la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) qui favorise la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN [262].
- une translocation vers la mitochondrie peut aussi avoir lieu où son accumulation réduit la réponse apoptotique et induit des résistances aux agents anti-cancéreux [263, 264].

Enfin, remarquons que si le partenaire de prédilection de l'EGFR est HER2, l'EGFR peut aussi être activé par d'autres protéines membranaires comme les intégrines ou les récepteurs couplés à la protéine G. La stimulation de l'EGFR survient alors par le recrutement et l'activation de tyrosines kinases intracellulaires ou par l'activation des métalloprotéinases matricielles par des récepteurs couplés à la protéine G qui assurent la libération de ligands actifs (HB-EGF) [265].

Introduction

10.3. Rôles physiologiques de l'EGFR

Via ces différentes voies cellulaires, les récepteurs ErbB contribuent à la différenciation, la survie, la prolifération et la migration de multiples types cellulaires. Des modèles murins d'inactivation des gènes de ces récepteurs ou de leurs ligands démontrent leur rôle fondamental dans le développement des glandes mammaires, du système cardiovasculaire (surtout l'HER2), du système nerveux (neurorégulines et leurs récepteurs : HER3 et HER4) ou encore des poumons, des os et des épithéliums dont surtout la peau [221, 266]. La durée de vie des souris EGFR-déficientes ne dépasse pas 8 jours [221]. S'ils sont donc primordiaux dans l'embryogenèse, ils demeurent essentiels au bon fonctionnement des organes et tissus à l'âge adulte. Cela est d'ailleurs souligné par la toxicité cardiaque du Trastuzumab (anti-HER2) ou cutanée des anti-EGFR tels que l'Erlotinib, le Cétuximab ou le Panitumumab [221] et le défaut de leur signalisation a été également relié à des maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaques ou la maladie d'Alzheimer [267].

10.4. Implication de l'EGFR dans le cancer

L'expression d'EGFR est retrouvée dans plus d'une tumeur solide sur trois et confère un caractère en général plus agressif avec un moindre pronostic de ces tumeurs [224, 268–272]. Contrairement à l'HER2 dont l'activation oncogénique dans les cancers humains repose dans 95 à 98% sur une amplification génique puis une surexpression, différents modes d'activation oncogénique de l'EGFR sont retrouvés (fig 26) [273–275] :

- la surexpression du récepteur. A l'état normal, une cellule exprime à sa surface 40.000 à 100.000 récepteurs EGFR. Certaines lignées cancéreuses en expriment des millions et ce dû à une amplification que l'on peut observer dans près de 24% des TNBC, une augmentation de transcription ainsi qu'une stabilisation du récepteur par blocage de l'internalisation et de sa dégradation [274, 276].
- les mutations du gène du domaine extracellulaire ou intracellulaire (dont la partie tyrosine kinase). Elles entraînent l'expression d'un récepteur tronqué constitutionnellement activé et résistent aux systèmes de régulation physiologiques tels que la dégradation lysosomiale [277, 278]. Il en va ainsi en cas de délétion du domaine extracellulaire (mutation vIII des glioblastomes, cancers du sein, de la prostate ou du poumon non à petites cellules) ou de mutations ponctuelles au niveau du domaine tyrosine kinase (mutations activatrices des cancers du poumon) [274, 279]. Dans les TNBC, le taux de mutations de l'EGFR avoisine les 10%. Elles concernent surtout les populations asiatiques et incluent principalement la délétion de l'exon 19 et la substitution L858R (substitution d'une leucine par une arginine) dans l'exon 21. Ces mutations correspondent au site intracellulaire de liaison de l'ATP et entraînent une activation continue de l'EGFR sans nécessité de stimulation par un ligand [279].
- la production excessive de ligands. Elle conduit à une stimulation autocrine accrue du récepteur. Ceci est notamment observé pour le TGF- α dans les tumeurs ORL et pulmonaires. La coexpression de TGF- α et d'EGFR est retrouvée dans de nombreux cancers et est de mauvais pronostic en cas de cancer du sein invasif [268, 280].

Introduction

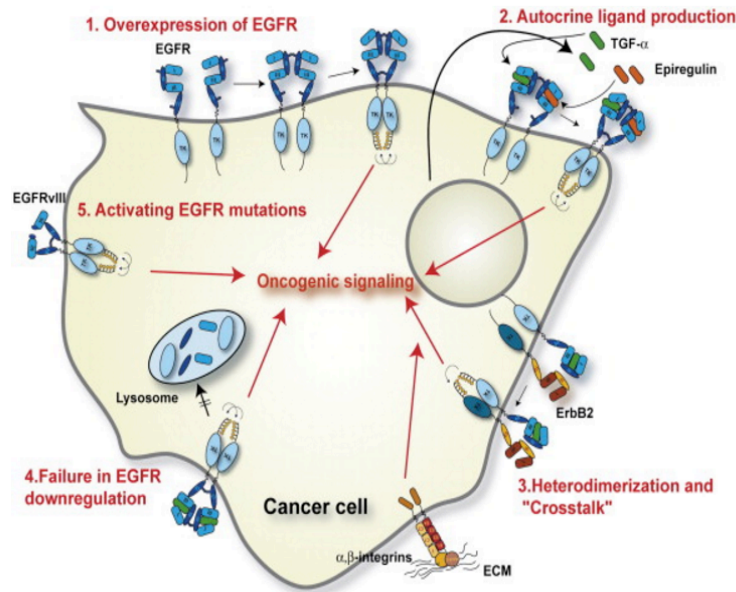


Fig 26 : Les mécanismes conduisant à la signalisation oncogénique de l'EGFR incluent (1) une augmentation de l'expression de l'EGFR, (2) une stimulation autocrine du récepteur, (3) une transactivation de l'EGFR, (4) une dérégulation de la dégradation de l'EGFR et (5) une mutation favorisant l'activation constitutive du récepteur. ECM: « Extracellular Matrix ». D'après Zandi et al., 2007 [275].

10.5. Traitements ciblés contre l'EGFR dans les TNBC

Selon les séries, l'expression de l'EGFR dans les TNBC est retrouvée dans 50-75% [172]. Elle péjore le pronostic des TNBC, surtout si le nombre de copies d'EGFR est élevé. L'évaluation du nombre de ses copies a été suggérée pour prédire le devenir des patientes atteintes de TNBC et les sélectionner pour leur administrer des thérapies ciblées anti-EGFR. L'EGFR a donc été considéré comme une cible intéressante pour les TNBC, d'autant que l'on dispose depuis plusieurs années de thérapies ciblées contre ce récepteur. Il s'agit d'anticorps monoclonaux ou d'inhibiteurs tyrosine kinase (TKI) que l'on utilise déjà en routine dans les cancers colorectaux, ORL et pulmonaires ou mammaires HER2+ (Lapatinib qui est dirigé tant contre l'EGFR et que l'HER2).

10.5.1. Les anticorps monoclonaux anti-EGFR

On retrouve parmi eux le Cétuximab et le Panitumumab, anticorps monoclonaux respectivement chimérique et totalement humain, qui se lie au domaine extracellulaire de l'EGFR empêchant la liaison de ligands et la dimérisation du récepteur.

1° TNBC localement avancé ou métastatique

L'étude BALI-1 menée par **Baselga J.**, dont les résultats initiaux furent présentés à la conférence ESMO en 2010, représente la première étude de phase II démontrant des résultats intéressants avec un anticorps monoclonal anti-EGFR chez des patientes atteintes de TNBC. En effet des patientes atteintes de TNBC métastatiques et prétraitées par maximum une ligne de chimiothérapie ont été randomisées selon une répartition 2/1 soit dans un bras comprenant du Cétuximab et du Cisplatine, soit dans un bras avec le seul Cisplatine. Le taux de réponse est double si on emploie également le Cétuximab (ORR de 20% vs 10,3%) et la PFS est de 3,7 mois pour la combinaison vs 1,5 mois pour le seul Cisplatine ($p=0,032$) [281, 282].

Introduction

Néanmoins, un taux de réponse de 32% était visé avec la combinaison et son utilisation fut abandonnée dans cette indication. Un taux de réponse de seulement 16% est obtenu dans une autre étude de phase II chez des patientes également atteintes de TNBC métastatique, publiée par **Carey et al.** en 2012, en combinant du Cétuximab avec du Carboplatine. Dans cette étude, des biopsies furent réalisées au jour 0 et à une semaine de traitement sous Cétuximab chez 18 patientes. Une analyse génomique montre la persistance de l'activation des voies de l'EGFR chez 13 de ces patientes suggérant une activation alternative de ces voies par des mécanismes indépendants de la liaison de l'EGFR par ses ligands [283]. L'activité du Cétuximab avec le Carboplatine combiné à l'Irinotécan en cas de TNBC avancé est démontrée par une étude de phase II publiée par **O'Shaughnessy et al.** en 2007 où l'ORR est de 49% chez les patientes atteintes de TNBC avancé contre 25% en cas de cancer du sein avancé autre que triple-négatif. Cependant, les gains de survie en comparaison à la seule chimiothérapie étaient trop ténus et les effets secondaires de l'Irinotécan et du Carboplatine étaient fortement accrus par le Cétuximab (neutropénie, thrombocytopenie et diarrhée) [284]. La combinaison du Cétuximab au seul Irinotécan permet d'obtenir un ORR à 18% en cas de TNBC avancé contre 0% pour les cancers du sein avancé autres que triple négatif dans l'étude publiée par **Crozier et al** [285]. Enfin, une étude clinique de phase II sur l'Ixabepilone (inhibiteur du fuseau mitotique) combiné ou non au Cétuximab chez des patientes avec un TNBC avancé ou métastatique a été effectuée par **Tredan et al.** : le Cétuximab n'améliorait ni le taux de réponse ni la PFS [286].

En situation métastatique, les anticorps monoclonaux anti-EGFR n'ont jusqu'à présent pas entraîné d'amélioration franche en terme de ORR ou PFS. D'autres études au moins en phase II sont actuellement en cours ou en situation inconnue selon le site internet clinicaltrials.gov et testent en situation avancée le SCT 200 (nouvel anticorps anti-EGFR totalement humain), l'ajout de Nimotuzumab à des agents de chimiothérapie ou encore l'emploi d'anticorps conjugués anti-EGFR couplés à immunoliposomes riches en Doxorubicine (NCT02833766) [287].

2° En néoadjuvant

Deux études de phase II ont été menées par **Nabholtz et al.** en situation néoadjuvante. En 2014, ils ont démontré que l'association de 8 cycles de Panitumumab toutes les 3 semaines à 4 cycles de FEC 100 toutes les 3 semaines (5-Fluorouracile Epirubicine Cyclophosphamide) puis 4 cycles de Docétaxel 100 mg/m² permet d'obtenir des taux de réponse pathologique complète (pCR) de 46,8% ou 55.3% suivant que les résultats soient analysés selon Chevalier ou Sataloff. Par ailleurs, une haute expression d'EGFR associée à une faible expression des cytokératines 8/18 et une haute présence de TILs CD8+ est corrélée à un plus haut taux de pCR [288]. Dans leur seconde étude, publiée en 2016, ils ont combiné du Cétuximab hebdomadaire avec six cycles de Docétaxel 100 mg/m² toutes les 3 semaines. Le taux de pCR n'était que de 24%. Un haut ratio TILs CD8+/TILs FOXP3 y est démarqué comme un biomarqueur prédictif de pCR. Pour rappel, la protéine FOXP3 est exprimée par les lymphocytes T régulateurs qui réduisent l'activité de nombreuses cellules immunitaires comme les lymphocytes T CD8+, les natural killers, les lymphocytes B et les cellules présentatrices d'antigènes [289]. **En situation néoadjuvante, leur ajout ne permet pas d'obtenir des taux de pCR bien supérieurs à ceux obtenus avec des schémas dose-dense avoisinant les 38% [288].**

Introduction

10.5.2. Les inhibiteurs tyrosine-kinase

Les inhibiteurs tyrosine kinase (TKI) agissent en intracellulaire par blocage du site de liaison de l'ATP à son domaine catalytique. Les inhibiteurs anti-EGFR sont par exemple l'Erlotinib, le Gécitinib, l'Afatinib ou encore le Lapatinib (qui a également une activité anti-HER2). A l'inverse des anticorps monoclonaux, ils sont donc capables d'inhiber également les formes tronquées de l'EGFR. Par ailleurs, leur petite taille leur permet de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'agir sur les lésions intracérébrales. Plusieurs études cliniques ont été menées afin d'évaluer leur place dans la prise en charge des cancers du sein. Les résultats se sont avérés décevants. Baselga et al. ont démontré en 2005 que le Gécitinib n'avait qu'une faible activité en monothérapie dans une étude de phase II sur des patientes atteintes de cancer du sein métastatique [290]. Von Minckwitz et al. sont arrivés, la même année, à une conclusion identique utilisant le Gécitinib chez des patientes atteintes de cancer du sein en situation métastatique et prétraitées par des anthracyclines et des taxanes en 2005 [291]. Ces 2 études concordent avec les résultats de l'étude de phase II de Dickler et al. employant l'Erlotinib dans la même indication [292]. Ces études permettaient uniquement d'obtenir des réponses partielles de seulement 0 à 3%. Il convient de signaler que, dans ces études, les patientes n'étaient pas sélectionnées sur base de la présence de mutations activatrices de l'EGFR. Cependant, le taux de ces mutations ne dépasse de toute façon pas les 10% dans les TNBC [279, 281]. L'Afatinib, TKI de seconde génération inhibant de manière irréversible l'EGFR, a lui aussi été testé en monothérapie chez des patientes atteintes de TNBC métastatique par **Schuler et al.**: aucune réponse n'a été observée [293]. La combinaison de TKI anti-EGFR avec de la chimiothérapie a aussi été investiguée. Ainsi **Layman et al.** ont combiné l'Erlotinib à la Bendamustine en phase I chez des patientes atteintes de TNBC de stades III et IV. La toxicité de cette combinaison (lymphopénie sévère et prolongée) a été très marquée et elle a dès lors été abandonnée [294]. **Bernsdorf et al.**, ont testé, en situation néoadjuvante, le Gécitinib combiné à de l'Epirubicine et au Cyclophosphamide chez des patientes atteintes de cancers du sein n'exprimant pas les récepteurs aux oestrogènes. Ils n'ont pas obtenu de différence de pCR en ajoutant le Gécitinib [295].

L'efficacité des TKI anti-EGFR en cas de TNBC reste donc hypothétique. Les études les utilisant n'ont cependant pas sélectionné les patients sur base de marqueurs [290, 292].

10.6. En conclusion

Les thérapies ciblant l'EGFR se sont avérées décevantes en monothérapies ou en combinaison à la chimiothérapie dans les différentes études menées pour le traitement des TNBC. Néanmoins, aucun critère de sélection des patients n'a été établi dans ces études et il n'a pas été envisagé de réaliser des études les employant en combinaison avec d'autres modalités que la chimiothérapie. Dans le chapitre suivant, la MT4-MMP est décrite : notre laboratoire a récemment découvert son rôle de partenaire de l'EGFR à la surface cellulaire dans les TNBC et a investigué son potentiel rôle de biomarqueur prédictif de réponse aux thérapies anti-EGFR.

Introduction

11. La MT4-MMP (=MMP-17) dans les TNBC

La MT4-MMP (ou MMP17) appartient à la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP). Les MMPs, également appelées matrixines, sont tout comme les ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) membres de la superfamille des metzincines. Elles exercent un rôle physiologique fondamental dans le remodelage de la matrice extracellulaire et leur implication est reconnue de l'embryogenèse-organogenèse à la cicatrisation en passant par le remodelage vasculaire [296, 297]. En outre, les MMPs régulent l'inflammation et l'immunité innée en agissant notamment sur les cytokines pro-inflammatoires et les chemokines [298]. L'ensemble des MMPs peut cliver à peu près tous les composants de la matrice extracellulaire et il n'est dès lors pas surprenant de les retrouver surexprimées dans de nombreux cancers et engagées dans les différentes étapes de la carcinogenèse (fig 27) [299, 300].

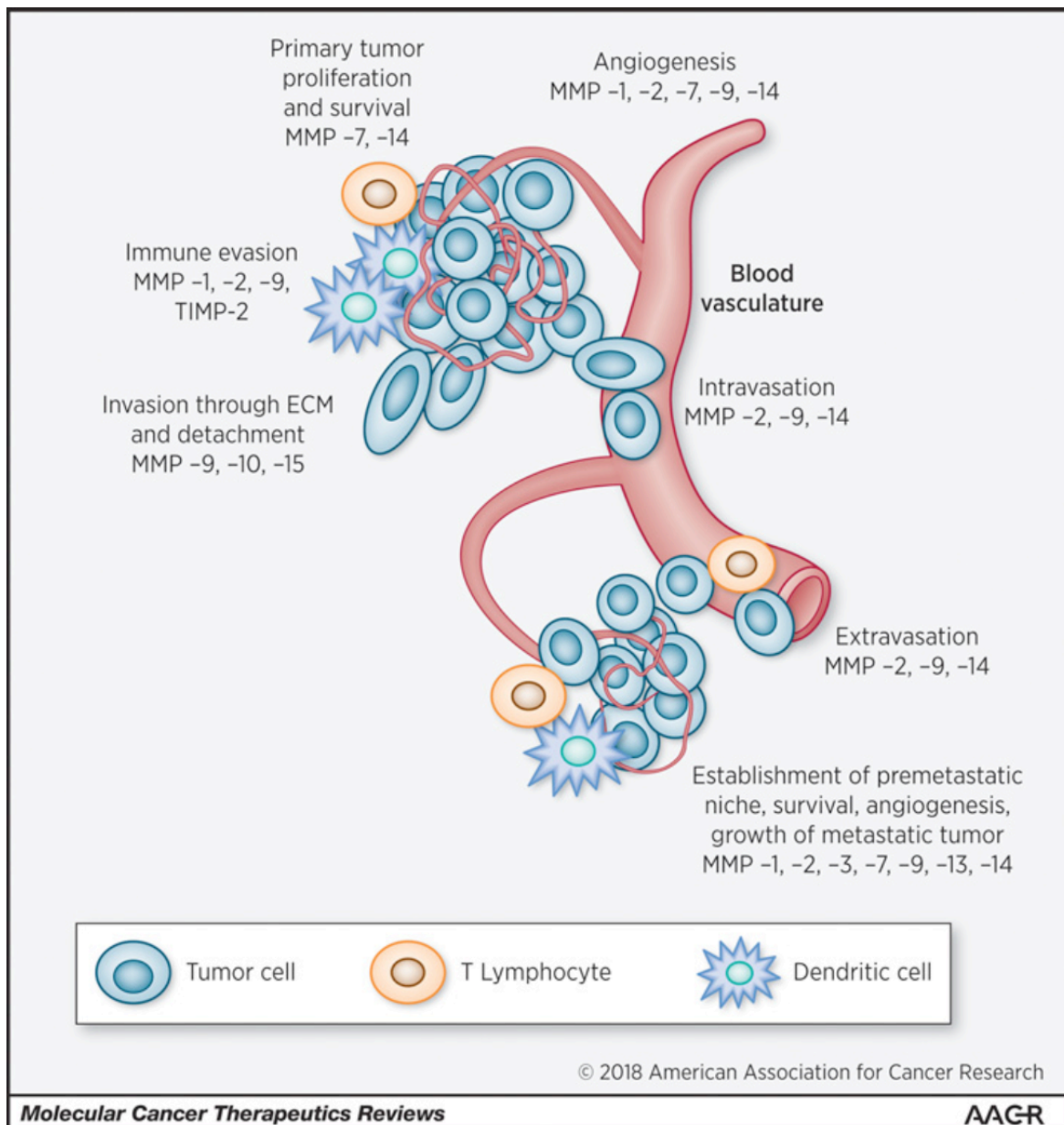


Fig 27: Rôles des MMPs dans la progression tumorale, l'invasion et les métastases. D'après Winer et al., 2018 [299].

Introduction

11.1. Classification des matrix métalloprotéinases

Les MMPs, dont 24 membres sont actuellement identifiés, sont des endopeptidases présentant un ion zinc au niveau du domaine catalytique. Elles peuvent être classées selon leur rapport à la membrane cellulaire [301, 302]. Nous pouvons ainsi distinguer (fig 28) :

- les **formes solubles** : les plus fréquentes, sécrétées dans le microenvironnement extracellulaire : MMP-1,-2,-3,-7,-8,-9,-10,-11,-12,-13,-19,-20,-21,-22,-27 et -28.
- les formes de type membranaire, dites aussi **MT-MMP** (membrane-type MMP) différenciables par leur type d'ancrage à la membrane qui peut être :
 - un **domaine transmembranaire de type I** : MMP-14,-15,-16 et -24.
 - une **ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI)** : MMP-17 (ou MT4-MMP) et -25 (MT6-MMP).
 - un **peptide signal amino-terminal** (domaine transmembranaire de type II) : MMP-23A et 23B.

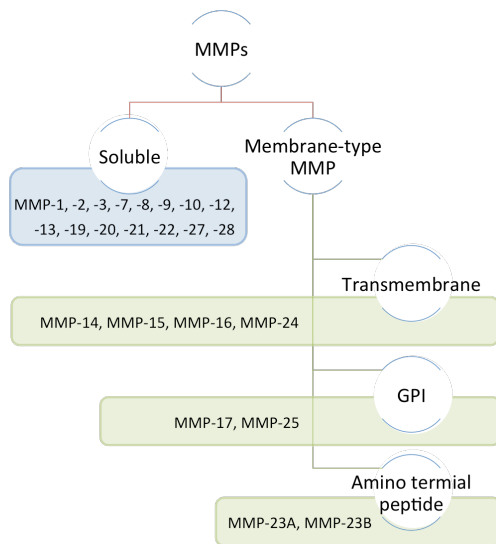


Fig 28 : Classification des différentes Matrix Metalloproteinases (MMPs) selon leur structure. D'après Yip et al., 2019 [302].

Quatre domaines constituent leur structure archétype [302]:

- le **pré-domaine** du côté N-terminal permet l'adressage vers le réticulum endoplasmique.
- le **pro-domaine** maintient l'enzyme inactive grâce à son motif « PRCGxPD » dont le groupe SH du résidu cystéine interagit avec l'atome de zinc du site catalytique, empêchant ainsi le lien à une molécule d'eau.
- le **domaine catalytique** identifie et clive des substrats. Il possède une séquence « HExxHxxGxxH » assurant par ses résidus histidine l'union à l'ion zinc, lequel facilite la liaison de molécules d'H₂O qui permettent la réaction d'hydrolyse des peptides et substrats [303]. Sa boucle hydrophobe « Met-turn » (methionin turn) est indispensable à sa conformation tridimensionnelle [304, 305].
- le **domaine hémopexine** impliqué dans les interactions protéiques, la reconnaissance des substrats et la liaison d'inhibiteurs.

Le pro-domaine et le domaine catalytique sont hautement conservés entre les différentes MMPs, ce qui complexifie le développement d'inhibiteurs synthétiques spécifiques.

Introduction

Les MMPs peuvent être également classées selon leur structure et substrats (fig 29) [301] :

- les **collagénases** (MMP-1, -8 et -13) agissent sur les triples hélices de collagène fibrillaire de types I, II et III.
- les **stromélysines** (MMP-3 et -10) clivent la fibrine, la gélatine, les protéoglycans, la laminine, les collagènes de type III, IV, IX et X, et d'autres pro-MMPs.
- les **gélatinases** (MMP-2, et -9) possèdent au niveau de leur domaine catalytique un motif fibronectine de type II liant le collagène et la gélatine. Elles activent d'autres MMPs et mènent à la dégradation de la forme dénaturée des collagènes, du collagène de type IV ou encore de molécules de signalisation comme les chémokines.
- les **matrylisines** (MMP-7 et -26) dénuées de domaine hémopexine et qui dégradent la fibrine, le collagène IV et les protéoglycans.
- enfin, nous retrouvons les MMPs que l'on ne rattache à aucune des catégories sus-citées et qu'on différencie selon leur structure :
 - les **MMPs archétypes** (MMP-12, -19, -20 et -27)
 - les **MMPs activables par la furine** pourvues d'un motif de reconnaissance à la furine entre le pro-peptide et le domaine catalytique. Nous y retrouvons l'ensemble des MMPs membranaires et les MMPs solubles MMP-11,-21 et -28. Bien que la MMP-23 soit dépourvue de domaine hémopexine, la présence du motif de reconnaissance à la furine la classe dans cette catégorie.

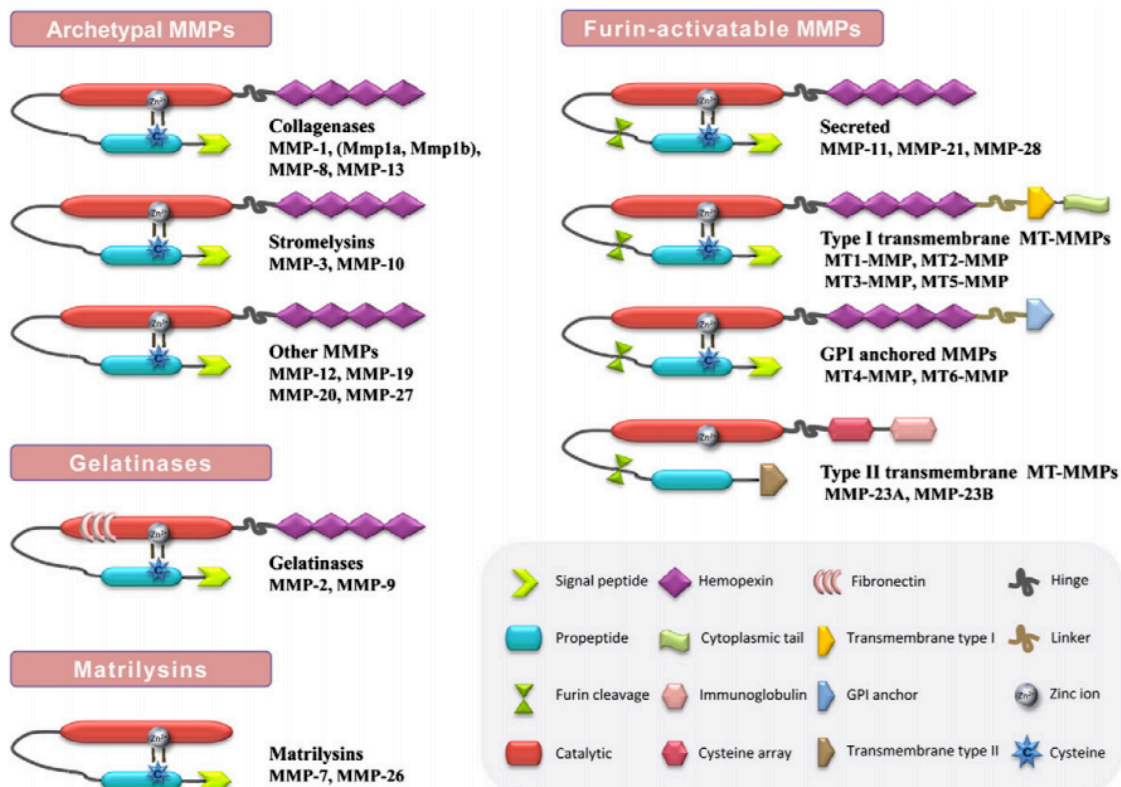


Fig 29 : Classification structurelle des Matrix Metalloproteinases (MMPs) basée sur l'arrangement de leurs domaines. D'après Fanjul-Fernandez et al., 2010 [301].

Introduction

11.2. Particularités de la MT4-MMP

11.2.1. Structure

La MT4-MMP est une MMP de type membranaire à ancrage GPI, ce qui lui confère une location particulière dans les radeaux lipidiques et lui donne accès à des substrats assez spécifiques. Elle est constituée de 605 acides aminés subdivisés en un prédomaine (acides aminés 1-41), un prodomaine (42-128) un domaine catalytique (129-297) incluant l'ion zinc, une région charnière (« hinge ») (298-333) contenant le site de reconnaissance à la furine, un domaine hémopexine (334-535) et une ancre GPI (572-605) (fig 30) [302].

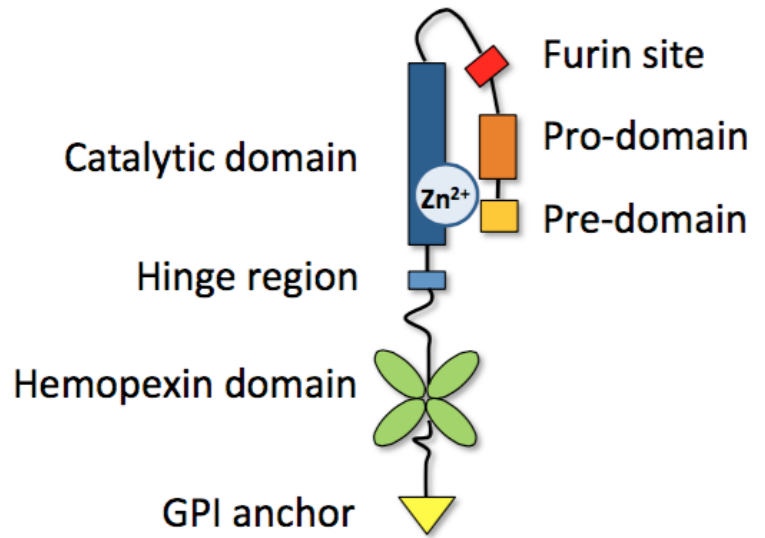


Fig 30: Domaines structuraux de la MT4-MMP. D'après Yip et al., 2019 [302].

Sa séquence en acides aminés est différente de celles des autres MMPs : elle possède une homologie de séquence avec la séquence classique du domaine catalytique de moins de 40 % alors que les autres partagent au moins 65% de cette séquence [306].

11.2.2. Substrats et inhibiteurs

La MT4-MMP n'est, à l'inverse des MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP, **pas en mesure d'activer la pro-MMP2** [307–309] en raison de l'absence au niveau de son domaine catalytique de la boucle hydrophobe « Met-turn », de 8 acides aminés. Celle-ci doit être intacte pour lier le domaine « fibronectin-like » de la proMMP2 et activer cette dernière, comme cela a été démontré pour la MT1-MMP [304, 305, 310].

Elle se distingue également des autres MMPs par son **faible répertoire de substrats au sein de la matrice extracellulaire**, n'étant capable que d'une légère hydrolyse du fibrinogène, de la fibrine et de la gélatine. Néanmoins, elle clive le proTNF, l'ADAMTS4, l' α -2-macroglobuline, la protéine liée au récepteur de la lipoprotéine de faible densité (LRP), l'ostéopontine et la protéine matricielle oligomérique du cartilage (COMP) (tab 10) [307, 308, 311–314].

La MT4-MMP **peut s'autocliner** : une forme soluble de MT4-MMP est abondamment retrouvée dans le milieu de cellules la surexprimant dans sa forme active mais pas dans sa forme inactive) [315].

Substrates		References
ECM substrates:	Gelatin	Wang et al., 1999
	Fibrin	English et al., 2000
	Fibrinogen	English et al., 2000
Other substrates:	proTNF	Wang et al., 1999
		English et al., 2000
	COMP	English et al., 2000
	α -2-macroglobulin	English et al., 2000
	LRP1	Rozanov et al., 2003
	ADAMTS4	Gao et al., 2003
		Patwari et al., 2004
		Clements et al., 2016
	MT4-MMP	Host et al., 2012
	Osteopontin	Martin-Alonso et al., 2015
	Papke et al., 2015	
Thrombospondin 4	Martin-Alonso et al., 2015	
α M integrin	Clemente et al., 2018	

Tab 10 : Revue des substrats identifiés de la MT4-MMP. D'après Yip et al., 2019 [302].

Introduction

Enfin, la MT4-MMP est **plus fortement inhibée par** l'inhibiteur tissulaire de metalloprotéinases 1 (**TIMP1** : « a tissue inhibitor of metalloproteinases ») que par TIMP2 ou TIMP3 à l'inverse des MT-MMP activant la pro-MMP2 qui sont inhibées par les TIMP-2,-3 et -4 mais pas par la TIMP-1 [308, 316].

11.2.3. Biosynthèse et trafic

Les MMPs sont synthétisées sous forme de zymogènes maintenus inactifs par l'interaction entre un groupe cystéine-sulphydrile du pro-domaine et l'ion zinc lié au domaine catalytique. Leur activation nécessite un clivage du pro-domaine [317]. La MT4-MMP comme les autres MT-MMPs et la stromélysine-3 (MMP11), possède une motif (KX(K/R)R) de clivage par les pro-protéines convertases et les furines, situées dans l'appareil de Golgi, conduisant à son activation durant sa synthèse et son acheminement à la surface de la cellule [316].

Sa forme initiale (69kDa) est retrouvée dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. La protéine fraîchement synthétisée est ainsi attachée en son extrémité C-terminale à une ancre GPI préformée et présente au niveau de la membrane interne du RE via la GPI transamidase. Différentes étapes de transformation dans le RE et le Golgi permettent la maturation de l'ancre GPI préformée avec notamment un remplacement d'un acide gras insaturé par un acide gras saturé lors du passage dans le Golgi. La forme mature (58kDa) de la MT4-MMP est finalement transportée via des vésicules endoplasmiques jusqu'à la membrane cytoplasmique. L'étape de remplacement d'acide gras au Golgi s'avère essentielle pour l'incorporation de la MT4-MMP via son ancre au sein du radeau lipidique (précisément au feuillet externe de la membrane cytoplasmique) et lui permet d'interagir avec ses substrats [318, 319].

Au contraire de la MT1-MMP, le mode d'internalisation de la MT4-MMP est très peu connu. Truong et al. [320] ont démontré que l'internalisation de la MT4-MMP n'est pas perturbée par la filipine III, un inhibiteur de la voie cavéolaire, indiquant donc qu'elle est indépendante de la cavéoline-1 avec laquelle la MT4-MMP est pourtant co-localisée. Elle n'est pas non plus bloquée par le chlorpromazine, inhibiteur de la voie des clathrines (avec lesquelles la MT4-MMP ne co-localise pas) [320].

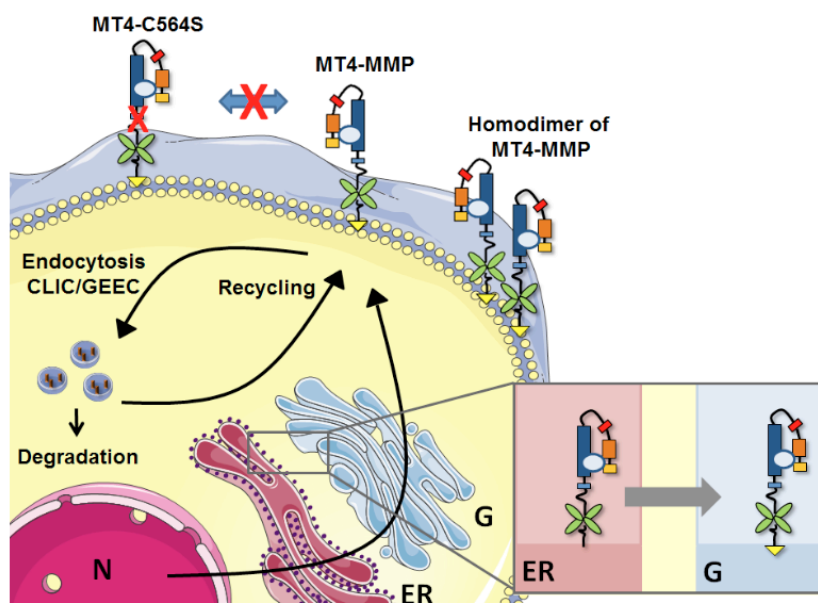


Fig 31 : Biosynthèse et trafic de la MT4-MMP. La MT4-MMP est associée à l'ancre GPI au niveau du réticulum endoplasmique (ER) et du Golgi (G) avant d'être amenée à la membrane. Le remplacement de la cystéine 565 par une sérine empêche sa dimérisation. La protéase est internalisée via la voie CLIC/GEEC. Une fois dans le cytoplasme, elle est dégradée ou recyclée à la membrane. N= noyau. D'après Yip et al., 2019 [302].

Introduction

L'internalisation se fait selon la voie CLIC/GEEC (CLathrine Independent Carriers/GPI-enriched Early Endosomal Compartments), une voie classiquement utilisée pour l'endocytose des protéines à ancre GPI. Elle implique de petites GTPases. Ainsi, le «silencing» de trois régulateurs de cette voie (Rac1, RhoA et CDC42) perturbe l'internalisation de la MT4-MMP. A ce jour, il s'agit de la seule MMP connue pour être internalisée de cette façon. Ensuite, 50% des molécules de MT4-MMP internalisées sont autodégradées et les 50% restant intactes sont recyclées à la surface cellulaire [320]. Enfin, remarquons que la MT4-MMP peut se dimériser et que les résidus cystéine C564 et C566 jouent un rôle clé dans ce processus qui est réduit s'ils sont remplacés par une sérine. Cependant, l'effet de la dimérisation sur son activité demeure inconnu (fig 31) [320, 321].

11.2.4. Expression naturelle et fonctions physiologiques

Le rôle physiologique de la MT4-MMP dans l'**angiogenèse**, le **développement des membres** et la **formation du cerveau** a été mis en évidence par les groupes de Seiki et Sanchez-Camacho, qui par le remplacement du gène de la MT4-MMP par le gène lac-z, ont réussi à tracer son expression de façon spatiotemporelle lors du développement embryonnaire murin [314, 322]. La MT4-MMP est également engagée dans la **migration des cellules des crêtes neurales**. Ainsi, dans des modèles murins transgéniques présentant différents types de cellules ganglionnaires rétiniennes aux profils de migration variables, des transcrits de MT4-MMP ont été identifiés préférentiellement pour les cellules ganglionnaires à orientation nasale en comparaison à celles à orientation ventrale [323]. De même, son inhibition par un morpholino (oligonucléotide antisens bloquant la traduction de l'ARNm) ou par des inhibiteurs large spectre des MMP (Marimastat et ONO-4817) aboutit à une migration aberrante des cellules des crêtes neurales lors de l'embryogenèse chez le zebrafish [324].

Son expression est importante dans le cerveau, les poumons, l'utérus et modérée au niveau splénique, gastrique, intestinal et gonadique (tant ovarien, où la folliculogénèse requiert un important remodelage, que testiculaire). Elle est faible au cervelet, au cœur, au foie, aux reins et aux muscles squelettiques [314]. Des souris déficientes pour la MT4-MMP présentent une apparence normale avec une croissance usuelle, n'ont pas de troubles comportementaux et leur durée de vie ainsi que leur fertilité restent conservées. Seule une hypodipsie et une moindre diurèse journalière y ont été objectivées alors que la fonction rénale s'avère normale. Dès lors, tenant compte de l'expression physiologique hypothalamique de la MT4-MMP, il fut proposé qu'elle joue un rôle dans la **régulation de la soif** mais le mécanisme n'est pas encore élucidé [314, 325].

Finalement, sa détection dans des globules blancs humains (éosinophiles, lymphocytes, monocytes et macrophages) suggère que cette protéase est impliquée dans l'inflammation [306, 308, 314, 326–328]. Son expression est majorée au niveau des éosinophiles lors d'une stimulation par TNF- α [328].

11.2.5. Implication dans le cancer du sein

La MT4-MMP agit dans l'arthrose et l'anévrisme aortique thoracique et les dissections aortiques. Elle est également impliquée dans les cancers gastriques, colorectaux et de la tête et du cou et son transcrit a été détecté dans de multiples néoplasies (glioblastome, carcinomes

Introduction

buccal et cervical, mélanome, carcinome prostatique, carcinome pulmonaire, leucémie, ostéosarcome, adénocarcinomes gastro-intestinal et surrénalien, carcinome thyroïdien et carcinome embryonnaire) [329].

Cependant, c'est essentiellement sa contribution dans le développement et l'agressivité du cancer du sein qui a largement été étudiée. D'ailleurs, la MT4-MMP a été initialement clonée à partir d'une banque de cDNA provenant de cellules de cancer mammaire humain [306].

Vincent Chabottaux et al. ont démontré par IHC une plus forte expression tant en intensité qu'en prévalence de la MT4-MMP sur des échantillons de 63 carcinomes canauxaires en comparaison avec 21 tissus sains issus de réductions mammaires [330]. La surexpression de la MT4-MMP, suite à une transfection, dans des cellules MDA-MB-231 (lignée de TNBC) confère une activité pro-angiogénique et **accroît la prolifération *in vitro*** dans un modèle 3D employant du matrigel ou *in vivo* dans des xénogreffes sous-cutanées. En revanche, elle n'affecte pas la prolifération 2D *in vitro* [330, 331]. La MT4-MMP **majore la dissémination métastatique vers le poumon** de xénogreffes sous-cutanées en déstabilisant les vaisseaux sanguins par détachement des péricytes et élargissement de la lumière des vaisseaux [332]. Alors qu'aucune différence de production des modulateurs clés de l'angiogenèse (VEGF, PDGF, FGF et leurs récepteurs) n'a été détectée dans les xénogreffes surexprimant la MT4-MMP, la seule diminution de la thrombospondine-2 humaine (TSP-2) y a été observée [332].

Tal Salz et al. ont décrit que la transcription de plusieurs MMPs, incluant la MT4-MMP, est régulée par une histone méthyltransférase, la hSETD1A, qui est surexprimée chez des patientes et par des lignées cellulaires de cancers humains du sein métastatiques. Son extinction aboutit à une méthylation réduite de l'histone H3 Lysine 4 (H3K4) en regard de promoteurs des MMP-2,-9,-12,-13 et -17 (MT4-MP) sur des analyses d'immunoprécipitation de chromatine. Cela résulte en une moindre expression de ces MMPs menant à une diminution de la migration et de l'invasion *in vitro* et à une réduction de la dissémination métastatique pulmonaire *in vivo* [333]. Une étude rétrospective, menée sur 159 patientes chinoises atteintes de TNBC, a identifié l'expression de hSETD1A comme un facteur de mauvais pronostic [334].

Les effets de la MT4-MMP sont de deux ordres :

- **fonctions protéolytiques** : les **effets pro-angiogéniques et pro-métastatiques** de la MT4-MMP requièrent que le domaine catalytique soit intact. Ainsi, la mutation ciblée consistant à inactiver la MT4-MMP par substitution de l'acide glutamique par de l'alanine en tant que 249^{ème} acide aminé (E249A), au niveau du domaine catalytique, entraîne une perte de ces effets [315].
- **fonction non protéolytique** : l'**effet mitogène** sur les cellules de TNBC est indépendant du site catalytique et de son action protéolytique. La MT4-MMP **stimule la prolifération par son interaction avec l'EGFR** avec lequel elle est co-localisée à la surface cellulaire (fig 32) et dont elle majore la phosphorylation *in vitro* en réponse à une stimulation par ses ligands (TGF- α , EGF) **et par l'activation de l'enzyme CDK4**, induisant ainsi une inactivation de la protéine du rétinoblastome (fig 33)[331]. La MT4-MMP est également un **biomarqueur prédictif de réponse à l'Erlotinib** (Tarceva®) **et au PD0332291** (Palbociclib, Ibrance®) dans un modèle 3D *in vitro* (fig 34) [331].

Introduction

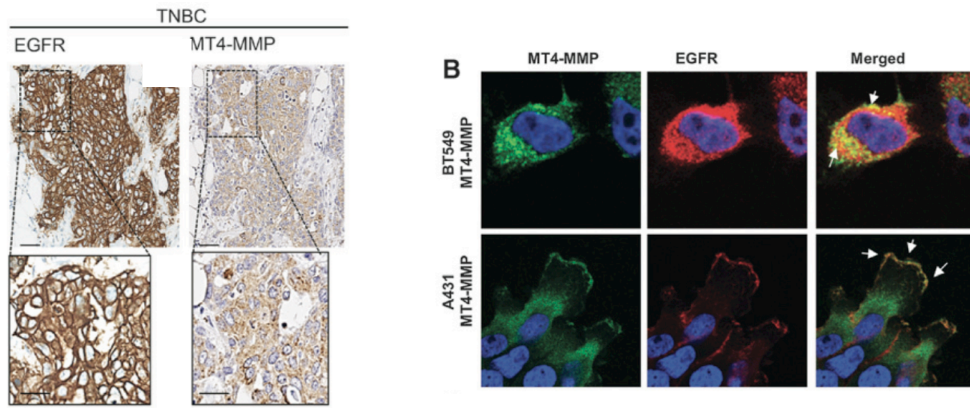


Fig 32 : Expression conjointe de la MT4-MMP et de l'EGFR.

G : Expression par les cellules cancéreuses de l'EGFR et de la MT4-MMP dans les mêmes aires de sections sériées de TNBC humains issus de patientes (détection par IHC).

D : Co-localisation de la MT4-MMP et de l'EGFR sur des lignées cellulaires, détectées par immunofluorescence au microscope confocal.

D'après Paye et al., 2014 [331].

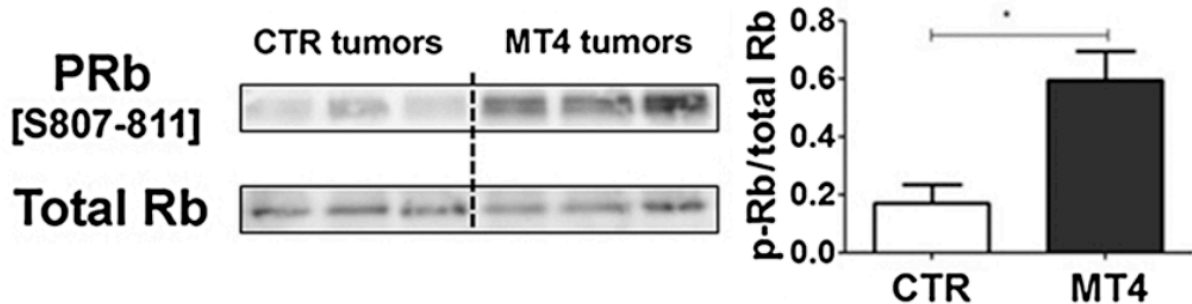


Fig 33 : Dans un modèle de xénogreffes, la prolifération dépendant de la MT4-MMP est associée à une activation de différentes cyclin-dépendent-kinases (CDK) et à la phosphorylation en [S807-811] de la protéine du Rétinoblastome (Rb). D'après Paye et al., 2014 [331].

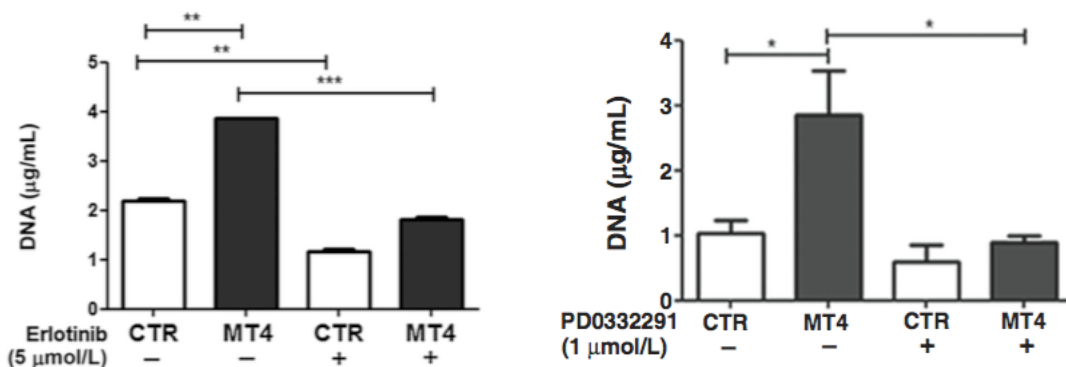


Fig 34 : La MT4-MMP en tant que biomarqueur prédictif à l'Erlotinib et au Palbociclib.

Réponse plus importante des cellules exprimant la MT4-MMP dans un modèle de prolifération cellulaire (lignée MDA-MB-231) in vitro 3 dimensions à l'Erlotinib 5 µmol/L (à G) et au PD0332291 (Palbociclib) 1 µmol/L (à D).

D'après Paye et al., 2014 [331].

Introduction

11.2.6. Les inhibiteurs pharmacologiques des MMPs (MMPi)

Au vu des larges évidences fondamentales et cliniques de leurs implications dans l'invasion tumorale, l'angiogenèse et la dissémination métastatiques, les MMPs se sont érigées comme des cibles pharmacologiques de choix, d'autant que leur expression à des taux élevés est un facteur de mauvais pronostic [299, 300, 335]. Dès la fin des années 1980 et jusqu'au début des années 2000, des inhibiteurs synthétiques des MMPs à large spectre tel le Batimastat puis le Marimastat ont été testés dans différents cancers dans des études de phase III. Malgré des données précliniques souvent encourageantes, ils s'avérèrent très décevants entraînant de lourds effets secondaires (dont une fibrose par inhibition de la MMP1 censée remodeler le collagène I interstitiel ou le syndrome musculo-squelettique dû à l'inhibition des ADAM-10 et -17 aboutissant à une suractivation des récepteurs au TNF- α et consistant en des douleurs articulaires et une raideur intolérables), non accompagnés d'une réduction de taille tumorale ou d'une amélioration de survie globale [299, 335]. Ces échecs semblent reposer d'une part sur le choix de les tester sur des patients présentant des maladies avancées alors que les MMPs sont en réalité surtout actives dans les premières étapes de la progression tumorale [336–338]. En revanche, les modèles murins utilisés, où les inhibiteurs s'étaient positivement distingués, comprenaient des tumeurs génétiquement homogènes qui peuvent proliférer rapidement localement sans donner de métastases à l'inverse de la biologie du cancer chez l'humain où les tumeurs sont plus hétérogènes et où la croissance locale peut être lente tout en s'accompagnant d'une sévère dissémination à distance. D'autre part, certaines MMPs ont des effets antitumoraux en réduisant l'angiogenèse et la dissémination métastatique (MMPs-3, -8, -11, -12, -19, -26) et l'utilisation de MMPi à large spectre a probablement causé, dans certains cas, une progression tumorale par inhibition de ces « MMPs favorables » dont la faible expression est aussi considérée comme un facteur de mauvais pronostic [299, 339].

11.3. En conclusion

Notre laboratoire a clairement démontré les implications de la MT4-MMP dans les TNBC. Elle a été également identifiée comme un partenaire privilégié de l'EGFR à la surface cellulaire. La MT4-MMP augmente la phosphorylation de l'EGFR en réponse à une stimulation par ses ligands et est un biomarqueur prédictif *in vitro* de la réponse à l'Erlotinib. En outre, il a été prouvé qu'elle majore la phosphorylation de Rb. Les échecs dans des essais cliniques des anti-EGFR dans le TNBC pourraient reposer sur un manque de sélection des patientes et sur le besoin de combiner l'anti-EGFR à d'autres modalités thérapeutiques que la seule chimiothérapie pour que l'anti-EGFR s'avère efficace.

Ces constats et hypothèses nous ont mené à investiguer le rôle du cycle cellulaire dans le TNBC et à nous intéresser aux inhibiteurs du cycle cellulaire. Le prochain et dernier chapitre de l'introduction s'intéresse à la place des anti-CDK4/6 dans le traitement du TNBC.

12. Les inhibiteurs du cycle cellulaire (inhibiteur des CDK4/6) pour traiter les TNBC

Une des caractéristiques majeures des cancers est la dérégulation du cycle cellulaire. Normalement, le cycle cellulaire est l'objet de régulations où interviennent des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs. Si certaines activités physiologiques requièrent une division des cellules normales (ex : cicatrisation, renouvellement de tissus), une division trop fréquente est en revanche délétère et permet à des cellules ayant acquis des mutations de former des clones et finalement des tumeurs. Un équilibre entre des signaux induisant la division et son inhibition existe donc au niveau de toute cellule normale et penche dans une ou l'autre direction suivant les besoins tissulaires.

12.1. La régulation du cycle cellulaire

12.1.1. La progression du cycle cellulaire

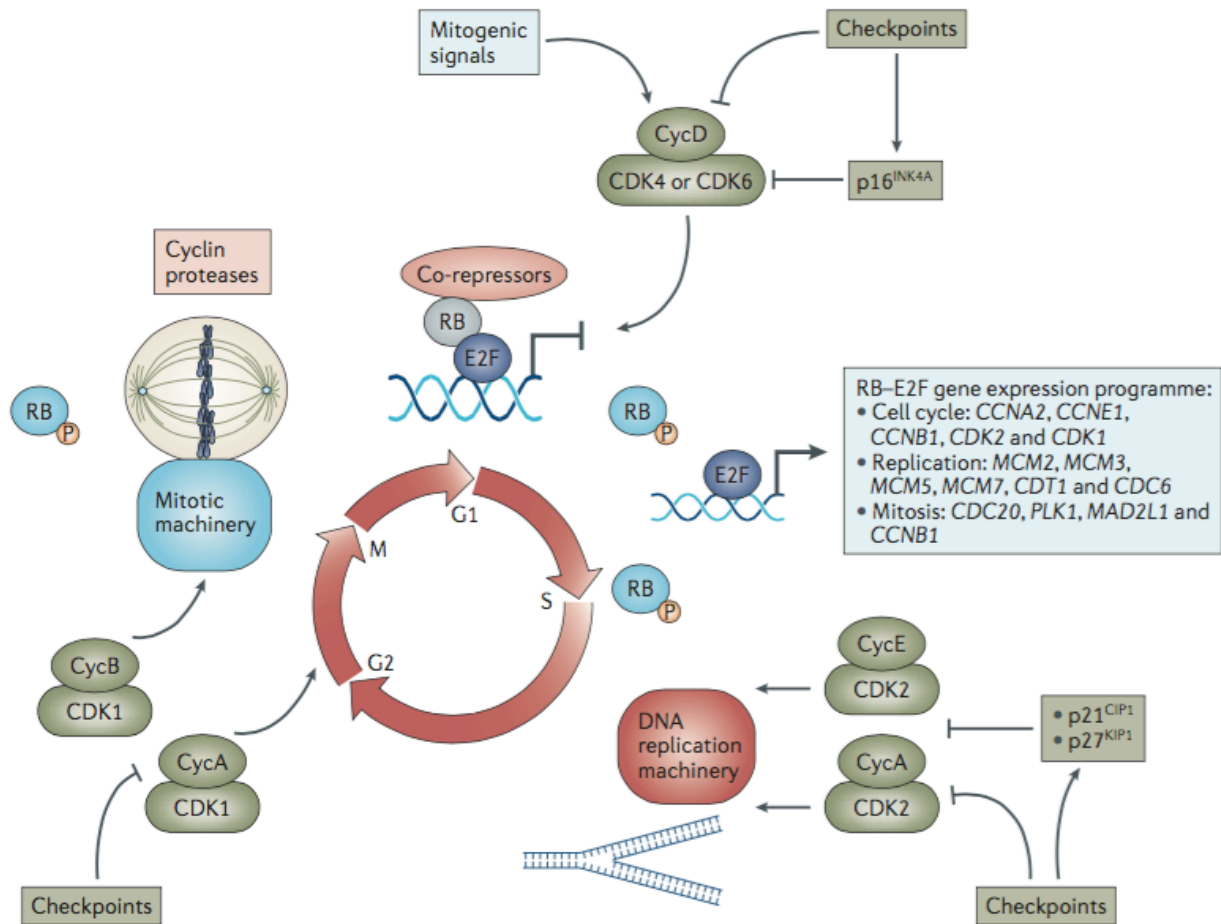


Fig 35 : Progression du cycle cellulaire avec implications des différents couples cyclines-CDK. D'après Asghar et al., 2015 [343].

Introduction

Afin de se diviser et se répliquer, les cellules progressent à travers les 4 phases du cycle cellulaire (phase G0/G1 → phase S de synthèse → phase G2 et phase M de mitose). Les cellules normales restreignent d'elles-mêmes leur prolifération en restant dans la phase G0/G1. Cela repose essentiellement sur la **protéine du rétinoblastome (Rb) et ses variantes (p107 et p130 respectivement aussi appelées RbL1 et RbL2)** dont le nom fait référence à la découverte de l'implication de la mutation de son gène (*Rb1*) dans le rétinoblastome, tumeur oculaire pédiatrique la plus fréquente. Ces protéines, dans leur état hypophosphorylé, agissent comme suppresseurs de tumeur via le recrutement de co-répresseurs et principalement via leur capacité à lier **les facteurs de transcription de la famille E2F** (E2F 1, 2, 3, 4, 5) et en les empêchant d'interagir avec leurs promoteurs de gènes cibles. Ces gènes sont impliqués dans le contrôle du cycle (*CCNE* exprimant la cycline E, *CCNA* exprimant la cycline A et *CCNB1* exprimant la cycline B1), la biosynthèse des dNTP (gène de la dihydrofolate réductase DHFR ou les gènes *RRM1* et *RRM2* codant pour les ribonucléotide réductases) et la progression mitotique. Suite à des signaux mitogènes extérieurs et leur transduction jusqu'au noyau, Rb et ses variantes sont phosphorylées par des enzymes de type sérine/thréonine kinases appelées **CDK** (« **cyclin-dependent kinase** ») et leur hyperphosphorylation entraîne une perte d'interaction avec les facteurs E2F, permettant à ces derniers d'activer la transcription de gènes impliqués dans le passage à la phase S du cycle (fig 35) [340–343].

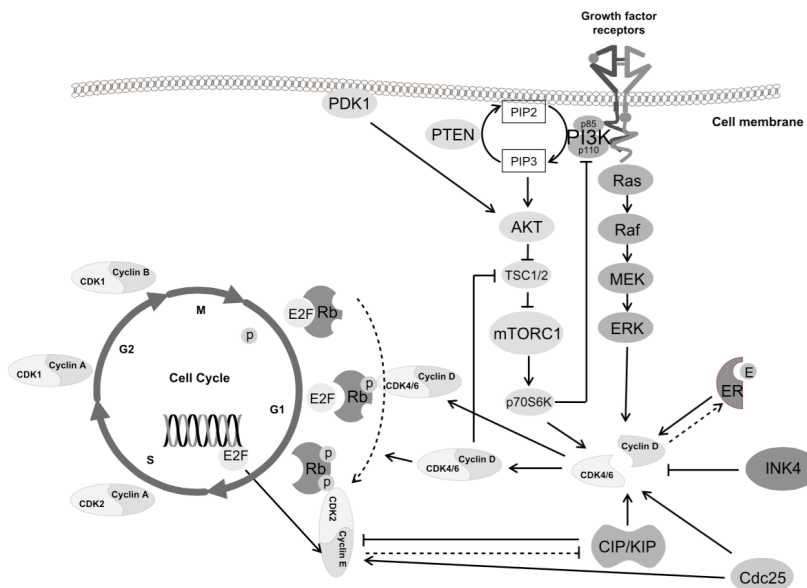


Fig 36 : Illustration de l'initiation du passage de la phase G1 à la phase S en réponse à des signaux mitogènes extracellulaires médiés par des facteurs de croissance et leurs récepteurs. D'après Rocca et al., 2017 [342].

Les CDK sont donc cruciales pour l'avancée du cycle et comme leur nom l'indique, leur activation requiert une liaison à des protéines appelées **cyclines**. Différents couples de **cyclines-CDK** jouent un rôle critique dans les différentes étapes de la progression du cycle (fig 35). Des signaux mitogènes extracellulaires initient le passage de la phase G0/G1 à la phase S, en stimulant la cellule soit à la surface par des facteurs de croissance (activation des voies de l'EGFR, MAPK, mTOR,...), soit dans le cytoplasme via les récepteurs dits « nucléaires » qui une fois liés à leur ligand se dirigent vers le noyau (ex : récepteurs aux oestrogènes) (fig 36). Suite à ces signaux qui convergent vers le noyau, la cellule synthétise en premier lieu les

Introduction

cyclines D (cyclines D 1, 2, 3), lesquelles forment un complexe avec les CDK 4 et 6. Les CDK 4 et 6 sont alors actives, s'assemblent en hétérodimères et réalisent une monophosphorylation de Rb et ses variantes qui dès lors relâchent partiellement leur frein sur les facteurs de transcription de la famille E2F menant à l'expression des cyclines E (E 1, 2) et A. Les cyclines E et, dans une moindre mesure les cyclines A, peuvent lier et activer à leur tour la CDK 2 qui hyperphosphoryle Rb et ses variantes. Cela entraîne une libération plus conséquente des facteurs de transcription de la famille E2F, permettant l'expression consécutive de multiples gènes nécessaires pour passer de la phase G1 à la phase S du cycle et initier la réplication [340–343]. Notons que les CDK 4 et 6 phosphorylent également la protéine FOXM1 (forkhead box protein M1) et la stabilisent. Cette protéine est un médiateur impliqué dans l'expression de gènes requis pour la progression à travers la mitose [343].

En phase S, le couple cycline A-CDK 1 est essentiel pour le passage en phase G2. Lorsque la réplication de l'ADN est terminée, les couples cycline A-CDK1 et cycline B-CDK1 phosphorylent leurs cibles en phase G2. En l'absence de dommage de l'ADN (auquel cas la protéine p53, le gardien du génome, induit la mort cellulaire) et à la suite d'une préparation appropriée à la ségrégation des chromosomes, la cellule active fortement le complexe cycline B-CDK1 et progresse en phase M [340–343]. Une réduction de l'activité de CDK1 par dégradation de la cycline B est requise pour permettre la progression vers l'anaphase et la genèse des deux cellules filles en phase G1. Lors de cette transition de la phase M vers la phase G1, Rb et ses variantes sont déphosphorylées et le cycle est à nouveau sensible aux signaux mitogéniques et anti-prolifératifs [343]. Remarquons également que l'expression de CDK1 et des cyclines associées (A2 et B1) est coordonnée par Rb et ses variantes, par les facteurs E2F et FOXM1, rendant compte à nouveau du rôle crucial en tant que pivots du cycle des facteurs E2F [343].

12.1.2. Les inhibiteurs physiologiques du cycle cellulaire

Si certains signaux extracellulaires mènent à l'expression de cyclines et l'activation des CDK, d'autres signaux induisent l'expression d'inhibiteurs des CDK. Ainsi [340–343] :

- les **inhibiteurs INK4** sont des inhibiteurs des CDK4 (d'où leur nom : **IN**hibitors of **CDK4**) et CDK6. Ils interagissent avec leur domaine catalytique et réduisent leur liaison aux cyclines D. Ce sont les protéines p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D} qui se caractérisent par de multiples répétitions ankyrines et sont exprimées dans des conditions de stress. Le vieillissement cellulaire ou les oncogènes induisent par exemple la surexpression de p16^{INK4A} qui résulte en un arrêt profond du cycle en phase G1 [340–343] tandis que le TGF-β («transforming growth factor β») réduit la prolifération cellulaire épithéliale via la production de p15^{INK4B} [343].
- les **inhibiteurs CIP/KIP** (CDK-interacting protein/kinase inhibitory protein) sont les protéines p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2} qui se caractérisent par des motifs similaires au niveau de leur extrémité N-terminale leur conférant la capacité de lier tant les cyclines que les CDK. Leurs effets varient suivant les couples cyclines-CDK : ainsi, si elles inactivent les complexes cyclines-CDK2, elles ont plutôt un rôle stabilisateur sur les CDK4 et 6 [341]. La protéine p21^{CIP1} exerce en outre une activité de « checkpoint » en cas de lésion d'ADN et son gène est une cible critique de p53 [343]. La protéine p16^{INK4A} va elle-même

Introduction

contribuer à augmenter la distribution de p21^{CIP1} et p27^{KIP1} vers le couple cycline E-CDK2 soulignant les relations étroites des différents mécanismes de régulation du cycle [340].

- en cas de lésion ou de réplication incomplète de l'ADN, la protéine p53 mène à la mort cellulaire et des protéines telles WEE1 et CHK1 inhibent l'activité de CDK1 tant par phosphorylation que par les phosphatases de la famille CDC25 (cell division cycle 25). A l'inverse, le couple cycline B-CDK1 peut désactiver WEE1 par phosphorylation [343].

12.2. La perte de régulation du cycle cellulaire en cas de cancer

Comme mentionné au chapitre 3.3., la résistance à l'apoptose et l'acquisition d'un potentiel répliatif illimité font partie des « hallmarks » du cancer. Il n'est donc pas étonnant de retrouver des dérégulations des mécanismes sus-cités dans les cancers.

Les dérégulations concernent fréquemment les étapes précoces du cycle.

- la plupart des oncogènes induisent une surexpression de p16^{INK4A} qui, avec l'aide de Rb et ses variantes, cause une sénescence cellulaire [344, 345]. Néanmoins, 3-8 % des cancers mammaires (plus fréquemment des TNBC) ont une délétion du gène *CDKN2A* codant pour **la protéine p16^{INK4A}** et ce gène peut être muté ou voir son promoteur être méthylé [342].
- la **perte de fonction de Rb** par délétion ou mutation de Rb1 survient selon le TCGA dans, respectivement, 2-4% et 1-3% des cancers mammaires. Cette perte de fonction est retrouvée dans 20% des cancers basal-like et les analyses IHC confirment que la perte d'expression de Rb est plus importante dans les TNBC [342]. Les tumeurs « Rb-négatives » élèvent leur taux de p16^{INK4A} mais leur prolifération reste importante. Les cyclines E et CDK2 sont alors constitutionnellement actives et les tumeurs sont plus chémosensibles mais récidivent fréquemment. Les pertes de fonctions de p16^{INK4A} et de Rb sont en général mutuellement exclusives [340, 346, 347].
- l'**activation oncogénique de la cycline D1** par amplification ou translocation (gène *CCND1*) est fréquente dans les cancers du sein [348, 349] : les cancers Luminal A et B ont une amplification de *CCND1* dans, respectivement, 29% et 58% des cas, tandis que les HER2 et les TNBC ont des taux d'amplification de 38% et 9% [342].
- l'**amplification de CDK4** est observée dans 15% des cancers du sein [342].

Les dérégulations peuvent aussi concerner les étapes plus tardives du cycle. Ainsi, les cyclines E peuvent être amplifiées, y compris dans les cancers mammaires [350, 351]. L'expression de p21^{CIP1} est fréquemment réduite dans les cancers mammaires en conséquence de la mutation de p53 [352] ou de la surexpression de Myc [353]. Enfin, l'expression de p27^{KIP1} est réduite dans beaucoup de cancers, y compris dans les cancers mammaires lors d'une amplification d'HER2, bien que la perte de son gène soit assez rare [342, 343].

En revanche, il ne semble pas que l'activité de CDK1 soit dérégulée par atteinte génétique directe dans la tumorigenèse. Cependant, des atteintes de p53 ou d'autres protéines contrôlant l'intégrité de l'ADN peuvent indirectement altérer l'activité de CDK1. En outre, une haute expression de cycline B1 est associée à un phénotype plus agressif de cancer [354, 355]. Il paraît néanmoins peu probable que le gène de CDK1 soit un oncogène « driver » important puisque l'activité de CDK1 doit être réduite pour sortir de la mitose et qu'une activité non coordonnée de CDK1 mène à la mort cellulaire [343].

Introduction

En résumé, pour les cancers du sein on retient que [342] :

- dans les **cancers luminaux**, la signalisation par les ER induit la transcription de la cycline D1. Il y'a fréquemment, surtout en cas de tumeur Luminale B, gain de CDK4 et une amplification du gène de la cycline D1. Les pertes de Rb et p16^{INK4A} sont rares dans les tumeurs Luminales A et un peu plus fréquentes dans les Luminales B.
- dans les **cancers HER2**, la cycline D1 est souvent amplifiée ou activée suite au signal mitogène initié par HER2 via les voies PI3K et MAPK [356]. Il peut y avoir gain de CDK4.
- les **TNBC** présentent le taux le plus élevé d'inactivation de Rb et peuvent avoir une amplification de la cycline E1.

12.3. Les inhibiteurs pharmacologiques des CDK

Dans un premier temps, des inhibiteurs non sélectifs des CDK ont été développés : ces pan-CDK-inhibitors (Flavopiridol et Roscovitine) ou ces inhibiteurs de multiples CDK avec affinité plus grande pour les CDK 1, 2 (Dinaciclib, AT7519, SNS-032, AZD5438) ont été abandonnés dans le traitement des tumeurs solides au vu de leur faible efficacité et de leur toxicité (nausées, diarrhées, myélosuppression, anémie). En conséquence, des inhibiteurs sélectifs de certaines CDK ont été mis au point et les inhibiteurs des CDK 4 et 6 (inhibiteurs CDK4/6) qui ont été les premiers à être approuvés par la FDA. Il existe 3 inhibiteurs CDK 4/6 : le Palbociclib (PD0332991, Ibrance[®]), le Ribociclib (LEE011, Kisqali[®]) et l'Abemaciclib (LY2834219, Verzenio[®]). Une bonne connaissance de la régulation du cycle rend compte du besoin d'avoir Rb intact afin que ces inhibiteurs soient efficaces. Au vu des dérégulations observées dans les différents types de cancer du sein, il est aisé de comprendre que c'est dans les cancers hormonosensibles que ces inhibiteurs ont été les plus investigués puisqu'ils présentent le plus faible taux de perte de Rb [342, 343]. En terme de toxicité, en se référant à une récente méta-analyse de 3743 patients, les profils de toxicité de grade III-IV sont assez similaires entre les trois drogues. Cependant, le Palbociclib entraîne un risque moins important de diarrhées que l'Abemaciclib (risque relatif de 0,13) et moins de QTc long que le Ribociclib (risque relatif de 0,02). Les 3 molécules causent des neutropénies [357].

12.3.1. La place actuelle des inhibiteurs CDK 4/6 dans les cancers ER+/HER2-

Les inhibiteurs CDK4/6 ont démontré leur efficacité en combinaison avec des hormonothérapies anti-oestrogéniques dans les essais cliniques concernant les cancers du sein localement avancés/métastatiques, ER+/HER2-, que ce soit chez des patientes ménopausées ou préménopausées. L'augmentation de la PFS est d'autant plus importante qu'on les utilise précocement comme démontré sur le tableau ci-dessous reprenant les principales données des études de phase III en contrôle-placebo (hormonothérapie +/- inhibiteur CDK4/6) (tab 11).

Introduction

	PALOMA 2 [358]	MONALEESA-2 [359]	MONARCH-3 [360]	MONALEESA-7 [361]	PALOMA-3 [362]	MONARCH-2 [363]
Ligne	En 1 ^{ère} ligne				≥ 2 ^{ème} ligne	En 2 ^{ème} ligne
Situation ménopausique	Postménopause			Préménopause	Pré- et postménopause	
Nombre de patients	n = 666	n = 668	n = 493	n = 672	n = 521	n = 669
ET	Letrozole	Letrozole	NSAI	- Tamoxifène + LHRHa - NSAI + LHRHa	Fulvestrant	Fulvestrant
Inhibiteur CDK4/6	Palbociclib	Ribociclib	Abemaciclib	Ribociclib	Palbociclib	Abemaciclib
Traitements antérieurs	Aucun pour ABC	Aucun pour ABC	Aucun pour ABC	- Pas d'ET - jusqu'à une ligne de ChT pour ABC	- ET - jusqu'à une ligne de ChT pour ABC	- Pas plus d'une ET - Pas de ChT pour ABC
PFS médian (mois) VS placebo	27,6 vs 14,5 (HR : 0,56)	25,3 vs 16,0 (HR : 0,57)	28,18 vs 14,76 (HR : 0,55)	23,8 vs 13,0 (HR : 0,55)	11,2 vs 4,6 (HR : 0,5)	16,4 vs 9,3 (HR : 0,55)

Tab 11 : Les différentes études menées avec des inhibiteurs CDK4/6 chez des patientes atteintes de cancers du sein métastatiques ou localement avancés ER+/HER2-. Chaque référence est citée sous le nom de l'étude. Adapté et remis à jour à partir d'une présentation de A. Gambos et A. Awada, cours d'oncologie médicale post-graduation, Mai 2018, EORTC. (ABC= Advanced Breast Cancer, ChT = chimiothérapie, ET= endocrine therapy, LHRHa= luteinising hormone-releasing hormone agonist, NSAI= non steroidal aromatase inhibitor).

Sur base des études PALOMA-1 et MONALEESA-2, le Palbociclib et le Ribociclib ont reçu l'approbation de la FDA en Février 2015 et Mars 2017 en 1^{ère} ligne chez des patientes ménopausées atteintes d'un cancer mammaire avancé ER+/HER2- en combinaison avec un traitement anti-oestrogénique. L'Abemaciclib a été pour la première fois approuvé par la FDA suite à l'étude MONARCH-1 en Septembre 2017 en monothérapie en cas de cancer du sein avancé ER+/HER2- en progression après hormonothérapie et chimiothérapie [341].

En mai 2019, seuls le Palbociclib et le Ribociclib peuvent être prescrits en Belgique chez des patientes atteintes de cancers ER+/HER2- localement avancé ou métastatique [364] :

- avec un inhibiteur de l'aromatase non stéroïdien (NSAI): pour le Palbociclib en préménopause (avec LHRHa) et postménopause, pour le Ribociclib qu'en postménopause :
 - après hormonothérapie adjuvante par Tamoxifène et rechutant de leur maladie pendant le traitement adjuvant ou dans les 12 mois suivant la fin du traitement adjuvant.
 - lorsque la maladie est symptomatique, après hormonothérapie adjuvante et que la rechute a lieu au-delà de 12 mois après la fin du traitement adjuvant.
 - situation de novo métastatique et symptomatique.
- avec le Fulvestrant : uniquement pour le Palbociclib tant en préménopause (avec LHRHa) qu'en postménopause.
 - après hormonothérapie adjuvante par NSAI et rechutant de leur maladie pendant le traitement adjuvant ou dans les 12 mois suivant la fin du traitement adjuvant.
 - après hormonothérapie pour leur cancer du sein avancé ou métastatique.

De nombreuses études s'intéressent actuellement à la place des inhibiteurs CDK 4/6 dans des cancers ER+/HER2- en situation adjuvante en combinaison avec l'hormonothérapie comme

Introduction

les études de phase III PENELOPE-B et PALLAS, ou en situation néoadjuvante pour des patientes ER+/HER2- comme l'étude PELOPS [341].

12.3.2. La place potentielle des inhibiteurs CDK 4/6 dans les cancers HER2+

In vitro, la combinaison d'inhibiteur CDK 4/6 avec du Trastuzumab ou du T-DM1 obtient de meilleurs résultats que les traitements anti-HER2 en monothérapie [341]. A ce jour, la plus large étude évaluant leur place chez les patientes atteintes de cancers mammaires avancés HER2 a été publiée en 2016. Elle comporte 11 patientes HER2+ traitées alors par Abemaciclib avec un ORR de 36% (PR : 4/11, CR : 0/11). Bien qu'il n'y ait aucune comparaison avec un traitement ciblé anti-HER2, cela indique une place potentielle des inhibiteurs CDK 4/6 dans l'arsenal thérapeutique contre le cancer HER2+ [365].

Plusieurs études de phase II et III sont en cours afin d'évaluer l'intérêt d'une combinaison d'inhibiteurs CDK 4/6 avec des thérapies anti-HER2 en cas de cancer mammaire avancé HER2+. Ce sont les études PATRICIA (phase II; Palbociclib + Trastuzumab ± Letrozole; NCT02448420), PATINA (phase III; HER2-targeted therapy ± palbociclib; NCT02947685), monarchER (phase II, Abemaciclib + Trastuzumab ± Fulvestrant; NCT02675231) et une étude de phase II combinant le Ribociclib au Trastuzumab ou au T-DM1 ± Fulvestrant (NCT 02657343). Les résultats de ces études devraient être dévoilés en 2019-2020 [341].

En outre, leur place plus précoce dans la prise en charge des cancers du sein HER2+ est en train d'être investiguée. Si l'étude de phase II PALTAN (Palbociclib + Trastuzumab + Letrozole; NCT02907918) est en cours, les résultats de l'étude de phase II NA-PHER2 sont publiés : en situation néoadjuvante chez des patientes ER+/HER2+ naïves de tout traitement, la combinaison Palbociclib + Trastuzumab + Pertuzumab + Fulvestrant aboutit à un ORR de 97% (29/30) avec 27% de réponse pCR (8/30). Ces résultats suggèrent une potentielle indication en situation néoadjuvante des inhibiteurs CDK 4/6 en cas de maladie HER2+ [341, 366].

12.3.3. La place potentielle des inhibiteurs CDK 4/6 dans les TNBC

Les TNBC ont longtemps été considérés comme résistants aux inhibiteurs CDK 4/6. Ceci se basait notamment sur l'observation de Finn et al., qui démontre que, parmi 47 lignées cellulaires de cancer du sein, les lignées de type Luminal exprimant les ER (incluant les HER2+) étaient bien plus sensibles que les lignées de type basal [367]. Ensuite, les études cliniques employant les inhibiteurs CDK 4/6 se sont avérées décevantes chez les patientes TNBC. DeMichele et al. ont étudié l'efficacité du Palbociclib chez 37 patientes atteintes de cancer du sein avancé Rb+. Les 4 patientes TNBC de sa cohorte présentaient une PFS bien inférieure à celle des patientes ER+ et aucune réponse objective n'a été obtenue parmi ces 4 patientes [368]. En outre, dans l'étude de phase I sus-mentionnée s'intéressant à l'activité antitumorale de l'Abemaciclib, 9 patientes souffrant de TNBC avancé étaient incluses. Seules 3 patientes ont présenté une SD (avec un seul cas de SD au delà de 24 semaines) et la PFS médiane n'était que de 1,1 mois entraînant un CBR à 24 semaines de seulement 11% [365]. La **résistance des TNBC au CDK 4/6 inhibiteurs** a longtemps été mise sur le compte de l'amplification de cycline E1 et surtout sur la perte de Rb fonctionnelle qui est d'environ 20% selon le TCGA [91].

Introduction

Depuis 2 ans, de plus en plus d'évidences remettent ce dogme en question. Asghar et al. ont démontré que le sous-type LAR est sensible au Palbociclib tant *in vitro* que *in vivo* dans des modèles de xénogreffes. Ils ont corrélé cette sensibilité avec une sortie de cycle après mitose des cellules LAR dans un état quiescent avec faible expression de cycline E1 et donc faible activité CDK2. Les CDK 4 et 6 y sont donc requises pour permettre l'initiation d'un nouveau cycle d'autant plus que les lignées LAR ont, outre une haute expression de récepteurs aux androgènes, des taux élevés d'expression de Rb fonctionnelle. A l'inverse, les cellules basal-like sortent de la mitose dans un état plus prolifératif avec une expression importante de cycline E1 et donc une haute activité CDK2. L'impact des CDK 4 et 6 pour lancer un nouveau cycle est alors moindre. Néanmoins, en cas de mutation PIK3CA, les sous-types de TNBC autres que LAR voient leur prolifération plus réduite *in vitro* par la combinaison du Palbociclib et d'un inhibiteur de PI3K (pan inhibiteur Pictilisib, ou anti PI3K α Taselisib) que par une monothérapie d'un des deux types d'inhibiteur. *In vivo*, des xénogreffes LAR sont également plus sensibles à cette combinaison qu'aux monothérapies (fig 37) [192].

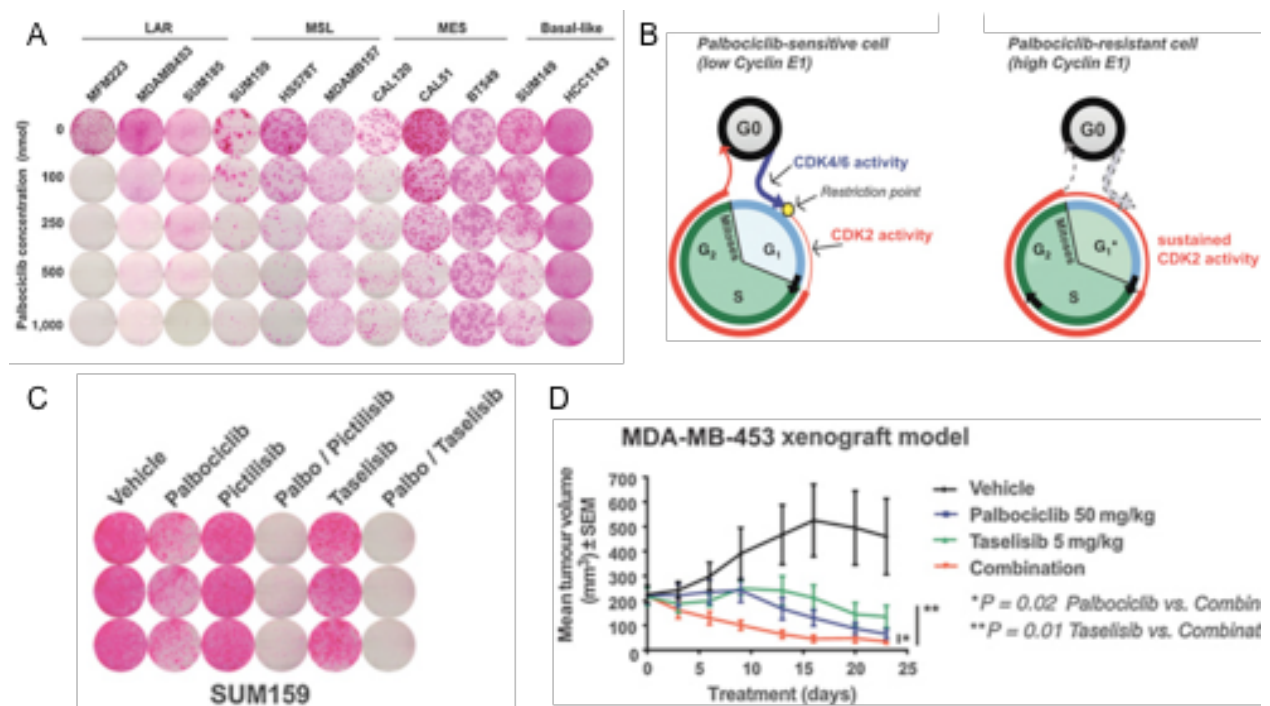


Fig 37 : Sensibilité de lignées cellulaires et de xénogreffes au Palbociclib et à un inhibiteur de PI3K.
 A : sensibilité *in vitro* de lignées cellulaires de différents sous-types moléculaires de TNBC au Palbociclib. (LAR=Luminal Androgen Receptor, MSL= Mesenchymal Stem Like, MES= Mesenchymal) : sensibilité accrue des lignées LAR.
 B : sensibilité/résistance au Palbociclib corrélée à la sortie de mitose avec des taux faibles/élevés de cycline E1 et donc une activité CDK2 faible/élevée.
 C : L'association du Palbociclib à 500nM à un inhibiteur PI3K (Pictilisib à 200nM ou Taselisib à 100nM) permet d'aller au delà de la résistance à ces deux inhibiteurs dans une lignée MSL.
 D : Régression plus marquée dans un modèle de xénogreffe LAR de la prolifération tumorale en combinant l'inhibiteur PI3K et l'inhibiteur CDK4/6.
 D'après Asghar et al. 2017 [192].

Introduction

Une étude a comparé la sensibilité de 44 lignées cellulaires de cancer du sein à l'Abemaciclib et confirme la moindre sensibilité des lignées TNBC. Néanmoins, certaines s'avèrent assez sensibles et cela dépend surtout du maintien d'une Rb intacte. Les lignées TNBC qui ont des taux basaux importants de Rb et sa forme phosphorylée (pRb) ainsi que de faibles niveaux de p16^{INK4A} sont les plus sensibles à l'Abemaciclib. Inversement, celles qui présentent des gains de copies ou des amplifications de *CCNE1* (avec dès lors des taux élevés de cycline E1) sont nettement moins sensibles. Dans cette même étude, des xénogreffes générées à partir de lignées TNBC exprimant soit des profils de biomarqueurs sensibles ou résistants ont été générées et leurs réponses à l'Abemaciclib en monothérapie ou en combinaison avec le Docetaxel ont été évaluées. En accord avec les données *in vitro*, les xénogreffes générées à partir d'une lignée présentant de faibles taux de pRb mais des taux élevés de p16^{INK4A} (HCC70) ne répondent pas au traitement par Abemaciclib. En revanche, des régressions de taille ou des maladies stables ont été obtenues avec les xénogreffes générées à partir des lignées caractérisées par des taux basaux élevés de pRb et de faibles taux de p16^{INK4A} (MDA-MB-231 et BT-20) (fig 38A-B). L'Abemaciclib permet de réduire les taux de pRb, de Rb et de FOXM1 (marqueur de progression dans le cycle) chez les xénogreffes MDA-MB-231 (fig 38C). La combinaison de l'Abemaciclib et du Docetaxel n'antagonise pas l'activité des deux agents. Enfin, le rôle de pRb comme biomarqueur prédictif de réponse à l'Abemaciclib est confirmé dans cette étude par l'emploi d'un siRNA (« small interfering RNA ») dirigé contre le gène de Rb1 dans les cellules MDA-MB-231 : leur taux basal de pRb se réduit significativement et en conséquence, elles sont moins sensibles à l'Abemaciclib (fig 38D) [356].

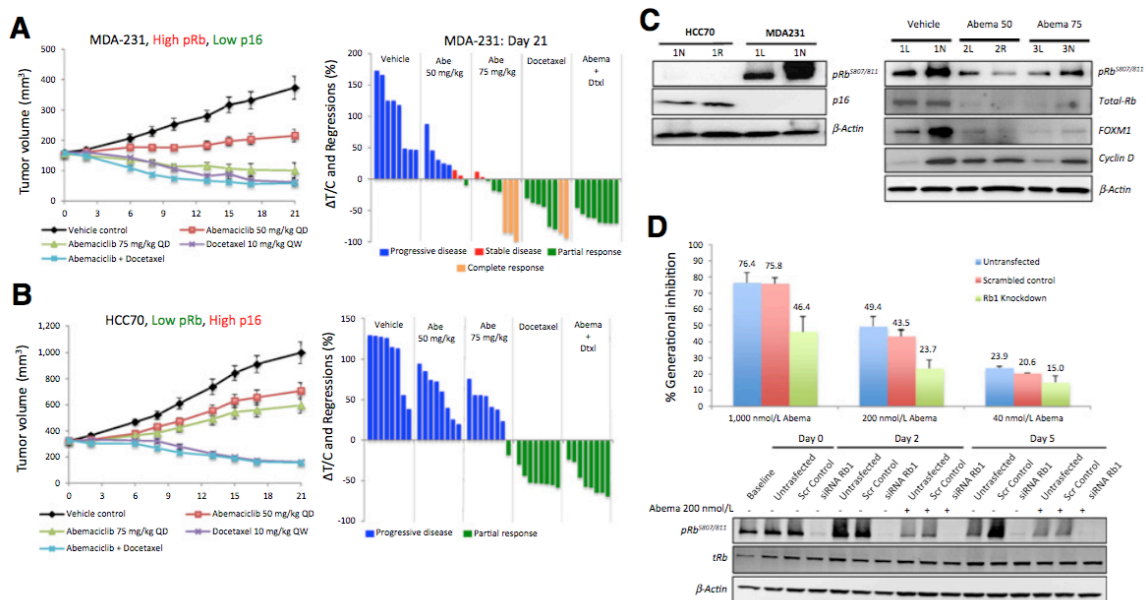


Fig 38: Activité de l'Abemaciclib dans des xénogreffes de TNBC.

A-B : Courbe de prolifération de xénogreffes à partir de la lignée MDA-MB-231 présentant des taux élevés de pRb et bas de p16^{INK41} et dès lors sensibles à l'Abemaciclib (A) ou de Xénogreffes générées à partir de la lignée HCC70, présentant un profil inverse de pRb et p16^{INK4A} et donc résistantes à l'Abemaciclib (B) : 8 souris par condition de traitement.

C : A gauche : Western Blot sur des tumeurs au début de la manipulation sur les deux lignées cellulaires. A Droite : Western Blot sur des tumeurs issues des xénogreffes MDA-MB-231 réalisés 24 heures après les 3 jours de traitement continu : régression avec l'Abemaciclib du pRb, du Rb total et de FOXM1.

D : Extinction via un siRNA anti Rb1 de la protéine Rb : cela confirme la nécessité d'une Rb fonctionnelle pour obtenir une réponse à l'Abemaciclib.

D'après O'Brien et al. 2018 [356].

Introduction

Dans leur étude, Liu et al. se sont intéressés au rôle des CDK 4 et 6 dans la dissémination métastatique. Ils ont remarqué que si le Palbociclib n'affecte pas la prolifération *in vitro* de cellules MDA-MB-231, il en réduit la migration et ont alors démontré dans deux modèles *in vivo* que le Palbociclib décroît la dissémination métastatique sans réduire la tumeur primaire. Le premier est un modèle de patient-derived-xenograft (PDX), issu d'une tumeur TNBC de haut grade, où le Palbociclib ne modifie pas la taille de la tumeur primaire mais diminue significativement le taux de métastases hépatiques (12,5% vs 75%) et pulmonaires (25% vs 75%) en comparaison à une solution saline. Le second est un modèle de xénogreffe générée à partir de cellules MDA-MB-231 où la tumeur primaire était retirée lorsqu'elle atteignait un volume de 400 mm³ avec poursuite du traitement pour 12 semaines supplémentaires. A nouveau, le Palbociclib réduisait significativement la dissémination vers les poumons. Ils ont identifié qu'une déubiquitine, la protéine DUB3, est essentielle pour stabiliser la protéine SNAIL, un des médiateurs de la transition épithélio-mésenchymateuse qui majore la dissémination métastatique. Or cette protéine DUB3 est activée par les CDK4/6 et est donc inactive en présence de Palbociclib [369].

Teo et al. ont montré que sur 6 lignées cellulaires TNBC Rb1-wild-type (dont les lignées MDA-MB-231 et HCC1806), l'Alpelisib (BYL719, inhibiteur PI3K α) et le Ribociclib (LEE011) ont des interactions synergiques. Celles-ci se traduisent en une réduction significative de la prolifération des tumeurs primaires en comparaison au traitement en monothérapie par l'un ou l'autre des 2 inhibiteurs dans des xénogreffes générées à partir de cellules MDA-MB-231 (type MSL) et HCC1806 (type basal-like) et dans un modèle de PDX-TNBC (fig 39A). Ils ont par ailleurs prouvé *in vitro* que la combinaison majore l'immunogénéité intratumorale et la mort immunogénique. Ensuite, la combinaison a été testée sur le modèle murin syngénique AT3OVA : greffe dans une souris immunocompétente d'une lignée TNBC murine AT-3 exprimant l'ovalbumine. Il s'avère que la combinaison y majore les réponses immunes antitumorales tant innées qu'adaptatives (activation de lymphocytes T) et que l'expression de PD-1 et CTLA-4 à la surface des lymphocytes T est accrue, suggérant d'ajouter un « checkpoint inhibiteur » à leur combinaison. Ils ont dès lors testé les « checkpoint inhibiteurs » sur le modèle AT3OVA et ont même réalisé un schéma de traitement par quadrithérapie (BYL719 + LEE011 + anti-PD-1 + anti-CTLA-4). Les différents traitements étaient administrés pendant 50 jours. Si en monothérapie « les checkpoint inhibiteurs » sont décevants dans le modèle AT3OVA, l'emploi d'une quadrithérapie est extrêmement efficace et permet de réduire (et non seulement ralentir) la prolifération de toutes les tumeurs ainsi traitées (10/10). La quadrithérapie assure même une réponse de longue durée puisque 5 des 10 tumeurs sont encore en régression un an après arrêt du traitement avec augmentation significative de survie des souris ainsi traitées en regard des autres conditions de traitement sans majoration de toxicité (Fig 39B) [370].

Fin 2018, l'étude de Yamamoto et al. a révélé que la combinaison du Palbociclib et du MLN0128 (inhibiteur double TORC 1/2 : voie mTOR : mammalian target of rapamycin) avait un effet synergique sur des lignées TNBC Rb+ et sur un modèle PDX-TNBC Rb+ [371].

Introduction

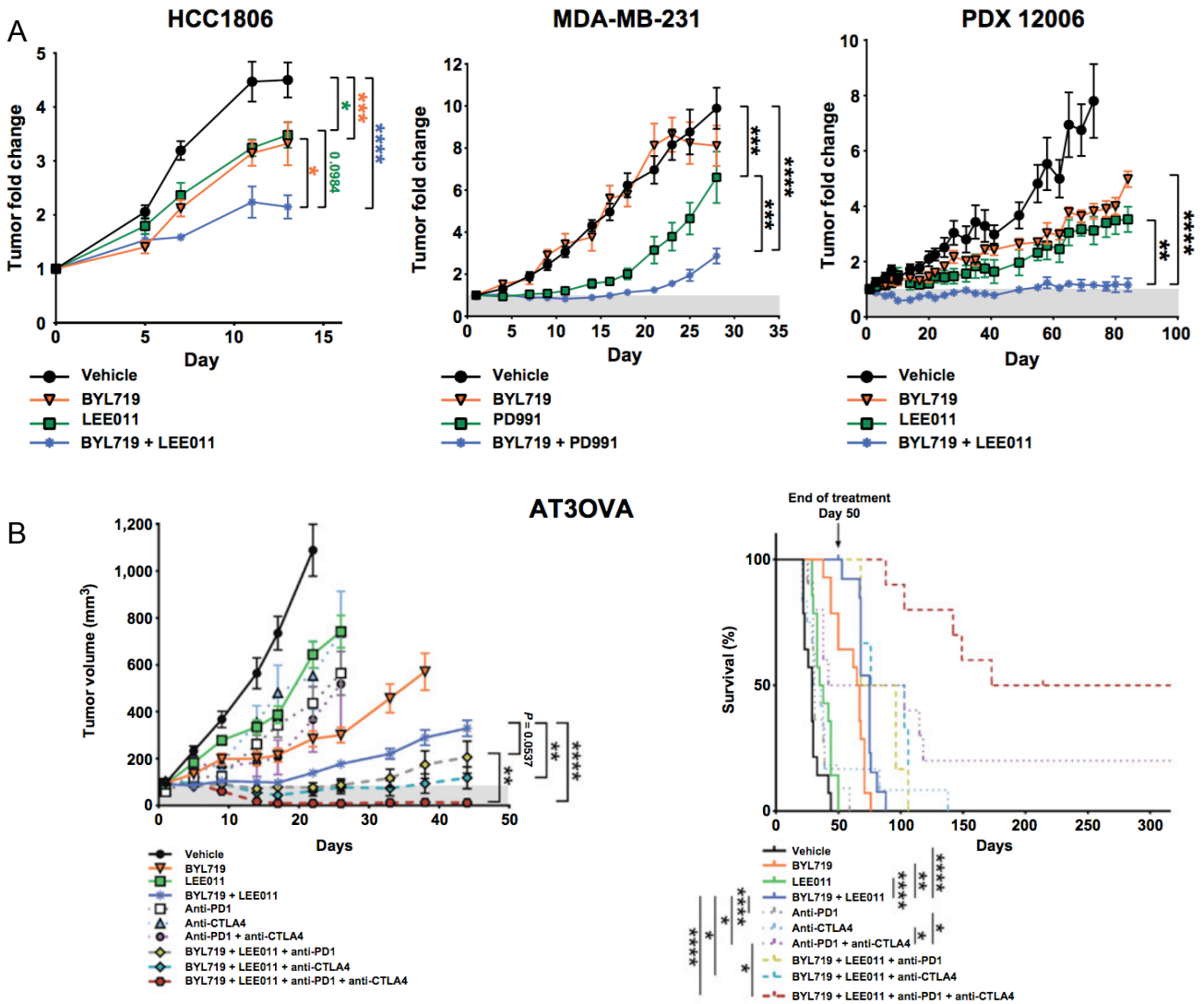


Fig 39 : Efficacité de la combinaison d'inhibiteur CDK 4/6 et PI3K.

A : Courbe de proliférations de xénogreffes générées à partir de cellules HCC1806 (à gauche), de cellules MDA-MB-231 (milieu) et de PDX-TNBC (à droite) : efficacité supérieure de la combinaison Ribociclib (LEE011)+Alpelisib (BYL719) sur les traitements en monothérapie.

B : Modèle AT3OVA : A gauche : courbes de prolifération et comparaison de l'efficacité d'inhibiteurs CDK4/6, PI3K et des checkpoints immunitaires en monothérapie ou combinaison. A droite : survie des souris à long terme suivant la condition de traitement. Les groupes traités par trithérapie comportaient initialement 6 souris, les autres de 10 à 14 souris.

D'après Teo et al. 2017 [370].

En 2016, l'étude de McClendon et al. a illustré la prudence dont la communauté scientifique doit faire preuve à l'avenir dans les combinaisons des inhibiteurs CDK 4/6 avec des agents qui reposent fortement sur la prolifération cellulaire pour exercer des effets cytotoxiques. En effet, tant *in vitro* sur des lignées TNBC Rb+ que *in vivo* sur des xénogreffes générées à partir de ces lignées, il apparaît que la combinaison du Palbociclib avec de la Doxorubicine a un effet cytostatique synergique mais qu'en fin de compte, elle réduit la cytotoxicité de la Doxorubicine. Cet effet protecteur pour les cellules n'est pas retrouvé au niveau de lignées déficientes pour Rb [372].

Introduction

Actuellement, quelques études cliniques avec des inhibiteurs CDK 4/6 sont en cours. Une étude de phase II évalue l'Abemaciclib chez des patientes atteintes de TNBC métastatique avec maintien de Rb (NCT03130439). Deux études de phases I/II se focalisent sur le sous-type LAR chez des patientes présentant un TNBC avancé en combinant un anti-androgène (le Bicalutamide) avec le Palbociclib (NCT02605486) ou le Ribociclib (NCT03090165) [341].

12.3.4. L'avenir proche des CDK 4/6

Plusieurs travaux indiquent qu'en cas de mutation *PIK3CA* les inhibiteurs **PI3K-mTOR** peuvent lever la résistance de tumeurs aux inhibiteurs CDK 4/6 et vice-versa tant *in vitro* que *in vivo* tant pour les TNBC que les cancers hormonosensibles [192, 370, 373, 374]. La résistance de lignées ER+ aux inhibiteurs CDK 4/6 a notamment été reportée à l'activation d'un couple inhabituel, le couple cycline D1-CDK2 par la voie PI3K. Les lignées et modèles *in vivo* sont souvent sensibles à cette combinaison et dans les cas de tumeurs ER+, l'ajout d'une hormonothérapie permet d'obtenir une régression de taille des tumeurs dans des modèles PDX [373, 374]. Des études cliniques s'intéressent donc à la combinaison d'inhibiteurs PI3K et CDK 4/6. Par exemple, les résultats d'une étude de phase I/II combinant du Fulvestrant avec du Ribociclib et un inhibiteur PI3K chez des patientes atteintes de cancer ER+/HER2- avancé sont attendus prochainement (NCT02088684) [341].

Outre l'induction d'un arrêt cellulaire, **les inhibiteurs CDK 4/6 accroissent la réponse immunitaire** anti-tumorale en augmentant la présentation d'antigènes par les cellules tumorales, en favorisant l'activation des lymphocytes T effecteurs et en réduisant la prolifération des lymphocytes T régulateurs. Assurément, les « checkpoints » sont impliqués dans ce lien entre immunité et inhibiteurs CDK 4/6 [375, 376]. Les résultats préliminaires d'une étude clinique de phase Ib combinant de l'Abemaciclib et du Pembrolizumab chez des patientes présentant un cancer ER+/HER2- métastatique montrent un ORR de 14,3% à 16 semaines [377]. La combinaison de « checkpoint inhibiteurs » et d'inhibiteurs CDK 4/6 mérite donc d'être investiguée dans des études cliniques randomisées en contrôle placebo.

En parallèle à la recherche de combinaisons efficaces avec les inhibiteurs CDK 4/6, de multiples efforts sont en cours visant à identifier des **biomarqueurs prédictifs** de réponse à ces inhibiteurs. Ces biomarqueurs pourraient être **cliniques**. Ainsi, une analyse combinée des études MONARCH 2 et 3 (plus de 1000 patients) indique que les patients présentant des facteurs de mauvais pronostic (métastases hépatiques, faible taux de récepteurs à la progestérone, tumeurs de haut grade) bénéficient plus fortement de l'Abemaciclib tant en impact sur la PFS que l'ORR [378]. Ils pourraient aussi être **moléculaires**. Cependant, la perte de **Rb fonctionnelle ou une mutation de *Rb1*** mène à une résistance aux inhibiteurs CDK 4/6 dans seulement 5% des cas comme l'indique la récente analyse issue de l'étude PALOMA-3 [379]. Dans les études cliniques PALOMA-1 et -2, aucune corrélation n'a été montrée entre les niveaux d'amplification de ***CCND1* (codant pour la cycline D1) ou les taux de p16^{Ink4a}** et la sensibilité au Palbociclib (pas de modification de survie). Il y'a donc en tout cas pour p16^{Ink4} une contradiction entre les données *in vitro* et les données chez les patients puisqu'*in vitro*, de faibles taux de p16^{Ink4} prédisaient une réponse aux inhibiteurs CDK 4/6 [341]. En revanche, l'analyse génétique de tumeurs dans l'étude PALOMA-3 indique que des **taux élevés de gène *CCNE1* (codant pour la cycline E1)** sont corrélés à une résistance au Palbociclib. La PFS

Introduction

moyenne en cas de faibles taux de *CCNE1* est de 14,1 mois sous Palbociclib vs 4,8 sous placebo (HR : 0,32). Si les taux de *CCNE1* sont élevés, ces données ne sont plus que de 7,6 mois vs 4 en faveur du Palbociclib (HR : 0,85) [380]. Le ciblage de CDK2 seul ou sa combinaison avec les inhibiteurs CDK 4/6 pourraient donc être des pistes intéressantes pour aller au delà de la résistance aux inhibiteurs de CDK 4/6.

Plan et objectifs

Plan et objectifs

Actuellement, les TNBC ne sont traités que par des agents de chimiothérapie : ceux-ci présentent de lourds effets secondaires et n'empêchent pas la survenue de taux élevés de récurrence précoce à distance (cerveau et poumon) de ces cancers. Dès lors, développer des traitements plus ciblés et efficaces contre les TNBC représente un réel défi.

L'identification de l'EGFR dans la majorité des TNBC [172] a motivé l'utilisation de monothérapies à base d'anticorps monoclonaux et de TKI ciblant l'EGFR ou les combinant à la chimiothérapie. Les résultats des études cliniques employant ces modalités thérapeutiques s'avèrent décevants [281]. Ceci pourrait être lié à l'absence de sélection des TNBC inclus dans ces études mais aussi à la nécessité de combiner les thérapies anti-EGFR à d'autres thérapies.

Notre laboratoire a identifié la MT4-MMP comme un nouveau partenaire de l'EGFR dans les TNBC [331]. Le rôle des MMPs et les caractéristiques uniques de la MT4-MMP ont été discutés dans l'introduction. Pour rappel, notre laboratoire a démontré que la MT4-MMP est surexprimée dans des cancers mammaires humains tant au niveau des tumeurs primaires que des métastases ganglionnaires. Elle favorise l'angiogenèse, l'intravasation et la dissémination à distance des cellules de TNBC par l'intermédiaire de ses fonctions protéolytiques en déstabilisant les vaisseaux sanguins par détachement des péricytes et élargissement de la lumière des vaisseaux [315, 330, 332]. Son effet mitogène sur les cellules de TNBC est par contre indépendant du site catalytique et de son action protéolytique. Il repose d'une part sur son interaction à la surface membrane avec l'EGFR qui a été prouvée tant par IHC que par immunofluorescence. La MT4-MMP augmente la phosphorylation de l'EGFR en réponse à une stimulation par l'EGF et le TFG α . L'effet mitogène est, d'autre part, lié à une activation accrue d'effecteurs du cycle cellulaire dont l'enzyme CDK4 qui mène à l'inactivation de Rb par phosphorylation (voir fig 33). Alexandra Paye et al. ont ainsi montré, dans un modèle 3D *in vitro*, que la MT4-MMP est un biomarqueur prédictif de réponse à l'Erlotinib et au Palbociclib [331]. Remarquons que des données *in vitro* et issues d'une étude de phase II semblaient conférer aux inhibiteurs CDK4/6 un rôle mineur dans le traitement des TNBC [367, 368].

Dans la première partie de ce travail, réalisée en collaboration avec le Docteur Cassandra Yip, nous avons cherché à déterminer la pertinence clinique de l'axe MT4-MMP/EGFR. Ainsi :

- nous avons, d'une part, eu recours à une analyse rétrospective de l'expression de la MT4-MMP et de l'EGFR sur des tissus obtenus lors de la chirurgie et issus de 81 patientes atteintes de TNBC n'ayant pas été soumises à une chimiothérapie néoadjuvante. Le taux d'expression de ces deux protéines a alors pu être déterminé et des corrélations entre l'expression de la MT4-MMP et de l'EGFR et les caractéristiques clinicopathologiques des patientes ont été recherchées. Enfin, le rôle pronostique de la MT4-MMP a été évalué en reliant son expression à une éventuelle modification de survie des patientes.
- nous avons, d'autre part, par l'emploi d'un modèle de prolifération cellulaire en culture 3D et de xénogreffes, cherché à confirmer les données obtenues rétrospectivement à partir des patientes et à attester *in vivo* sur xénogreffes le rôle de biomarqueur prédictif de réponse à l'Erlotinib de la MT4-MMP.

Plan et objectifs

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons investigué l'intérêt éventuel de la combinaison Erlotinib-Palbociclib dans le traitement des TNBC. Ainsi, les objectifs étaient les suivants :

1. déterminer le taux d'expression conjointe de la MT4-MMP, de l'EGFR et de Rb sur une banque de 72 échantillons humains obtenus lors de la chirurgie et issus de patientes atteintes de TNBC n'ayant pas été soumises à une chimiothérapie néoadjuvante. Cette analyse avait pour but de valider l'intérêt clinique de l'axe MT4-MMP/EGFR/Rb.
2. évaluer la réponse, dans des modèles de prolifération cellulaire en culture 2D et 3D de lignées Rb-négatives ou Rb-positives, aux monothérapies par Erlotinib ou Palbociclib et à leur combinaison.
3. étudier la réponse aux monothérapies par Erlotinib ou Palbociclib et à leur combinaison sur xénogreffes transplantées avec des cellules MDA-MB-231 (EGFR+/Rb+), transfectées ou non pour la MT4-MMP
4. valider nos différents résultats sur les réponses aux monothérapies et à la combinaison suscitées sur un modèle plus représentatif des cancers, le modèle des PDX. Nous avons cherché à valider la co-expression des 3 biomarqueurs comme un facteur prédictif de réponse à la combinaison Erlotinib-Palbociclib en utilisant des PDX issues de tumeurs présentant différents profils d'expression pour les 3 biomarqueurs. Nous avons au préalable vérifié que la banque d'échantillons de 37 PDX obtenues à partir de patientes atteintes de TNBC présentait des taux d'expression des différents biomarqueurs assez similaires à ceux obtenus dans la banque d'échantillons humains.

Le modèle des PDX est très intéressant car il présente de multiples opportunités [381]:

- il récapitule plus fidèlement l'hétérogénéité tumorale et assure le maintien de l'architecture tumorale humaine.
- il représente une source renouvelable de tissu tumoral.
- il permet l'évaluation préclinique d'agents thérapeutiques.

Les découvertes de notre laboratoire sur la MT4-MMP nous ont amenés à publier une revue sur cette métalloprotéinase.

La collaboration menée avec l'équipe du Docteur Elisabetta Marangoni de l'Institut Curie de Paris nous a également mené à réaliser les marquages pour Rb sur des lames de TMA (tissu micro array) représentant les différentes PDX-TNBC de leur laboratoire. Cette collaboration a abouti à une autre publication commune dans « Clinical Cancer Research » s'intéressant à la co-expression de TYMP et Rb en tant que biomarqueur prédictif de réponse à la Capécitabine pour les TNBC et à une publication en cours de révision dans « Science Translational Medicine » évaluant la réponse de PDX-TNBC aux inhibiteurs de topoisomérase-I en cas de phénotype BRCAness combiné à une haute expression de SLFN11 et à la perte de Rb.

Remarquons que les matériels et méthodes sont à chaque fois détaillés dans les articles repris par la suite.

Résultats

1. Première partie

Publication n°1 :

MT4-MMP and EGFR expression levels are key biomarkers for breast cancer patient response to chemotherapy and Erlotinib.

Cassandra Yip, Pierre Foidart, Joan Somja, Alice Truong, Mehdi Lienard, Emilie Feyereisen, Hélène Schroeder, Stéphanie Gofflot, Anne-Françoise Donneau, Joëlle Collignon, Philippe Delvenne, Nor Eddine Sounni, Guy Jerusalem and Agnès Noël*.*

Br J Cancer. 2017 Feb. * Co-senior authors

1.1. Taux de co-expression de la MT4-MMP et de l'EGFR dans les TNBC

Par une analyse rétrospective d'IHC sur échantillons de tissu mammaire sain de 24 patientes ayant subi une réduction mammaire et des échantillons de TNBC obtenus lors de la chirurgie chez 81 patientes n'ayant pas subi de chimiothérapie néoadjuvante, nous avons confirmé la surexpression des deux protéines parmi les échantillons de TNBC. Le taux de co-expression de la MT4-MMP et de l'EGFR y est de 72,5% (59/81). Remarquons que 79% des 59 cas présentant cette co-expression affichaient des aires de marquage pour les deux protéines communes dans des sections sériées (publication 1 : fig 1C). L'axe MT4-MMP/EGFR est donc impliqué dans près de $\frac{3}{4}$ des cas de TNBC.

1.2. Recherche de corrélation entre l'expression de la MT4-MMP et/ou de l'EGFR et les caractéristiques clinicopathologiques des patientes

Aucune corrélation n'a été retrouvée entre l'expression de la MT4-MMP et/ou de l'EGFR et le stade tumoral, la taille tumorale, l'atteinte ganglionnaire ou le pourcentage du Ki67.

1.3. Relation entre la MT4-MMP et la survie et rôle de biomarqueur prédictif à la chimiothérapie de la MT4-MMP

En concordance avec la littérature, l'expression d'EGFR est associée à une moindre survie sans récurrence. En revanche, à notre surprise, l'expression de la MT4-MMP $\geq 50\%$ des cellules tumorales est significativement corrélée à une amélioration d'OS et de PFS (publication 1 : fig 2) mais uniquement chez les patientes traitées par chimiothérapie, suggérant un rôle de cette métalloprotéase dans la réponse à la chimiothérapie.

1.4. Confirmation in vitro du rôle de biomarqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie de la MT4-MMP : uniquement pour les agents ciblant l'ADN

Dans un modèle *in vitro* en 3D, l'inhibition de la prolifération de cellules MDA-MB-231 par des agents de chimiothérapie ciblant l'ADN soit intercalant (Epirubicine), soit alkylant (Cyclophosphamide, Cisplatine), est plus prononcée pour les cellules transfectées pour la MT4-MMP (publication 1 : fig 3A-C). En revanche, l'expression de la MT4-MMP n'augmente pas la sensibilité au Paclitaxel (publication 1 : fig 3E), agent inhibant la dépolymérisation des microtubules et connu pour perturber les MMP-2 et -9 [382]. La densité de MT4-MMP à la surface cellulaire est inversement proportionnelle à la dose de Paclitaxel employée (publication 1 : fig 3F) et entraîne dès lors une moindre interaction de la MT4-MMP avec l'EGFR à la

Résultats

surface cellulaire. Le Paclitaxel interfère ainsi avec l'internalisation et le recyclage à la membrane de la MT4-MMP.

1.5. Confirmation *in vivo* du rôle de biomarqueur prédictif de réponse à l'Erlotinib et à l'Epirubicine de la MT4-MMP

Après reproduction de l'observation publiée par Alexandra Paye et al. de la plus haute sensibilité en culture 3D des cellules MDA-MB-231 exprimant la MT4-MMP à l'Erlotinib (publication 1 : fig 3D), nous avons confirmé *in vivo* le rôle de biomarqueur prédictif de réponse à l'Erlotinib et à l'Epirubicine de la MT4-MMP sur des xénogreffes ayant été transplantées avec des cellules MDA-MB-231 transfectées ou non pour la MT4-MMP (publication 1 : fig 4). Nous avons également montré *in vivo* que la combinaison à doses suboptimales d'Erlotinib et Epirubicine mène à une réduction drastique de la prolifération uniquement pour les tumeurs exprimant la MT4-MMP (publication 1 : fig 5).

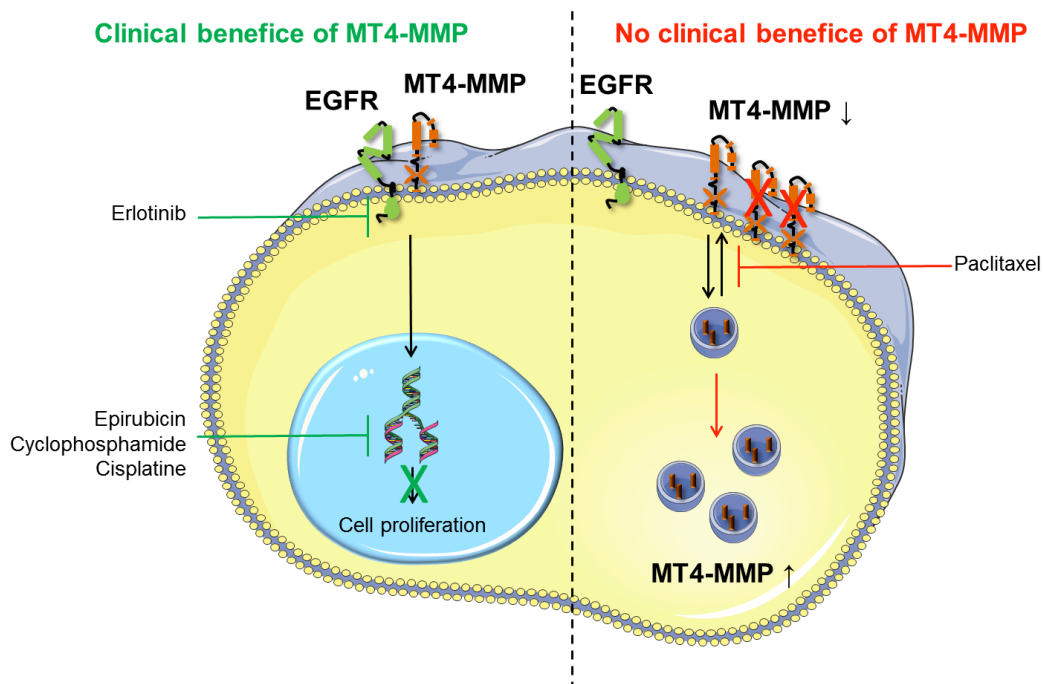


Fig 40 : Schéma récapitulatif du rôle de biomarqueur prédictif de réponse de la MT4-MMP aux agents de chimiothérapie et à l'Erlotinib.

Keywords: triple-negative breast cancer; MT4-MMP; EGFR; chemotherapy; erlotinib; biomarker

MT4-MMP and EGFR expression levels are key biomarkers for breast cancer patient response to chemotherapy and erlotinib

Cassandra Yip¹, Pierre Foidart^{1,2,3}, Joan Somja⁴, Alice Truong¹, Mehdi Lienard¹, Emilie Feyereisen¹, Hélène Schroeder², Stéphanie Gofflot⁵, Anne-Françoise Donneau⁶, Joëlle Collignon², Philippe Delvenne⁴, Nor Eddine Sounni¹, Guy Jerusalem^{2,3,7} and Agnès Noël^{*,1,7}

¹Laboratory of Tumor and Developmental Biology, Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliqué-Cancer (GIGA-Cancer), University of Liège, Liège 4000, Belgium; ²Department of Medical Oncology, University Hospital of Liège (CHU), Liège 4000, Belgium; ³Faculty of Medicine, University of Liège, Liège 4000, Belgium; ⁴Laboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liège, Liège 4000, Belgium; ⁵Biobank (Biothèque Universitaire de Liège), University of Liège, Liège 4000, Belgium and ⁶Department of Biostatistics, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

Background: Triple-negative breast cancers (TNBC) are heterogeneous cancers with poor prognosis. We aimed to determine the clinical relevance of membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP), a membrane type matrix metalloproteinase that interacts with epidermal growth factor receptor (EGFR) overexpressed in >50% of TNBC.

Methods: We conducted a retrospective immunohistochemical analysis on human TNBC samples (n=81) and validated our findings in *in vitro* and *in vivo* assays.

Results: Membrane type-4 matrix metalloproteinase and EGFR are produced in 72.5% of TNBC samples, whereas those proteins are faintly produced by healthy tissues. Unexpectedly, tumour relapse after chemotherapy was reduced in samples highly positive for MT4-MMP. Mechanistically, this is ascribed to a higher sensitivity of MT4-MMP-producing cells to alkylating or intercalating chemotherapeutic agents, as assessed *in vitro*. In sharp contrast, MT4-MMP expression did not affect tumour cell sensitivity to paclitaxel that interferes with protease trafficking. Importantly, MT4-MMP expression sensitised cancer cells to erlotinib, a tyrosine kinase EGFR inhibitor. In a pre-clinical model, the growth of MT4-MMP overexpressing xenografts, but not of control ones, was reduced by epirubicin or erlotinib. The combination of suboptimal drug doses blocked drastically the growth of MT4-MMP-producing tumours.

Conclusions: We demonstrate that MT4-MMP defines a sub-population of TNBC sensitive to a combination of DNA-targeting chemotherapeutic agents and anti-EGFR drugs.

Breast cancer is a highly prevalent cancer in women around the world (Torre *et al.*, 2015). According to gene expression, six main intrinsic molecular subtypes of breast cancers are known: luminal A (HER2 negative), luminal B (triple-positive tumours), human

epidermal growth factor receptor 2 (HER2) enriched, basal-like or/and triple-negative breast cancer, normal breast-like group and claudin low (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001; Carey *et al.*, 2006; Herschkowitz *et al.*, 2007). Triple-negative breast cancers (TNBC)

*Correspondence: Professor A Noël; E-mail: agnes.noel@ulg.ac.be

⁷Co-senior authors.

Received 22 December 2016; accepted 5 January 2017

© 2017 Cancer Research UK. All rights reserved 0007–0920/17

representing 15% of breast cancers, are defined by the lack of expression of three receptors: oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2. Triple-negative breast cancers are closely associated to basal-like breast cancers characterised by the expression of basal cytokeratin (CK) 5/6, CK14 and CK17. Bertucci *et al* (2008) reported that 71% of TNBC are found to be basal-like, whereas 77% of basal-like cancers are triple-negative. Triple-negative breast cancers are associated with aggressive features and poor clinical outcomes without efficient hormonal or targeted treatment options. Patients diagnosed with TNBC have a higher risk of relapse within 5 years than patients treated for other breast cancer subtypes (Bauer *et al*, 2007). Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in > 50% of TNBC (Carey *et al*, 2010). Importantly, the rate of mutation for this receptor in breast cancer is low (10%) and is found mainly in Asian populations (Teng *et al*, 2011). Unfortunately, anti-EGFR-targeted therapy using antibodies (cetuximab; Carey *et al*, 2012; Baselga *et al*, 2013) or tyrosine kinase inhibitors (TKI; erlotinib, dasatinib) (Finn *et al*, 2011; Layman *et al*, 2013) in combination with chemotherapies were globally disappointing in clinical trials of TNBC (Yadav *et al*, 2014). Some clinical activity has been observed with immunotherapy (Nanda *et al*, 2016) and many clinical trials are ongoing in this field (Collignon *et al*, 2016) but no immunotherapy agent is currently approved for TNBC treatment. Therefore, the development of new strategies targeting TNBC or biomarker for a better patient stratification for conventional or targeted treatments is crucially needed.

We have recently identified the membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP or MMP17) as a new EGFR partner (Paye *et al*, 2014). Membrane type-4 matrix metalloproteinase belongs to the family of MT MMP that are tethered to the cell membrane through a trans-membrane domain (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP and MT5-MMP) or a glycosylphosphatidylinositol anchor (MT4-MMP and MT6-MMP). Although the involvement of MMPs in cancer progression is well recognised and documented (Kessenbrock *et al*, 2010; Noel *et al*, 2012), only a few clinical and experimental studies report on MT4-MMP roles in cancer. Among the MMP family, MT4-MMP displays unique features and contributes to different steps of cancer progression through proteolytic and non-proteolytic functions (Chabotiaux *et al*, 2006, 2009; Host *et al*, 2012; Paye *et al*, 2014). Membrane type-4 matrix metalloproteinase internalisation and recycling rely on a unique CLIC/GEEK pathway dependent on cdc-42 (Truong *et al*, 2016). In an experimental setting, MT4-MMP overexpression stimulated tumour growth, angiogenesis and lung metastases (Chabotiaux *et al*, 2006, 2009; Paye *et al*, 2014). The MT4-MMP impact on haematogenous metastatic dissemination is related to its capacity to remodel blood vasculature in a proteolytic-dependent manner (Host *et al*, 2012). In line with these findings, MT4-MMP has also been reported to play a significant role in hypoxia-mediated metastasis and to be an important prognostic indicator in patients with head and neck or gastric cancer (Huang *et al*, 2009; Wang *et al*, 2015). Beyond promoting cell invasiveness, MT4-MMP overexpression also endows TNBC cells with a higher proliferation rate (Paye *et al*, 2014). Indeed, in a non-proteolytic manner, MT4-MMP interferes with the EGFR pathway and promotes EGFR activation in response to its ligands.

In this study, we investigated the clinical relevance of MT4-MMP/EGFR axis by immunohistochemical (IHC) analyses and found that MT4-MMP and EGFR expressions were enhanced in >70% of human TNBC tissues. We also established an unprecedented link between high MT4-MMP expression and high progression-free survival (PFS) in TNBC patients. We demonstrate that MT4-MMP plays a key role in tumour response to alkylating and intercalating chemotherapeutic drugs, but not to drug targeting microtubules. This novel concept is supported by *in vitro* and

in vivo studies. Importantly, MT4-MMP expression sensitises tumours to a combination of chemotherapeutic and targeted anti-EGFR (erlotinib) drugs.

MATERIALS AND METHODS

Immunohistochemistry and analysis of samples. Human TNBC cancer samples ($n = 81$) and normal breast tissue ($n = 24$) issued from mammary reduction were provided by the Biobank of the University Hospital of Liège (University of Liège, Belgium). The specimen collection and the distribution of human samples to researchers follow the rules imposed by the current legislation and the recommendations of the institutional review board (Comité d'éthique Hospitalo-Facultaire Universitaire de Liège), which approved this study. Human samples were formalin (4%) fixed and paraffin embedded. The immunostainings of MT4-MMP and EGFR were performed on adjacent slides. For MT4-MMP immunohistochemistry, tumour sections ($6 \mu\text{m}$ thick) were incubated in citrate buffer (DAKO S2031, Santa Clara, CA, USA) for 1 h at 80°C . Endogenous peroxidases were subsequently blocked by 3% $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ for 20 min, and non specific binding was prevented by incubation in PBS/10% bovine serum albumin (Fraction V, Acros Organics, Fair Lawn, NJ, USA) for 1 h. Slides were first incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal anti-human-MT4-MMP antibody (1/500; AB39028; Abcam, Cambridge, USA) and then with a HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Envision System-Labeled Polymer-HRP, DAKO, K4003), for 30 min, at room temperature. For staining, 3-3' diaminobenzidine hydrochloride (DAKO, K3468) was incubated for 3 min. Slides were finally counterstained with haematoxylin and mounted with Eukitt medium for microscope observation. For EGFR staining, antigen retrieval was performed with EDTA buffer. Slides were incubated with a rabbit monoclonal anti-EGFR antibody (5B7; 790-4347, Ventana Medical Systems, Roche, Indianapolis, IN, USA) for 32 min, and signal amplification was achieved by using an amplification kit (760-080, Ventana Medical Systems, Roche) in a series automated slide stainer (Discovery XT, Ventana Medical Systems, Roche). Finally, sections were incubated with universal secondary antibody (760-4205, Ventana Medical Systems, Roche) for 32 min and signal was detected with DAB Map detection kit (760-124, Ventana Medical Systems, Roche). Counterstaining was performed with haematoxylin II (790-2208, Ventana Medical Systems, Roche). The specificity of MT4-MMP antibody has been tested on xenografts of human MDA-MB-231 cell line expressing or not MT4-MMP. The anti-EGFR antibody is currently used by anatomo-pathologists in clinical routine. Omission of the first antibody served as negative control.

The IHC results for EGFR and MT4-MMP were recorded as the percentage of breast cancer cell number showing a positive staining. The percentage of breast cancer cells expressing MT4-MMP or EGFR was determined by a pathologist. Ki67 positivity was quantified as the percentage of positive nuclear staining of tumour cells. A cut off of 20% was used for assessing the active proliferation (Huang *et al*, 2013). Cytokeratin 5/6 staining was considered positive when >10% tumour cells were labelled (Gazinska *et al*, 2013).

Cell culture. Human TNBC cells (MDA-MB-231) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, L-glutamine (2 mmol^{-1}), penicillin (100 U ml^{-1}) and streptomycin (100 mg ml^{-1}), at 37°C , in a 5% CO_2 humid atmosphere. All culture reagents were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). MDA-MB-231 cells were stably transfected

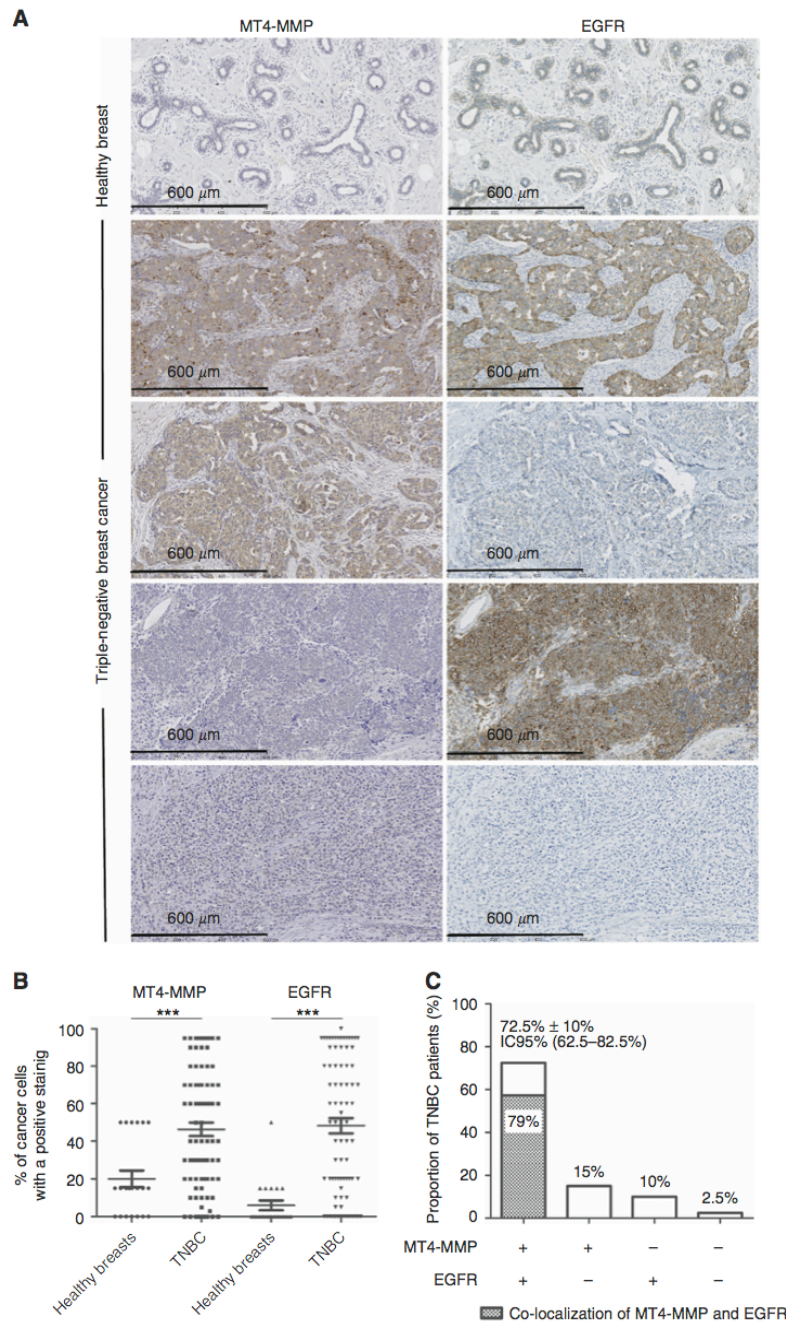


Figure 1. Immunohistochemical detection of MT4-MMP and EGFR in healthy breast tissues ($n = 24$) and TNBC samples ($n = 81$). **(A)** Representative immunostainings of MT4-MMP and EGFR in healthy breast and TNBC samples. **(B)** Distribution of the percentage of cancer cells with a positive MT4-MMP or EGFR staining in healthy breasts and TNBC. **(C)** Proportion of patients with TNBC presenting a double immunostaining (MT4-MMP +/EGFR +), a single staining of MT4-MMP or EGFR (MT4-MMP +/EGFR- or MT4-MMP-/EGFR +) and a negative staining (MT4-MMP-/EGFR-). The proportion of patients with a co-localisation of MT4-MMP and EGFR is also represented inside the histogram by the crosshatching area. $***P < 0.001$.

by electroporation with pcDNA3-neo vector, either empty (control plasmid, CTRL) or containing the active human full-length MT4-MMP cDNA (Chabottaux *et al*, 2009) tagged or not by a FLAG peptide

(DYKDDDDK) after Pro319 (Host *et al*, 2012). Stable transfectants were cultured in medium containing $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ of G418 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

Table 1. Clinicopathological details of patients

Number of patients	81
Median follow-up	53 months
Median age	60 years
Median progression-free survival	21 months
Median overall survival	28 months
Tumour	
T1	41 (50.6%)
T2	31 (38.3%)
T3	7 (8.6%)
T4	2 (2.5%)
Node	
N0	50 (61.7%)
N1	20 (24.7%)
N2	7 (8.6%)
N3	3 (3.7%)
Unknown	1
Metastases	
M0	81 (100%)
M1	0
Stage	
1	34 (42%)
2	30 (37%)
3	16 (19.8%)
Unknown	1
Ki67	
Negative (<20%)	16 (19.8%)
Positive (≥20%)	63 (77.8%)
Unknown	2
CK5/6	
Negative (<10%)	37 (45.7%)
Positive (≥10%)	44 (54.3%)
Chemotherapy after surgery	
Yes	55 (67.9%)
No	24 (29.6%)
Unknown	2
Radiotherapy after surgery	
Yes	59 (72.8%)
No	19 (23.5%)
Unknown	3

Abbreviation: CK5/6 = cytokeratin5/6.

In vitro 3-dimensional proliferation assay and DNA quantification.

A first layer of Matrigel mixed with an equal volume of culture medium without cells was seeded into 48-well plates (120 µl per plate). Cells (10⁴) suspended in medium (100 µl) were mixed with cold Matrigel (100 µl) and seeded on the first Matrigel layer. Cells were grown in DMEM supplemented with 1% FBS, L-glutamine (2 mmol l⁻¹), penicillin (100 U ml⁻¹) and daily treated with EGF (20 ng ml⁻¹). The different drugs used include erlotinib (CP358774; LC Laboratories, Woburn, MA, USA), epirubicin, cyclophosphamide, paclitaxel or cisplatin, which were all kindly provided by the Pharmacology department of CHU. For drug treatment, cells were incubated in Matrigel during 24 h and the drug was added to the culture medium every 2 days, at the indicated concentrations. After 7 days, cells were recovered from 3D cultures upon treatment with 200 µl of Dispase (VWR, Radnor, PA, USA), for 2 h at 37 °C. After two washes in PBS, cell pellets were diluted in PBS (1 ml) and sonicated. Fluorimetric DNA titration was performed by measuring fluorescence in a Spectra Max Gemini Xs (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), at 355 nm excitation and 460 nm emission. Results are expressed as percentage of proliferation inhibition of treated cells compared to the untreated cells (100% corresponding to a complete proliferation inhibition of treated cells compared to the untreated cells).

In vivo tumorigenicity. The *in vivo* experiments have been approved by the ethical committee (Comité d'éthique Hospitalo-

Facultaire Universitaire de Liège). Subconfluent cells were trypsinised, suspended in serum-free medium (5 × 10⁶ cells ml⁻¹), and mixed with an equal volume of cold Matrigel (Chabotiaux *et al*, 2006). Cell suspension (10⁶ cells in 400 µl) was injected subcutaneously into RAG-1 immunodeficient mice at both flanks. Our laboratory has previously reported that the tumour promoting effect of MT4-MMP is similarly observed when tumour cells are injected subcutaneously or in the mammary fat pad (Paye *et al*, 2014). Tumour growth was assessed by measuring the length and width of tumours every 3–4 days. Tumour volumes were estimated using the formula: length × width² × 0.4 (Maillard *et al*, 2005). When the tumour volume reached 200 mm³, mice were randomised into different experimental groups (four mice per group). Mice were intraperitoneally injected with epirubicin (4 mg kg⁻¹, twice a week) and/or orally treated with erlotinib (50 mg kg⁻¹, every day). NaCl 0.9% or captisol 6% was used as vehicles for epirubicin and erlotinib, respectively. When using suboptimal doses of chemotherapeutic agents (six mice per group), mice were treated with 2 mg kg⁻¹ of epirubicin twice a week and/or 50 mg kg⁻¹ of erlotinib every 2 days when the tumour volume reached 100 mm³. In those assays, results are expressed as relative tumour volume: tumour volume measured at a specific time point divided by the tumour volume measured at day 0, which corresponds to the first day of treatment. The results were presented as the mean of the relative tumour volume for each experimental group with the s.e.m. Statistical significance was evaluated by using the two-way repeated ANOVA.

Flow cytometry. MDA-MB-231 (5 × 10⁵ cells per condition) expressing MT4-MMP-Flag (Truong *et al*, 2016) or not were treated or not with paclitaxel (10, 50 or 100 nM), epirubicin (100 nM) or erlotinib (100 nM). After 12 h, cells were detached with Accutase, and fixed and permeabilised with the Cytofix/Cytoperm kit (554714; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 40 min at 4 °C. After washing, cells were incubated with a FITC-conjugated mAb against Flag M2 (1:500 dilution, F4049; Sigma, St Louis, MO, USA) in 1% BSA/PBS, for 1 h at 4 °C. After washing, cells were analysed by flow cytometry, with 10 000 events (FACS Calibur II; BD Biosciences). For the membrane staining, we followed the same procedure and omitted the fixation and permeabilisation. The median fluorescence intensity of cells treated with paclitaxel was normalised to that of MDA-MB-231 control cells, and compared to untreated cells considered as 100%.

Immunofluorescence and confocal microscopy. MDA-MB-231 cells expressing MT4-MMP were grown on 12 mm sterile round glass coverslips. After 24 h of incubation, cells were treated or not with 10, 50 or 100 nM of paclitaxel. After 12 h, cells were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde and permeabilised for 5 min with 0.25% Triton X-100/PBS, at room temperature. Slides were blocked in PBS containing 1% BSA and 10% normal goat serum solution, and incubated with an antibody against MT4-MMP (1:100 dilution, Ab51075; Abcam) and an antibody against alpha 1 Sodium Potassium ATPase referred as a plasma membrane marker (1/200 dilution, Ab7671; Abcam) in 1% BSA/PBS overnight at 4 °C. Cells were then incubated with the secondary antibody, that is, Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (1:200 dilution, A11035; Invitrogen) and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:1000 dilution, A11029; Invitrogen) in 1% BSA/PBS, for 1 h at 37 °C. Finally, cells were mounted on slides with Dapi Fluoromount-G (0100-20; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) and analysed on an Olympus FV1000 confocal microscope with ×60 oil immersion objective (Olympus America, Waltham, MA, USA).

Statistical analysis. The impact of MT4-MMP and EGFR on the tumour status (T1-2 vs T3-4), the nodal stage (N0-1 vs N2-3) and the Ki67 (<20 vs ≥20%) were assessed using univariate and multivariate binary logistic regressions. Results were presented using odds ratios with corresponding 95% confidence intervals.

Table 2. Correlation of MT4-MMP and/or EGFR staining in TNBC with clinicopathological parameters using logistic regression and proportional odds model

Parameters	OR (95% CI) crude		OR (95% CI) EGFR and MT4-MMP adjusted	
	EGFR	MT4-MMP	EGFR	MT4-MMP
Tumours				
T1-T2	1.01 (0.99–1.03)	1.01 (0.99–1.04)	1.01 (0.99–1.03)	1.01 (0.98–1.04)
T3-T4	<i>P</i> = 0.41	<i>P</i> = 0.42	<i>P</i> = 0.39	<i>P</i> = 0.43
Nodes				
N0-N1	1.01 (0.98–1.03)	0.97 (0.94–1.01)	1.01 (0.98–1.03)	0.97 (0.94–1.01)
N2-N3	<i>P</i> = 0.62	<i>P</i> = 0.10	<i>P</i> = 0.66	<i>P</i> = 0.094
Stages				
1				
2	1.00 (0.99–1.01)	0.99 (0.98–1.01)	1.00 (0.99–1.01)	1.00 (0.99–1.02)
3	<i>P</i> = 0.98	<i>P</i> = 0.71	<i>P</i> = 0.97	<i>P</i> = 0.60
Ki67				
<20%	1.00 (0.99–1.03)	1.00 (0.98–1.02)	1.00 (0.99–1.03)	0.99 (0.98–1.02)
≥20%	<i>P</i> = 0.30	<i>P</i> = 0.91	<i>P</i> = 0.31	<i>P</i> = 0.75

Abbreviations: CI = confidence interval; EGFR = epidermal growth factor receptor; MT4-MMP = membrane type-4 matrix metalloproteinase; OR = odds ratio; TNBC = triple-negative breast cancers.

Table 3. Multivariate analyses of overall survival and progression-free survival by Cox's proportional hazard model

	HR	95% CI	P-value
Complete cohort			
Overall survival			
EGFR	1.01	0.99–1.03	0.1848
MT4-MMP	0.98	0.95–1.00	0.0464*
Progression-free survival			
EGFR	1.03	1.01–1.05	0.0071**
MT4-MMP	0.97	0.94–0.99	0.0040**
Patients treated with chemotherapy			
Overall survival			
MT4-MMP	0.96	0.91–1.01	0.0802*
Progression-free survival			
MT4-MMP	0.93	0.88–0.98	0.0059**
Patients untreated with chemotherapy			
Overall survival			
MT4-MMP	1.00	0.94–1.06	0.9154
Progression-free survival			
MT4-MMP	1.02	0.97–1.06	0.5232

Abbreviations: CI = confidence interval; EGFR = epidermal growth factor receptor; HR = hazard ratio; MT4-MMP = membrane type-4 matrix metalloproteinase. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

The impact of MT4-MMP and EGFR on the stage of the tumour was evaluated using univariate and multivariate proportional odds models (ordinal regression). Cumulative odds ratios and respective 95% confidence intervals were estimated. Cox's proportional odds models were used to analyse the effect of MT4-MMP and EGFR on the overall survival (OS) and PFS. Additional analyses were applied to determine the impact of MT4-MMP on PFS in patients treated or not with chemotherapy independently. Results were presented using hazard ratios with corresponding 95% confidence intervals. Those investigations were depicted graphically using Kaplan-Meier curve. Results were considered to be significant at the 5% critical level. Analyses were carried out using SAS 9.4 (World Headquarters and SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

RESULTS

MT4-MMP and EGFR are both overexpressed in the majority of TNBC. Immunohistochemical stainings for MT4-MMP and

EGFR were performed on healthy breast tissues (*n* = 24) and tumour samples issued from the cohort described below. MT4-MMP and EGFR expressions were represented by the percentage of cancer cells positive for each immunostaining. Whereas, low MT4-MMP and EGFR expression was observed in healthy breast, their expression was increased in TNBC (Figure 1A and B). The different expression patterns (MT4-MMP + /EGFR +, MT4-MMP + /EGFR -, MT4-MMP - /EGFR + and MT4-MMP - /EGFR -) are illustrated in Figure 1A. Interestingly, 72.5% (59 out of 81) of TNBC patients expressed MT4-MMP and EGFR together, whereas 25% (20 out of 81) expressed MT4-MMP or EGFR and 2.5% (2 out of 81) were negative for the both proteins. Among the 72.5% of TNBC patients who expressed MT4-MMP and EGFR, 79% displayed common stained areas for both proteins in serial section of TNBC (Figure 1C).

TNBC cohort and patient characteristics. Clinical and histological characteristics of patients (*n* = 81) with TNBC are reported in Table 1. The patients who have received neoadjuvant treatment have been excluded from the study. This retrospective cohort consists of women aged from 27 to 89 years diagnosed between February 1999 and September 2013 with a median follow-up of 53 months (4.4 years). During the follow-up, 34 (42%) patients relapsed or presented progressive disease and 30 (37%) died. All patients had surgery as the upfront treatment option. Most patients received also adjuvant radiotherapy (59 out of 78, 75.6%) and chemotherapy (55 out of 79, 69.6%). The majority of patients receiving adjuvant chemotherapy were treated with the combination of epirubicin and cyclophosphamide associated or not with fluorouracile and/or taxane (*n* = 45). The other patients received CMF (cyclophosphamide methotrexate 5-fluorouracile) (*n* = 5). The majority of patients were clinical stage 1 (42.5%) and 2 (37.5%), only 20% of samples were stage 3. The half of patients (44.7%) presented lymph node invasion, but no distant metastases were observed. Ki67 expression was at least 20% in 63 (79.7%) patients. The half of patients (54.3%) expressed CK5/6, a marker of basal-like tumours.

We next searched for putative association between MT4-MMP and EGFR expressions, and several clinicopathological variables in TNBC patients (Table 2). The statistical analyses were assessed by considering MT4-MMP and EGFR expression as continuous variables without using any arbitrary cut offs. There was no significant association between MT4-MMP or EGFR expression with any of the clinicopathological features evaluated (tumour size, nodal status, stage or Ki67). Similar results were observed

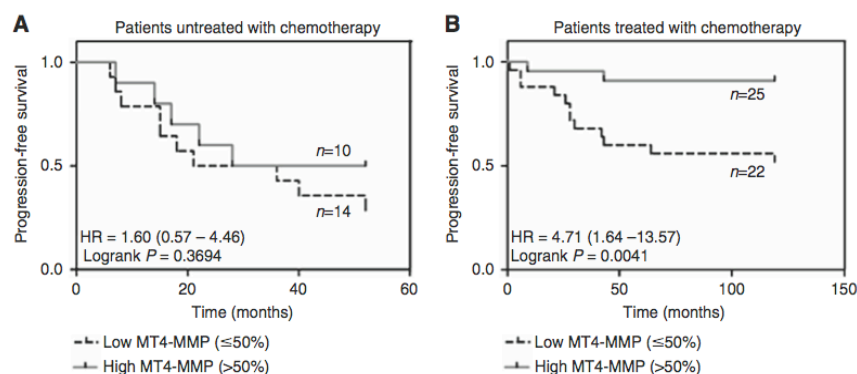


Figure 2. Kaplan–Meier progression-free survival (PFS) curves from patients untreated by chemotherapy ($n = 24$) and TNBC patients treated with chemotherapy ($n = 47$) according the MT4-MMP expression. (A) No significant difference in PFS was observed in patients untreated with chemotherapy. (B) A significant difference in PFS was observed in patients treated with chemotherapy when more than 50% of breast cancer cells expressed MT4-MMP. Note: 95% confidence interval is represented between the parentheses. HR, hazard ratio.

when evaluating the impact of MT4-MMP expression by adjusting the EGFR variable, and vice versa (Table 2). In conclusion, MT4-MMP and EGFR were not associated to the tumour size, nodal status, stage or Ki67, whether analysed separately or together.

MT4-MMP expression influences TNBC patients' survival and progression-free survival. In our cohort, EGFR expression is correlated with a poor PFS ($P = 0.0071$) but not with a shorter OS ($P = 0.1848$). Surprisingly, MT4-MMP expression was associated with a significant better OS ($P = 0.0464$) and PFS ($P = 0.0040$) (Table 3). The impact of MT4-MMP on OS and PFS was not highlighted for patients untreated with chemotherapy suggesting that the benefit of MT4-MMP on OS and PFS was linked to the response of patients to chemotherapy (Table 3). Indeed, in the cohort of patients treated with chemotherapy, MT4-MMP was still linked to a better OS ($P = 0.0802$) and PFS ($P = 0.0059$). The impact of MT4-MMP expression on PFS in patients treated or not with chemotherapy is illustrated by the Kaplan–Meier curves applying a cut off of 50%, which corresponded to the cut off from which a significant impact of MT4-MMP on PFS was observed (Figure 2).

MT4-MMP expression sensitises TNBC cells to chemotherapies *in vitro*. Our clinical data prompted us to conduct an *in vitro* study to assess whether MT4-MMP expression could influence the response of TNBC cells to chemotherapeutic agents. The proliferation rate of TNBC MDA-MB-231 cells overexpressing MT4-MMP (MT4-MMP cells) or not (CTRL cells) was evaluated in a 3D-matrigel assay to better mimic the *in vivo* situation, as previously described (Paye *et al*, 2014). Cells were treated with increasing concentrations of different chemotherapeutic agents. Four chemotherapeutic agents currently used in the clinic were evaluated: epirubicin, cyclophosphamide, cisplatin and paclitaxel. Interestingly, the overexpression of MT4-MMP conferred a therapeutic benefit to epirubicin, cyclophosphamide and cisplatin (Figure 3A–C). Indeed, the proliferation of MDA-MB-231 cells overexpressing MT4-MMP was more affected in the presence of these drugs compared to control cells. A higher cell proliferation inhibition was achieved with MDA-MB-231 overexpressing MT4-MMP than non-expressing cells: 6.5-fold for epirubicin at $1 \mu\text{M}$, 13.5-fold for cyclophosphamide at 0.01 mM and 1.5-fold for cisplatin at $0.1 \mu\text{M}$. Surprisingly, MDA-MB-231 cells overexpressing MT4-MMP did not show any additional therapeutic benefit to paclitaxel. Cancer cell response to paclitaxel was similar in MDA-MB-231 overexpressing MT4-MMP or not (Figure 3E). Paclitaxel

inhibits microtubule depolymerisation and has been described to affect the secretion and the activity of MMP-2 and MMP-9 (Schnaeker *et al*, 2004). Accordingly, we found that MT4-MMP trafficking was disturbed upon paclitaxel treatment. Proportionally to paclitaxel doses, the amount of MT4-MMP present at the cell membrane was decreased and the enzymes accumulated in the cytoplasm. The loss of MT4-MMP at the membrane and its accumulation in the cytoplasm was confirmed by a confocal microscopy analysis of MT4-MMP and alpha 1 NaK-ATPase, referred as a plasma membrane marker (Oldridge *et al*, 2013; Figure 3F). A reduced availability of MT4-MMP at the cell surface induced by paclitaxel could reduce its interaction with EGFR abolishing, thereby its proliferative effect of MT4-MMP and cell sensitisation to paclitaxel. In reverse, the MT4-MMP at the membrane and the total MT4-MMP was not disturbed by epirubicin (Figure 3G). All together, we concluded that MT4-MMP expression sensitises TNBC cells *in vitro* to epirubicin, cyclophosphamide and cisplatin, but not to paclitaxel.

MT4-MMP expression sensitises TNBC cells to erlotinib *in vitro*. Although EGFR overexpression is observed in more than 50% of TNBC, its inhibition alone or in combination with chemotherapy has resulted in minimal clinical benefit. Therefore, it is crucial to identify a biomarker to select TNBC patients susceptible to respond to anti-EGFR treatment. Accordingly, we extended our work to erlotinib, a TKI. In the 3D-matrigel assay, the proliferation of MDA-MB-231 overexpressing MT4-MMP was more affected by erlotinib than that of control cells (Figure 3D). At $1 \mu\text{M}$ of erlotinib, the inhibition of cell proliferation was twice higher in the presence of MT4-MMP expression ($P < 0.01$). The MT4-MMP at the membrane and the total MT4-MMP was not disturbed by erlotinib or the combination of erlotinib and epirubicin (Figure 3G).

MT4-MMP expression sensitises TNBC xenografts to epirubicin and erlotinib. To validate the *in vitro* findings, we next tested the impact of MT4-MMP expression on *in vivo* response of tumours to a chemotherapeutic agent (epirubicin) and erlotinib, in monotherapies and in combination treatments. As previously described, MT4-MMP xenografts grew faster than control xenografts (Figure 4A). Mice bearing xenograft of MDA-MB-231 cells overexpressing or not MT4-MMP were treated with 4 mg kg^{-1} of epirubicin twice a week, 50 mg kg^{-1} of erlotinib once a day or with the combination of the two treatments. Upon epirubicin or erlotinib treatment, the growth of MT4-MMP tumour was stabilised (Figure 4B). In sharp contrast, the growth of control

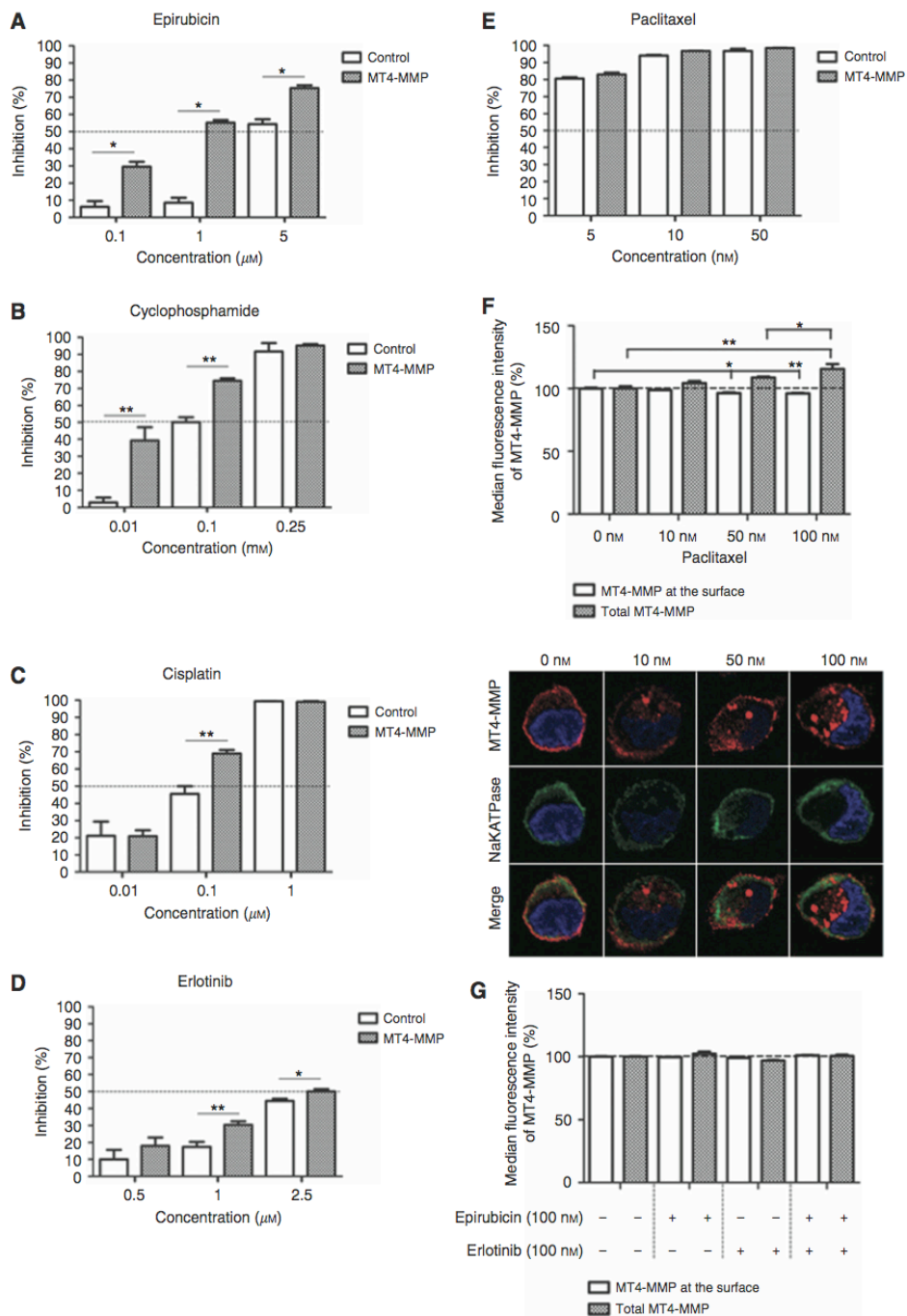


Figure 3. MT4-MMP overexpression sensitises MDA-MB-231 cells to alkylating and intercalating chemotherapies, and erlotinib but not to paclitaxel. MDA-MB-231 cells overexpressing MT4-MMP (MT4-MMP) or not (control) were incubated in a 3D matrix (Matrigel). Cell proliferation was assessed by DNA measurement after 7 days of culture in the presence of different concentrations of epirubicin (A), cyclophosphamide (B), cisplatin (C), erlotinib (D) and paclitaxel (E) as indicated. Results are expressed as percentage of inhibition. (F) Paclitaxel disturbs the intracellular trafficking of MT4-MMP. FACS analysis demonstrated that MT4-MMP was decreased at the cell surface and accumulated in the cytoplasm (total MT4-MMP). A representative illustration of MT4-MMP (in red) and NaK-ATPase (green) stainings observed by confocal microscopy is shown below the graph, for each paclitaxel concentration used. The blue staining corresponds to the nucleus stained with Dapi Fluoromount-G. (G) The intracellular trafficking of MT4-MMP was not disturbed by the treatment of epirubicin or erlotinib or the combination. FACS analysis demonstrated that the total MT4-MMP and the MT4-MMP at the membrane was not modified by these drugs. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

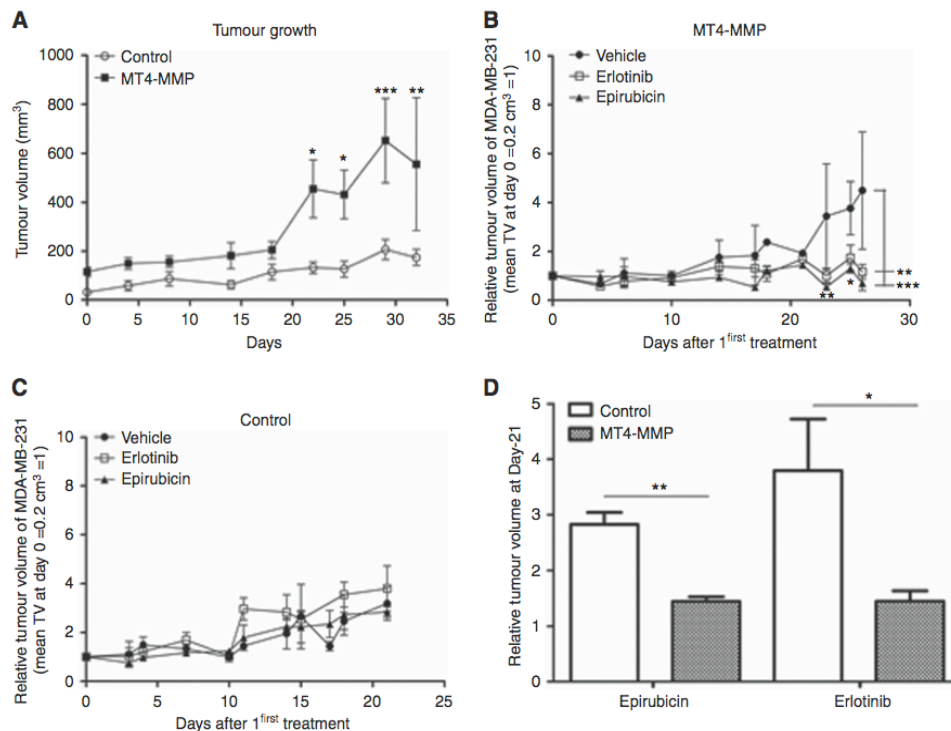


Figure 4. MT4-MMP overexpression sensitises MDA-MB-231 xenografts to epirubicin and erlotinib. (A) Tumour growth of MDA-MB-231 cells overexpressing or not MT4-MMP injected in RAG-1 immunodeficient mice. (B, C) Relative tumour growth of MDA-MB-231 xenografts overexpressing (B) or not (C) MT4-MMP treated with vehicle (n = 4), epirubicin (n = 4) or erlotinib (n = 4). Mice were intraperitoneally injected with epirubicin (4 mg kg⁻¹) twice a week or orally treated with erlotinib (50 mg kg⁻¹) once a day. NaCl 0.9% and captisol 6% were used as control for epirubicin and erlotinib, respectively. Tumour volume was measured twice a week. (D) Comparison of the relative tumour growth of control and MT4-MMP tumours treated with epirubicin or erlotinib at the end of the assay (day 21). Values are means ± s.e.m. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

xenografts was not affected by epirubicin or erlotinib and was similar to that of tumour treated with the vehicle (Figure 4C). In line with *in vitro* data, MT4-MMP tumours were thus more sensitive to epirubicin and erlotinib monotherapies (Figure 4D). Due to a high toxicity of epirubicin and erlotinib combination leading to mice death, we next used suboptimal doses of epirubicin and erlotinib. In those conditions, no effect of the monotherapy was observed on the tumour growth of MT4-MMP or control xenografts. Interestingly, the combination of epirubicin and erlotinib treatments led to a drastic inhibition of the growth of MT4-MMP xenografts, but did not affect the progression of control tumours (Figure 5A and B). The comparison of the tumour volume reached at the end of the assay (Figure 5C) revealed a clear improved response to drug combination by MT4-MMP expressing xenografts as compared to control tumours, as well as to monotherapies. Membrane type-4 matrix metalloproteinase expression endows to the tumour with a higher sensitivity to erlotinib combined with epirubicin.

DISCUSSION

We here established an unprecedented link between a strong MT4-MMP expression and an increased PFS in patients treated by chemotherapy. We identified MT4-MMP as a marker of tumour response to alkylating or intercalating agents used in monotherapy, or combined with erlotinib. This is supported by (1) clinical data using a retrospective cohort of TNBC patients

subjected or not to chemotherapy; (2) *in vitro* data in a 3D model demonstrating a higher sensitivity of TNBC cells to DNA-targeting drugs, but not to a cytoskeletal-targeting drug and finally (3) pre-clinical data in TNBC xenografts demonstrating the efficacy of a combination of suboptimal doses of DNA-interfering drug and erlotinib to completely block tumour growth.

Human MT4-MMP is a pro-tumoural protein expressed by cancer cells that promotes metastatic dissemination through its catalytic function (Host *et al*, 2012) and tumour cell proliferation by interfering with EGFR (Chabottaux *et al*, 2006; Paye *et al*, 2014). We found that MT4-MMP and EGFR were overexpressed in > 70% of TNBC samples. In line with the literature, EGFR expression was not associated with clinicopathological factors (tumour size, lymph node invasion, tumour stage or Ki67; Rao *et al*, 2013; Sood and Nigam, 2014), but was linked to a poor PFS (Viale *et al*, 2009). Although MT4-MMP was not associated to clinicopathological features, its expression and co-localisation with EGFR in 79% of TNBC patients might affect patient outcome and response to chemotherapy. Indeed, patients developing tumours with more than 50% of MT4-MMP-positive cells showed a better PFS when treated with chemotherapy. In contrast, MT4-MMP expression was not associated to PFS in untreated patients. Given the reported mitogenic effect of this protease (Chabottaux *et al*, 2006; Paye *et al*, 2014), MT4-MMP overexpression in TNBC cells could make them more sensitive to DNA-targeting agents. This concept is supported by our data showing increased TNBC cell responsiveness to alkylating (cyclophosphamide, cisplatin) or intercalating (epirubicin) agents, but not to paclitaxel. The lack

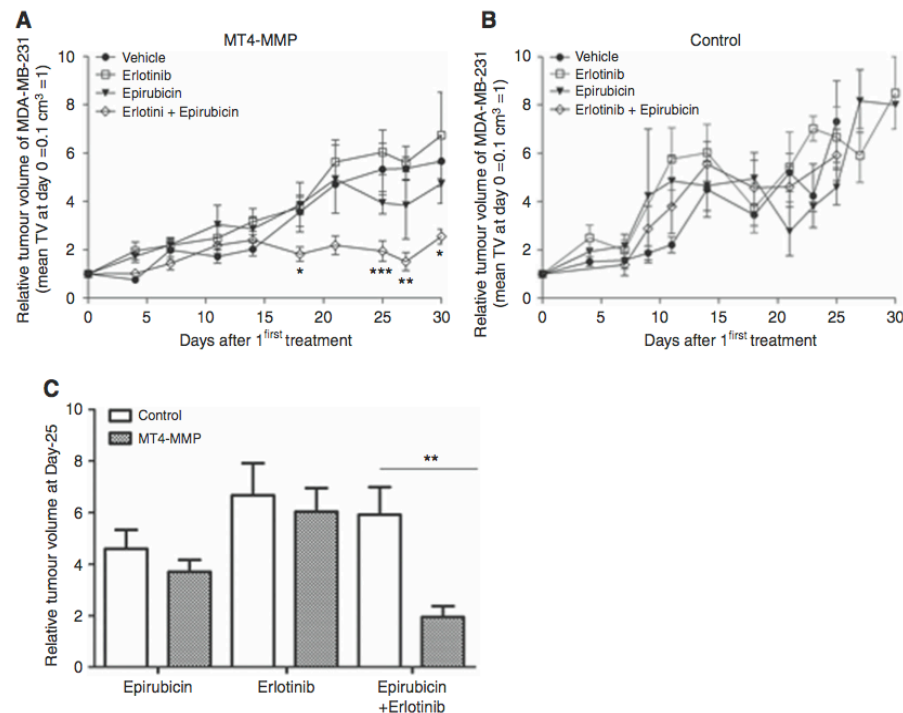


Figure 5. MT4-MMP overexpression sensitises MDA-MB-231 xenografts to a combination of epirubicin and erlotinib. (A, B) Relative tumour growth of MDA-MB-231 xenografts overexpressing or not MT4-MMP treated with vehicle ($n=6$), epirubicin ($n=6$), erlotinib ($n=6$) or a combination of the two drugs ($n=6$). Mice were intraperitoneally injected with epirubicin (2 mg kg^{-1}) twice a week and/or were orally treated with erlotinib (50 mg kg^{-1}) three times a week. (C) Comparison of relative tumour growth of control and MT4-MMP tumours treated with epirubicin and/or erlotinib at day 25. Values are means \pm s.e.m. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

of response to paclitaxel could be ascribed to the impact of microtubule disruption on MT4-MMP availability at the cell surface. Indeed, MT4-MMP internalisation dynamics was recently reported showing that the enzyme stays 45 min at the cell surface before being internalised and either auto-degraded or recycled to the cell surface (Truong *et al*, 2016). It is thus not surprising that compounds that can affect its trafficking and internalisation dynamics could also affect its interaction with EGFR, and hamper its impact on cell proliferation.

Despite a good initial response of TNBC to chemotherapy, metastatic relapse occurs at higher rates compared to other breast cancer subtypes (Isakoff, 2010; O'Reilly *et al*, 2015). Epidermal growth factor receptor overexpression by most TNBC offers an opportunity that could be explored for an effective targeted therapy. However, up to now, clinical trials using anti-EGFR antibodies in TNBC patients did not show any benefit in terms of PFS. These disappointing results with cetuximab could be explained, at least partly, by the contribution of compensatory pathways of TK signalling, and/or of unknown factors interfering with the EGFR pathway. Here we provide *in vivo* evidence of effective response of MT4-MMP and EGFR expressing tumours to erlotinib. Membrane type-4 matrix metalloproteinase expression conferred to xenografts, a better response to epirubicin and erlotinib alone (monotherapy) and more importantly, to the combination of these drugs at suboptimal doses. This is in line with our previous *in vitro* data showing that erlotinib blocked drastically the proliferation of MT4-MMP expressing cells in 3D cultures. In contrast, only a partial inhibition of cell proliferation was achieved with cetuximab. Thus, MT4-MMP endows tumour cells with a higher sensitivity to TKIs that act intracellularly than to antibodies exerting an extracellular effect. This could explain why cetuximab

treatment was inefficient to treat TNBC patients despite the presence of MT4-MMP. These innovative findings hold promise for the use of TKI in selected TNBC overexpressing MT4-MMP.

Altogether, these findings provide the first clinical and molecular evidence for MT4-MMP role in TNBC. These innovative findings hold promise for the use of TKI (erlotinib) combined with DNA-interfering chemotherapeutic agents in selected TNBC overexpressing MT4-MMP and EGFR. The MT4-MMP/EGFR axis emerges as a new valuable pathway that could have a striking impact on TNBC cancer patients expressing these two molecules.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Plan Cancer, the Fonds de la Recherche Scientifique FRS-FNRS, the Fondation Contre le Cancer, the Interuniversity Attraction Poles Programme – Belgian Science Policy, the Centre Anticancereux (CAC), the Fonds Leon Fredericq and Fonds speciaux of the University of Liege, Belgium. We thank the platforms of the Groupe Interdisciplinaire de Genoproteomique Appliquee (GIGA) (Imaging GIGA platform, Immunohistology GIGA Platform and the Biotheque-University of Liege). We are grateful to Marie Dehuy and Isabelle Dasoul for their technical support. Cassandre Yip and Mehdi Lienard are recipients of FNRS-Télevie grants. Pierre Foidart and Alice Truong are supported by FNRS.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Baselga J, Gomez P, Greil R, Braga S, Climent MA, Wardley AM, Kaufman B, Stemmer SM, Pego A, Chan A, Goeminne JC, Graas MP, Kennedy MJ, Ciruelos Gil EM, Schneeweiss A, Zobel A, Groos J, Melezinkova H, Awada A (2013) Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 31: 2586–2592.
- Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V (2007) Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer* 109: 1721–1728.
- Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, Birnbaum D (2008) How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 123: 236–240.
- Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L (2010) Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol* 7: 683–692.
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Gerads J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295: 2492–2502.
- Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, Mayer EL, Esteva FJ, Ma CX, Liu MC, Storniolo AM, Rimawi MF, Forero-Torres A, Wolff AC, Hobday TJ, Ivanova A, Chiu WK, Ferraro M, Burrows E, Bernard PS, Hoadley KA, Perou CM, Winer EP (2012) TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 30: 2615–2623.
- Chabotiaux V, Ricaud S, Host L, Blacher S, Paye A, Thiry M, Garofalakis A, Pestourie C, Gombert K, Bruyere F, Lewandowsky D, Tavitian B, Foidart JM, Duconge F, Noel A (2009) Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) induces lung metastasis by alteration of primary breast tumour vascular architecture. *J Cell Mol Med* 13: 4002–4013.
- Chabotiaux V, Sounni NE, Pennington CJ, English WR, Den Brule VAN, Blacher F, Gilles S, Munaut C, Maquoi C, Lopez-Otin E, Murphy C, Edwards G, Foidart DR, Noel A JM (2006) Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res* 66: 5165–5172.
- Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G (2016) Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 8: 93–107.
- Finn RS, Bengala C, Ibrahim N, Roche H, Sparano J, Strauss LC, Fairchild J, Sy O, Goldstein LJ (2011) Dasatinib as a single agent in triple-negative breast cancer: results of an open-label phase 2 study. *Clin Cancer Res* 17: 6905–6913.
- Gazinska P, Grigoriadis A, Brown JP, Millis RR, Mera A, Gillett CE, Holmberg LH, Tutt AN, Pinder SE (2013) Comparison of basal-like triple-negative breast cancer defined by morphology, immunohistochemistry and transcriptional profiles. *Mod Pathol* 26: 955–966.
- Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM (2007) Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 8: R76.
- Host L, Paye A, Detry B, Blacher S, Munaut C, Foidart JM, Seiki M, Sounni NE, Noel A (2012) The proteolytic activity of MT4-MMP is required for its pro-angiogenic and pro-metastatic promoting effects. *Int J Cancer* 131: 1537–1548.
- Huang CH, Yang WH, Chang SY, Tai SK, Tzeng CH, Kao JY, Wu KJ, Yang MH (2009) Regulation of membrane-type 4 matrix metalloproteinase by SLUG contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Neoplasia* 11: 1371–1382.
- Huang L, Liu Z, Chen S, Liu Y, Shao Z (2013) A prognostic model for triple-negative breast cancer patients based on node status, cathepsin-D and Ki-67 index. *PLoS One* 8: e83081.
- Isakoff SJ (2010) Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents. *Cancer J* 16: 53–61.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141: 52–67.
- Layman RM, Ruppert AS, Lynn M, Mrozek E, Ramaswamy B, Lustberg MB, Wesolowski R, Ottman S, Carothers S, Bingman A, Reinbolt R, Kraut EH, Shapiro CL (2013) Severe and prolonged lymphopenia observed in patients treated with bendamustine and erlotinib for metastatic triple negative breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 1183–1190.
- Maillard C, Jost M, Romer MU, Brunner N, Houard X, Lejeune A, Munaut C, Bajou K, Melen L, Dano K, Carmeliet P, Fusenig NE, Foidart JM, Noel A (2005) Host plasminogen activator inhibitor-1 promotes human skin carcinoma progression in a stage-dependent manner. *Neoplasia* 7: 57–66.
- Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, Puszta L, Pathiraja K, Aktan G, Cheng JD, Karantza V, Buisseret L (2016) Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer: phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol* 34: 2460–2467.
- Noel A, Gutierrez-Fernandez A, Sounni NE, Behrendt N, Maquoi E, Lund IK, Cal S, Hoyer-Hansen G, Lopez-Otin C (2012) New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Front Pharmacol* 3: 140.
- O'Reilly EA, Gubbins L, Sharma S, Tully R, Guang MH, Weiner-Gorzel K, Mccaffrey J, Harrison M, Furlong F, Kell M, Mccann A (2015) The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clin* 3: 257–275.
- Oldridge EE, Walker HF, Stower MJ, Simms MS, Mann VM, Collins AT, Pellacani D, Maitland NJ (2013) Retinoic acid represses invasion and stem cell phenotype by induction of the metastasis suppressors RARRES1 and LXN. *Oncogenesis* 2: e45.
- Paye A, Truong A, Yip C, Cimino J, Blacher S, Munaut C, Catalo D, Foidart JM, Maquoi E, Collignon J, Delvenne P, Jerusalem G, Noel A, Sounni NE (2014) EGFR activation and signaling in cancer cells are enhanced by the membrane-bound metalloprotease MT4-MMP. *Cancer Res* 74: 6758–6770.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747–752.
- Rao C, Shetty J, Prasad KH (2013) Immunohistochemical profile and morphology in triple-negative breast cancer. *J Clin Diagn Res* 7: 1361–1365.
- Schnaeker EM, Ossig R, Ludwig T, Dreier R, Oberleithner H, Wilhelm M, Schneider SW (2004) Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer Res* 64: 8924–8931.
- Sood N, Nigam JS (2014) Correlation of CK5 and EGFR with clinicopathological profile of triple-negative breast cancer. *Patholog Res Int* 2014: 141864.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10869–10874.
- Teng YH, Tan WJ, Thihe AA, Cheok PY, Tse GM, Wong NS, Yip GW, Bay BH, Tan PH (2011) Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in triple negative breast cancer: possible implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res* 13: R35.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65: 87–108.
- Truong A, Yip C, Paye A, Blacher S, Munaut C, Deroanne C, Noel A, Sounni NE (2016) Dynamics of internalization and recycling of the prometastatic membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) in breast cancer cells. *Febs J* 283: 704–722.
- Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, Bottiglieri L, Montagna E, Luini A, Veronesi P, Intra M, Torrisi R, Cardillo A, Campagnoli E, Goldhirsch A, Colleoni M (2009) Invasive ductal carcinoma of the breast with the 'triple-negative' phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity. *Breast Cancer Res Treat* 116: 317–328.
- Wang Y, Yu SJ, Li YX, Luo HS (2015) Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-17 and -25 in gastric cancer. *Oncol Lett* 9: 671–676.
- Yadav BS, Sharma SC, Chanana P, Jhamb S (2014) Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. *World J Clin Oncol* 5: 125–133.

This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 Unported License.

2. Deuxième partie

Publication n°2 :

Expression of MT4-MMP, EGFR and Rb in Triple-Negative Breast Cancer Strongly Sensitizes Tumors to Erlotinib and Palbociclib Combination Therapy.

*Pierre Foidart, Cassandre Yip, Jean Radermacher, Silvia Blacher, Mehdi Lienard, Laetitia Montero-Ruiz, Erik Maquoi, Elodie Montaudon, Sophie Château-Joubert, Joëlle Collignon, Michel Coibion, Véronique Jossa, Elisabetta Marangoni, Agnès Noël, Nor Eddine Sounni and Guy Jerusalem**

Clin Cancer Res. 2019 Mar. * Co-senior authors

2.1. Validation de l'intérêt clinique de l'axe MT4-MMP/EGFR/Rb : taux de co-expression des 3 biomarqueurs dans les TNBC

Sur une banque de 72 échantillons de TNBC obtenus lors de la chirurgie chez 81 patientes n'ayant pas subi de chimiothérapie néoadjuvante, nous avons réalisé une analyse rétrospective par IHC de l'expression de ces 3 biomarqueurs. Nous pouvons en retenir :

- le maintien de Rb dans 68% des cas, ce qui justifie d'investiguer la place des inhibiteurs CDK4/6 pour le traitement des TNBC (publication 2 : fig 1B).
- la co-expression de la MT4-MMP et de l'EGFR dans 71% des cas (publication 2 : fig 1C), taux assez similaire à celui obtenu précédemment dans la première partie du travail (Yip et al., 2017).
- la co-expression des 3 biomarqueurs dans 49% (35/72) des cas (publication 2 : fig 1E) soulignant l'implication de l'axe MT4-MMP/EGFR/Rb dans près de la moitié des cas de TNBC qui pourraient alors bénéficier d'une thérapie combinant anti-EGFR et inhibiteur du cycle cellulaire.
- l'absence de corrélation de la MT4-MMP et de l'EGFR avec les caractéristiques clinicopathologiques des patientes, confirmant l'observation de la première partie du travail (Yip et al., 2017).
- le maintien significativement plus important de Rb pour les TNBC de stade I (publication 2 : fig 1F) et la relation inversement proportionnelle entre le maintien de Rb et le pourcentage de Ki67 (publication 2 : fig 1G).

2.2. Démonstration in vitro de la sensibilité des cellules co-exprimant les 3 biomarqueurs à l'Erlotinib et au Palbociclib ainsi qu'à leur combinaison

Nous avons dans un premier temps établi un modèle de prolifération cellulaire en 2D en utilisant 3 lignées cellulaires de TNBC différentes transfectées ou non pour la MT4-MMP : 2 lignées expriment de manière endogène l'EGFR et maintiennent Rb (lignées MDA-MB-231 et HS-578T) tandis que la troisième lignée exprime de manière endogène l'EGFR mais se caractérise également par la perte de Rb : MDA-MB-468.

Dans ce modèle 2D, la réponse à l'Erlotinib est plus soutenue en cas d'expression de la MT4-MMP (publication 2 : fig 2B et 2D ainsi que supplemental fig 1B et 1E). La co-expression de l'EGFR et de la MT4-MMP entraîne également une sensibilité plus importante

Résultats

au Palbociclib à condition, évidemment, que les cellules maintiennent l'expression de Rb. Ainsi, les lignées MDA-MB-231 et HS-578T sont plus sensibles au Palbociclib en cas d'expression de la MT4-MMP alors que cela n'est pas observé avec la lignée MDA-MB-468 (publication 2 : fig 2C et 2E ainsi que supplemental fig 1C et 1F). La MT4-MMP augmente la phosphorylation de l'EGFR et de Rb. Néanmoins, cela peut être contrecarré par un traitement par Erlotinib et/ou Palbociclib (publication 2 : fig 3C et 3D).

Dans un modèle de prolifération en 3D, nous avons montré que l'inhibition de la croissance des cellules co-exprimant la MT4-MMP, l'EGFR et Rb est plus marquée avec la combinaison de l'Erlotinib et du Palbociclib à doses suboptimales qu'avec ces mêmes inhibiteurs en monothérapie à plus forte dose (publication 2 : fig 3E). L'emploi de deux siRNA différents dirigés contre la MT4-MMP permet de diminuer la sensibilité des cellules MDA-MB-231 transfectées pour la MT4-MMP à la fois à l'Erlotinib et au Palbociclib (publication 2 : fig 3B).

2.3. Confirmation in vivo du caractère de biomarqueur prédictif de réponse au traitement par Erlotinib et/ou Palbociclib de la co-expression de la MT4-MMP, de l'EGFR et de Rb

Le recours à des xénogreffes transplantées avec des cellules MDA-MB-231 (EGFR+/Rb+), transfectées ou non pour la MT4-MMP, nous a permis de confirmer que la co-expression des 3 biomarqueurs sensibilisaient les tumeurs à l'Erlotinib et au Palbociclib et que la combinaison des deux inhibiteurs permettait d'inhiber encore plus fortement la prolifération tumorale. En revanche, les tumeurs n'exprimant pas la MT4-MMP n'étaient pas sensibles à tous ces traitements (publication 2 : fig 4A-C). Nous avons aussi démontré après sacrifice des xénogreffes, par des analyses par IHC et Western blot, que le Palbociclib et surtout la combinaison Erlotinib-Palbociclib permettent de réduire fortement la densité du Ki67 et de pRb dans les tumeurs exprimant la MT4-MMP (publication 2 : fig 4D-G).

Par l'emploi d'un modèle plus représentatif de l'architecture tumorale, le modèle des PDX, nous avons confirmé les données obtenues sur Xénogreffes. Remarquons tout d'abord que sur la banque de 37 PDX différentes obtenues à partir de patientes atteintes de TNBC, nous avons un profil d'expression des 3 biomarqueurs assez similaire à celui observé sur la biobanque humaine. En effet, Rb y est maintenu dans 59% (22/37) des cas et la co-expression des 3 biomarqueurs est obtenue dans 46% (17/37) des cas (publication 2 : fig 5B). Les légères différences entre ces 2 banques de tissus s'expliquent par la procédure de réalisation d'une PDX : en effet, la prise de greffe tend à sélectionner les tumeurs les plus agressives et présentant donc des taux de KI67 plus élevés et ayant plus souvent perdu Rb. Nous avons ainsi objectivé que les tumeurs PDX qui ont perdu Rb sont insensibles à l'Erlotinib et/ou au Palbociclib (publication 2 : fig 6A-B). Inversement, les tumeurs co-exprimant les 3 biomarqueurs sont fortement sensibles à la combinaison Erlotinib-Palbociclib y compris en cas de résistance intrinsèque à un des inhibiteurs (publication 2 : fig 6D-E). Après sacrifice, nous avons montré qu'une diminution de densité de Ki67 avec les inhibiteurs est uniquement retrouvée pour les tumeurs ayant conservé l'expression de Rb (publication 2 : fig 6G-K). Enfin, nous avons également constaté une densité plus élevée de la caspase 3 (marqueur d'apoptose) après traitement, uniquement pour les tumeurs positives pour Rb (publication 2 : supplemental fig 5).

Expression of MT4-MMP, EGFR, and RB in Triple-Negative Breast Cancer Strongly Sensitizes Tumors to Erlotinib and Palbociclib Combination Therapy



Pierre Foidart^{1,2}, Cassandre Yip¹, Jean Radermacher³, Silvia Blacher¹, Mehdi Lienard¹, Laetitia Montero-Ruiz¹, Erik Maquoi¹, Elodie Montaudon⁴, Sophie Château-Joubert⁵, Joëlle Collignon², Michel Coibion⁶, Véronique Jossa⁶, Elisabetta Marangoni⁴, Agnès Noël¹, Nor Eddine Sounni¹, and Guy Jerusalem²

Abstract

Purpose: Here, we investigated the clinical relevance of an unprecedented combination of three biomarkers in triple-negative breast cancer (TNBC), both in human samples and in patient-derived xenografts of TNBC (PDX-TNBC): EGFR, its recently identified partner (MT4-MMP), and retinoblastoma protein (RB).

Experimental Design: IHC analyses were conducted on human and PDX-TNBC samples to evaluate the production of the three biomarkers. The sensitivity of cancer cells expressing or not MT4-MMP to anti-EGFR (erlotinib) or anti-CDK4/6 inhibitor (palbociclib) was evaluated *in vitro* in 2D and 3D proliferation assays and *in vivo* using xenografts and PDX-TNBC displaying different RB, MT4-MMP, and EGFR status after single (erlotinib or palbociclib) or combined (erlotinib + palbociclib) treatments.

Results: EGFR and MT4-MMP were coexpressed in >70% of TNBC samples and PDX-TNBC, among which

approximately 60% maintained RB expression. Notably, approximately 50% of all TNBC and PDX-TNBC expressed the three biomarkers. Single erlotinib and palbociclib treatments drastically reduced the *in vitro* proliferation of cells expressing EGFR and MT4-MMP when compared with control cells. Both TNBC xenografts and PDX expressing MT4-MMP, EGFR, and RB, but not PDX-TNBC with RB loss, were sensitive to erlotinib and palbociclib with an additive effect of combination therapy. Moreover, this combination was efficient in another PDX-TNBC expressing the three biomarkers and resistant to erlotinib alone.

Conclusions: We defined a new association of three biomarkers (MT4-MMP/EGFR/RB) expressed together in 50% of TNBC and demonstrated its usefulness to predict the TNBC response to anti-EGFR and anti-CDK4/6 drugs used in single or combined therapy.

Introduction

Triple-negative breast cancer (TNBC) lacks estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) expression and amplification of human EGF receptor 2 (HER2/neu). Although TNBC accounts for less than 20% of invasive breast carcinomas, it

represents the most aggressive subtype. Compared with other breast cancer subtypes, TNBC is associated with younger age, worse outcome, and a higher risk of relapse within 5 years. Gene expression profiling studies revealed six distinct molecular subgroups of TNBC including two basal-like (BL1 and BL2) subtypes, a luminal androgen receptor (LAR) subtype, a mesenchymal stem-like subtype, a mesenchymal subtype, and an immunomodulatory subtype (1, 2). The presence of immune-related proteins PD-L1 in 20% of TNBC holds promise for improving the patient outcome with immunotherapeutic approaches (3). As there are no validated efficient targeted therapies against TNBC, current treatment relies only on chemotherapy. Therefore, there is an urgent need for biomarkers and new actionable targets for the design of novel combination therapies. Given the expression of EGFR in 50%–75% of TNBC (4), clinical trials have been conducted with EGFR inhibitors (5, 6). Unfortunately, few patients responded to anti-EGFR antibodies (cetuximab) or tyrosine kinase inhibitors (TKI; erlotinib), highlighting a need for biomarkers for patient stratification and for testing new therapeutic combination regimens (7, 8).

Cell-cycle transition from G₁-S phase is operated by interactions between cyclin-dependent kinases 4 and 6 (CDK4/6), cyclin D1, and retinoblastoma protein (RB). These cell-cycle

¹Laboratory of Tumor and Development Biology, GIGA-Cancer, Liège University, Liège, Belgium. ²Medical Oncology, University Hospital of Liège, CHU, Liège University, Liège, Belgium. ³Institut de Pathologie et Génétique, Charleroi, Belgium. ⁴Translational Research Department, Institute Curie, PSL Research University, Paris, France. ⁵BioPôle Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maison Alfort, France. ⁶Clinique Saint Vincent, Rocourt, Liège, Belgium.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

N.E. Sounni and G. Jerusalem contributed equally to this article.

Corresponding Authors: Nor Eddine Sounni, University of Liège, Tour de Pathologie (B23), Sart-Tilman, B-4000, Liège 4000, Belgium. Phone: 324-366-2570; Fax: 324-366-2936; E-mail: nesounni@uliege.be; and Guy Jerusalem, g.jerusalem@chuliege.be

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1880

©2018 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

While triple-negative breast cancers (TNBC) mostly express EGFR, anti-EGFR-targeted therapies are ineffective in unselected patients who show limited, transient, or no response. Furthermore, chemotherapy has limited efficacy. By using xenografts and patient-derived xenografts of TNBC (PDX-TNBC), we demonstrated the efficacy of a combination of anti-EGFR (erlotinib) and anti-CDK4/6 (palbociclib) in MT4-MMP⁺/EGFR⁺/RB⁺ tumors, which represent 50% of patients with TNBC. Our results highlight an interest in using MT4-MMP, RB, and EGFR as predictive biomarkers of tumor response to single or combined therapies. This innovative finding holds promise in improving the identification of patients with TNBC more likely to respond to anti-EGFR and anti-CDK4/6 combination that is not yet used in the clinic for TNBC treatment.

molecular regulators are frequently dysregulated in HER2-negative and ER-positive breast cancers. The combination of endocrine therapy with anti-CDK4/6 drugs (palbociclib, ribociclib, or abemaciclib) is currently used for metastatic ER⁺ with HER2-negative breast cancer. This new therapeutic guideline was established from the phase III clinical trials (PALOMA, MONALEESA, and MONARCH program) showing increased progression-free survival upon combined treatment when compared with endocrine therapy alone. While TNBCs are enriched in cell-cycle proteins such as cyclin E1, intrinsic resistance to CDK4/6 inhibitor monotherapy has been reported (9, 10). The mechanisms of sensitivity or resistance to CDK4/6 inhibition are insufficiently described and are mainly attributed to the loss of RB in cancers. However, the Cancer Genome Atlas study reported that RB is lost or mutated in only 20% of TNBC, indicating that CDK4/6 inhibitors might have beneficial therapeutic and sustained long-term effects (11).

We have previously identified membrane-type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) as a cell surface partner of EGFR in TNBC (12). MT4-MMP enhanced receptor activation upon EGF and TGF binding and stimulated breast cancer cell proliferation in 3D culture. MT4-MMP expression in TNBC xenografts led to increased proliferation, angiogenesis, and lung metastases (13, 14). Interestingly, this result was associated with increased cyclins and CDK activities and RB phosphorylation (12). Through IHC analysis, we previously reported that MT4-MMP is coexpressed with EGFR in approximately 80% of human TNBC samples (15). Here, we investigate the relevance of targeting EGFR and CDK4/6 in TNBCs expressing MT4-MMP, EGFR, and RB. Through a panel of *in vitro* assays, xenografts, and PDX-TNBC models, we provide evidence that the MT4-MMP/EGFR/RB axis is an important driver of TNBC malignancy and is worth considering to predict the response of TNBC to EGFR and CDK4/6 inhibitor combination therapy.

Materials and Methods

Cohort of patients with TNBC

The retrospective cohort of TNBC samples was provided by the Biobank of the University Hospital of Liège (Liège University, Belgium). For human sample collection for research, written informed consent forms were obtained from the patients and the study was conducted in accordance with the recognized ethical

guideline of Declaration of Helsinki and approved by the institutional Ethics Committee of the University Hospital of Liège (Liège, Belgium; file#B707201111974 and file#2015/139). The cohort consists of women aged from 27 to 89 years and diagnosed between February 1999 and September 2013 with a median follow up of 53 months (4.4 years; Supplementary Table S1). Only samples from patients who did not receive neoadjuvant therapy ($n = 72$) were used in this study. All patients in this cohort were metastasis free (M0). The clinicopathologic features retained in this study are those used in daily basis clinical practice including TNM staging, Ki67, grade, and here we added cytokeratin 5/6 and three biomarkers MT4-MMP/EGFR/RB. For TNM prognostic stage determination, we referred to the 8th edition of the AJCC-UICC (the American Joint Committee on Cancer and Union Internationale Contre le Cancer) that also includes grade.

Cell culture and plasmids

Human breast cancer (MDA-MB-231, HS-578T, and MDA-MB-468) cells and COS-1 cells were purchased from ATCC. Cell line authentication for interspecies contamination was performed by Leibniz-Institute DSMZ. Cell lines were tested by MycoAlert Kit (Lonza) to ensure that they were *Mycoplasma*-free. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, L-glutamine (2 mmol/L), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 µg/mL) at 37°C, in a 5% CO₂ humid atmosphere. All culture reagents were purchased from Invitrogen. Cell transfection and plasmid construction were described previously (12). Transient transfection of HS-578T and COS-1 cells was performed with X-treamGENE according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). MDA-MB-231 HS-578T and MDA-MB-468 cells transfected with MT4-MMP cDNA are referred to as MT4-MMP cells, whereas cells transfected with control vector are labeled CTRL cells.

In vivo tumorigenicity

For subcutaneous (s.c.) injection of breast cancer cells, subconfluent MDA-MB-231 cells were collected in serum-free medium (5×10^6 cells/mL) and mixed with an equal volume of cold Matrigel according to a previous report (16). A cell suspension (10^6 cells/400 µL) was injected subcutaneously into RAG-1-immunodeficient mice in both flanks ($n = 6$). All assays were repeated at least three times. PDXs from Institute Curie were established from primary tumors from patients with TNBC (PDX-TNBC) as described previously (17–19), in accordance with institutional guidelines and the rules of the French Ethics Committee (project authorization no. 02163.02) and the Belgian Ethics Committee (project authorization no. 14-1582). For PDX-TNBC transplantation, tumor fragments of 1–2 mm were subcutaneously engrafted into nude mice and tumor volumes were estimated every 3 to 4 days according to the formula $V: \text{length} \times (\text{width})^2 \times 0.4$. All animal procedures were performed according to the Federation of European Laboratory Animal Sciences Associations (FELASA) within the accredited GIGA animal facility (University of Liège, Liège, Belgium).

In vivo drug administration

When tumors reached a volume of 100 mm³, the mice were separated into 4 groups for treatment with vehicle, erlotinib (50 mg/kg), palbociclib (75 mg/kg), or a combination (erlotinib + palbociclib). Treatment was administered by gavage 5 days a week for 4 weeks. The mice were weighed every 3 days and monitored for tumor growth until the tumor reached the

maximum authorized ethical volume of 1,000 mm³. Then, the mice were sacrificed for tumor and organ collections.

Cell proliferation assays

Cell proliferation was assessed in 2D using a WST kit following the manufacturer's instructions. The cells were incubated in 96-well plates in DMEM with 10% FBS and treated 6 hours later with 0.2% DMSO, erlotinib, or palbociclib at different concentrations and time points. For the 3D culture, cells were suspended in cold Matrigel as described previously (12). After 24 hours, the cells were treated every day for 6–7 days.

siRNA transfection

MDA-MB-231 cells producing MT4-MMP were transfected with siRNA targeting MT4-MMP siRNA-1 (5'-CCCACUUUGACGAU-GACGAUU-3'; Eurogentec), siRNA-2 (5'-UGACAGGA-CUUAUUUCUUU-3'; Dharmacon), or scramble (5'-GUCUCU-GUAGGAGUCAUCCUU-3'; Eurogentec). The annealed siRNA (100 μmol/L) was double transfected into cancer cells using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's protocols. Briefly, siRNA was mixed with RNAiMAX Lipofectamine in DMEM-free serum medium. The mixture was added dropwise to cells (60%–80% confluent). siRNA transfection was repeated after 24 hours. The transfected cells were cultured for 48 hours before being used for the experiments. Successful knock-down was confirmed by Western blot analysis.

Cell proliferation in 3D Matrigel

Cells were suspended in medium (250 μL) with cold Matrigel (250 μL) and seeded on top of a layer of Matrigel mixed with medium as described previously (12). Cells were incubated in 1% FBS-containing media and stimulated with EGF 20 ng/mL every day. After 24 hours, erlotinib and palbociclib (LC Laboratories) were added at the indicated concentrations and untreated cells were incubated with 0.2% DMSO. After 7 days, the cells were recovered from 3D cultures upon treatment with 500 μL of dispase (BD Biosciences) for 2 hours at 37°C. After two washes in PBS, the cell pellet was diluted in PBS (1 mL) and sonicated. Fluorimetric DNA titration was performed by measuring fluorescence in a SpectraMax i3 (Molecular Devices) at 356 nm excitation and 460 nm emission.

Immunoblot analysis

Total cell lysates from cells and tumor fragments were prepared using lysis buffer (Cell Signaling Technology) containing protease inhibitors and phosphatase inhibitors (Roche), and the protein concentration was measured by using the DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories). Total protein extracts from cells (20 μg) and tumors (40 μg) were separated on SDS-PAGE under reducing conditions, and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (NEN). The membranes were saturated with casein (1%, wt/vol) in PBS-Tween-20 (0.1%, vol/vol) and incubated with primary antibodies targeting the following proteins: MT4-MMP (Sigma-Aldrich), p-RB [Ser807-811], total RB (4H1), total EGFR, and p-EGFR [Tyr1068] (D7A5; Cell Signaling Technology). After washes, the membranes were incubated with a secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:2,000, DakoCytomation) or sheep anti-mouse antibody (1:1,000, DakoCytomation). Immunocomplexes were visualized by chemiluminescence reaction on a luminescent image analyzer (LAS-4000, Fujifilm). For loading control, membranes were

stripped and reincubated with anti-β-actin or GAPDH antibodies (Sigma-Aldrich).

Coimmunoprecipitation assay

COS-1 cells expressing EGFR1, HER2, and HER3 were transfected with full-length MT4-MMP cDNA (MT4-MMP) or inactive form (MT4-E249A) containing a FLAG tag inserted in the hinge region. After 24 hours, cells were lysed in lysis buffer (Cell Signaling Technology) containing Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete, Roche) and Phosphatase Inhibitor Cocktail (PhosSTOP, Roche). The enzyme was immunoprecipitated from lysates (1 mg) using a mouse monoclonal anti-Flag antibody (2 μg) (cloneM2, Sigma) and 50 μL of 50% slurry protein G coupled to Dynabeads (Invitrogen). The precipitate was subjected to Western blotting using a rabbit monoclonal anti-EGFR antibody (Cell Signaling Technology, D38B1), anti-HER2 (Cell Signaling Technology, 29D8), anti-HER3 (Cell Signaling Technology, D22C5), or anti-HER4 (Cell Signaling Technology, 111B2). The antibodies are revealed with an HRP-conjugated secondary antibody.

IHC

IHC for MT4-MMP and EGFR on tumor sections was performed as described previously in ref. 15 by using a rabbit anti-human MT4-MMP antibody (1/500; AB39028; Abcam) and a rabbit monoclonal anti-EGFR antibody (5B7; 790-4347, Ventana Medical Systems, Roche). Tissue microarrays (TMA) slides containing at least 3 tissue cores of each tumor were used for IHC detection of MT4-MMP, EGFR, and RB.

For HER2, HER3, HER4, and androgen receptor (AR) staining, antigen retrieval was performed with EDTA (Dako, S2367) for HER2 and HER3 or with citrate buffer (Dako, S2031) for HER4. Nonspecific binding was prevented by incubation in blocking solution 1/5 (Cell Signaling Technology, 1519L). Slides were incubated for 1 hour at 1/100 with rabbit anti-human HER2 (Ventana, 790-4493), anti-HER3 (Cell Signaling Technology, 12708), anti-HER4 antibody (Abcam, ab230781), or anti-androgen receptor (Ventana, SPA07). For RB and phosphoRB stainings, antigen retrieval was performed by incubating tumor sections with buffer target (Dako, S1699) at 126°C and 1.4 bar in autoclave for 11 minutes. Endogenous peroxidases were subsequently blocked by 3% H₂O₂/H₂O for 20 minutes, and nonspecific binding was prevented by incubation in Dako Protein Block, Serum-Free (Dako, X0909). Slides were first incubated 60 minutes at room temperature with a rabbit polyclonal targeting human-phosphoRB antibody or RB (1/400; Cell Signaling Technology, # 8516) or a mouse anti-human RB (1/100) diluted in Dako diluent (Dako, S2022). Finally, slides were incubated with HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Envision System Labeled Polymer-HRP, Dako, K4003 and K4001) for 30 minutes at room temperature. For staining, 3-3' diaminobenzidine hydrochloride (Dako, K3468) was incubated for 3 minutes. Slides were finally counterstained with hematoxylin and mounted with Eukitt medium for microscope observation. Omission of the first antibody served as negative control.

Proliferating cells in xenografts and PDX were visualized by IHC staining for the human Ki-67. Antigen retrieval of paraffin sections was performed for 11 minutes at 126°C in Target Retrieval Solution by incubation (Dako, S1699). Slides were then subjected to endogenous peroxidase blockade with 3% H₂O₂/H₂O for

Foidart et al.

20 minutes. Nonspecific binding was prevented by slide incubation in PBS/BSA 10% (Fraction V, Acros Organics) for 1 hour. After 1-hour incubation with anti-Ki-67 antibody (1:100), slides were incubated for 30 minutes with the power vision poly-HRP anti-Mouse/Rabbit/Rat IgG kit (DVPB+110HRP, Immunologic) and revealed with Vector DAB (SK-4100, Vector Laboratories).

Apoptotic cells in tumors were detected by IHC staining for the human activated caspase-3. Antigen retrieval, peroxidase blockade, and nonspecific binding was similar to Ki67 staining. After overnight incubation with anti-caspase-3 antibody (1:300; clone C14, 9661L, Cell Signaling Technology) at 4°C in enhancer buffer, slides were incubated for 30 minutes with En Vision/HRP goat anti-rabbit antibody and revealed with DAB.

IHC staining positivity criteria

Two pathologists analyzed human tumors and TMA sections stained with MT4-MMP, EGFR, and RB in a blinded manner. Sections were considered RB positive, when they presented homogeneous and abundant nuclear staining in the tumor compartment. For MT4-MMP and EGFR staining, we selected a cutoff of 50% of stained tumor cells as described previously (15). Regarding TMA, 3–6 tissues spots were analyzed for each tumor. A sample was considered positive when at least 2 of 3 cores were positive. In case of inconsistent staining between the cores, the sample was excluded from the study. For AR staining, a cutoff of 10% of intense staining of cancer cells was considered positive.

Automatic computer-assisted image analysis of IHC staining

Computerized image analysis and quantification of IHC staining on whole tumor sections were performed using the image analysis toolbox of MATLAB R2014a (8.3.0.532) 64-bit (MathWorks). For quantitative measurement of human Ki67 in xenografts and PDXs treated with erlotinib, palbociclib, or the combination, nuclear Ki67 brown staining was automatically detected and the resulting image was binarized. For activated caspase-3 staining quantification, necrotic areas were delimited and removed from processed images before automatic measurement of staining density in whole tumor sections. Results are expressed as staining density per tumor area of treated tumor and reported to vehicle-treated tumor (12).

Statistical analysis

For *in vitro* proliferation assays, differences between experimental groups were assessed by one-way ANOVA test. For tumor growth analysis, differences between experimental groups were assessed by two-way ANOVA test at the endpoint using the Prism 4.0 software (GraphPad). For IHC staining quantification, Wilcoxon–Mann–Whitney tests were performed. Level of significance are: ns, $P > 0.05$; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$.

Results

MT4-MMP, EGFR, and RB are coexpressed in 50% of patients with TNBC

MT4-MMP, EGFR, and RB expressions were examined by IHC analyses in a cohort of 72 human TNBC samples (Fig. 1A). RB expression was maintained in 68% of samples (Fig. 1B). Both MT4-MMP and EGFR were found in 71% of tumors (Fig. 1C), in which RB expression was found in 69% (Fig. 1D). Positivity for the three biomarkers (MT4-MMP/EGFR/RB) was found in 49% of

TNBC samples (Fig. 1E). Expression of MT4-MMP and EGFR was not associated with any clinicopathologic feature (ref. 15; Supplementary Table S1), whereas RB expression was higher in stage I tumors (Fig. 1F) and inversely correlated with Ki67 staining (Fig. 1G) with a correlation coefficient (R) of 0.9. Hence, we hypothesized that the expression of MT4-MMP, EGFR, and RB might be used as a predictive biomarker to define TNBC subtypes that could benefit from combined therapies targeting EGFR and the cell-cycle regulators.

MT4-MMP and EGFR expression sensitizes TNBC cells to erlotinib and palbociclib *in vitro*

We examined the impact of MT4-MMP and EGFR expression on *in vitro* tumor cell proliferation upon erlotinib or palbociclib treatment. MDA-MB-231, HS-578T, and MDA-MB-468 cells endogenously producing EGFR were transfected with MT4-MMP cDNA (MT4-MMP cells) or control vector (CTRL cells; Fig. 2A; Supplementary Fig. S1A and S1D). Cells were incubated with increasing concentrations of erlotinib or palbociclib for different incubation periods (24, 48, and 72 hours; Fig. 2). In MDA-MB-231, MT4-MMP cells were more sensitive to erlotinib and palbociclib compared with control cells (Fig. 2B and C). Treatment with erlotinib (10 $\mu\text{mol/L}$) for 72 hours reduced cell proliferation by 60% and 30% in MT4-MMP and control cells, respectively (Fig. 2D). Incubation with palbociclib (5 $\mu\text{mol/L}$) decreased proliferation of MT4-MMP cells by 90% and by 50% in control cells (Fig. 2E). Similar responses with erlotinib and palbociclib were replicated in HS-578T cells expressing MT4-MMP and EGFR (Supplementary Fig. S1B and S1C), whereas MDA-MB-468 negative for RB (Supplementary Fig. S1G) were sensitive to erlotinib but insensitive to palbociclib (Supplementary Fig. S1E and S1F). Accordingly, two different siRNA directed against MT4-MMP (Fig. 3A) abolished MT4-MMP cell sensitivity to erlotinib (10 $\mu\text{mol/L}$) and reduced their sensitivity to palbociclib (5 $\mu\text{mol/L}$) when compared with cells treated with nontargeting siRNA (scrambled; Fig. 3B). Consistent with previous data (12), EGFR phosphorylation upon EGF stimulation for 5, 20, and 60 minutes was increased in MT4-MMP cells (Fig. 3C and D). Similar increase in EGFR phosphorylation was observed in MDA-MB-468 cells incubated with EGF for 60 minutes (Supplementary Fig. S1G). These data highlight a sustained EGFR activation upon ligand stimulation in the presence of MT4-MMP. Importantly, receptor activation was abolished by erlotinib addition alone or in combination with palbociclib. RB phosphorylation was increased after 20 minutes of EGF treatment with a more pronounced effect in MT4-MMP cells (Fig. 3C and D). RB phosphorylation was reduced by palbociclib alone or in combination with erlotinib after 20 and 60 minutes in both cell types (Fig. 3C and D). These data underline that EGFR signaling and RB inactivation were enhanced by MT4-MMP, the pathway that can be inhibited by erlotinib and palbociclib treatments. Sustained MT4-MMP/EGFR/RB signaling in MT4-MMP cells is likely responsible for increased sensitivity to treatment with erlotinib or palbociclib. While the proliferation of MT4-MMP cells was identical to that of CTRL cells in 2D culture, it was considerably higher in 3D culture and in xenografts as we observed previously (12).

Combination therapy of erlotinib and palbociclib is effective only in MT4-MMP- and EGFR-expressing xenografts

Reasoning that cancer cell sensitivity to drugs might be affected by the structural organization of cells in the extracellular matrix,

Résultats

Published OnlineFirst November 30, 2018; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1880

Combination Therapy Using Anti-EGFR and Anti-CDK4/6 for TNBC

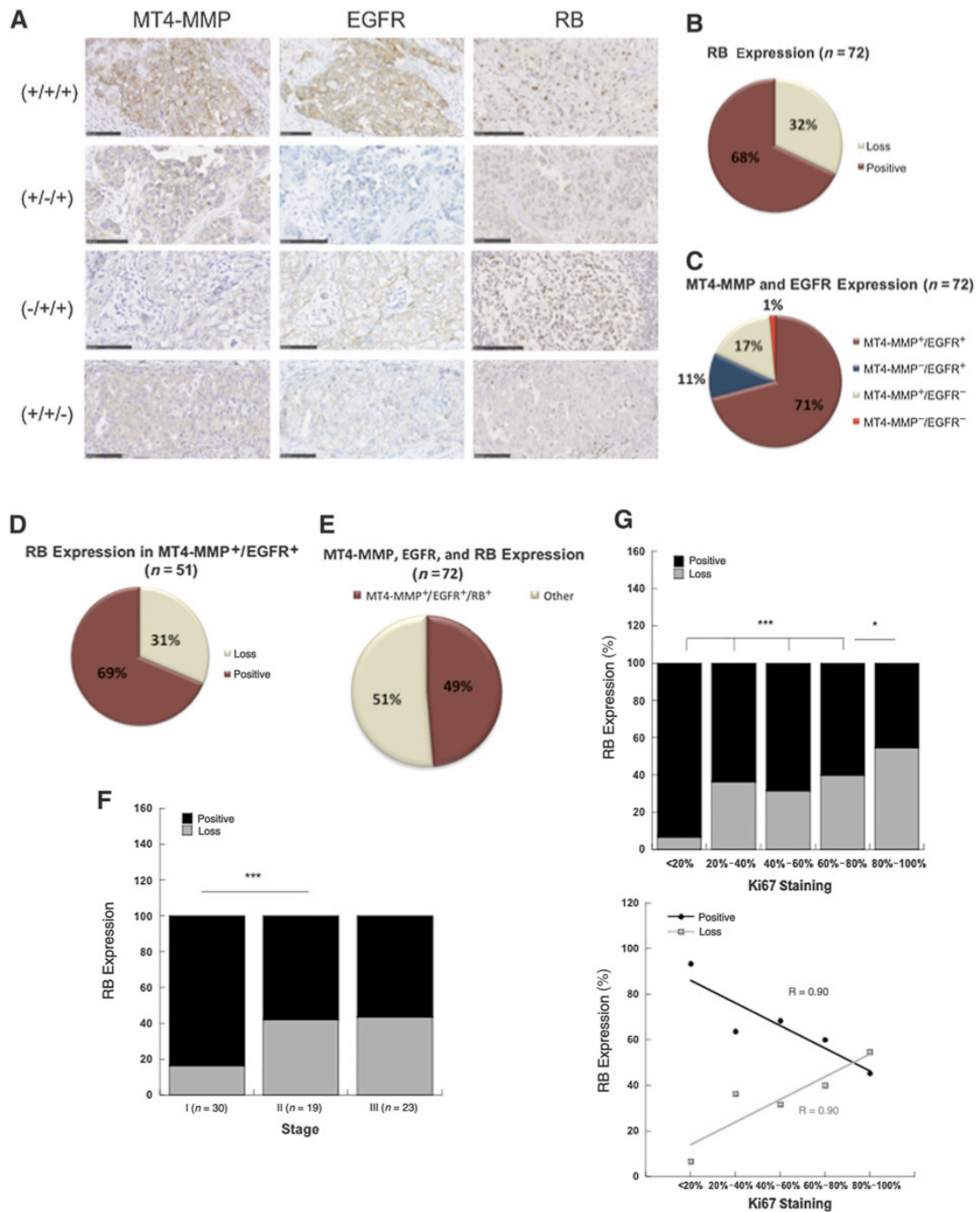


Figure 1.

Expression of MT4-MMP, EGFR, and RB defines TNBC subgroups. IHC staining for MT4-MMP, EGFR, and RB in serial sections of human TNBC samples ($n = 72$). **A**, Images illustrating positive (+) and negative (-) stainings for MT4-MMP, EGFR, and RB (././). MT4-MMP and EGFR staining was considered positive when the cell membrane and cytoplasm staining was uniformly distributed in the whole tumor section. For RB, only nuclear staining of cancer cells in tumor compartments is considered positive. **B** and **C**, Diagrams representing the frequency of TNBC subgroups based on their expression profile of RB, MT4-MMP, and EGFR. **D**, The frequency of RB in TNBC expressing MT4-MMP and EGFR. **E**, The frequency of TNBC expressing MT4-MMP, EGFR, and RB together. **F**, RB expression profile relative to TNM staging. **G**, Inverse correlation of Ki67 and RB expression percentage in TNBC (top) and graph of correlations (bottom).

Foidart et al.

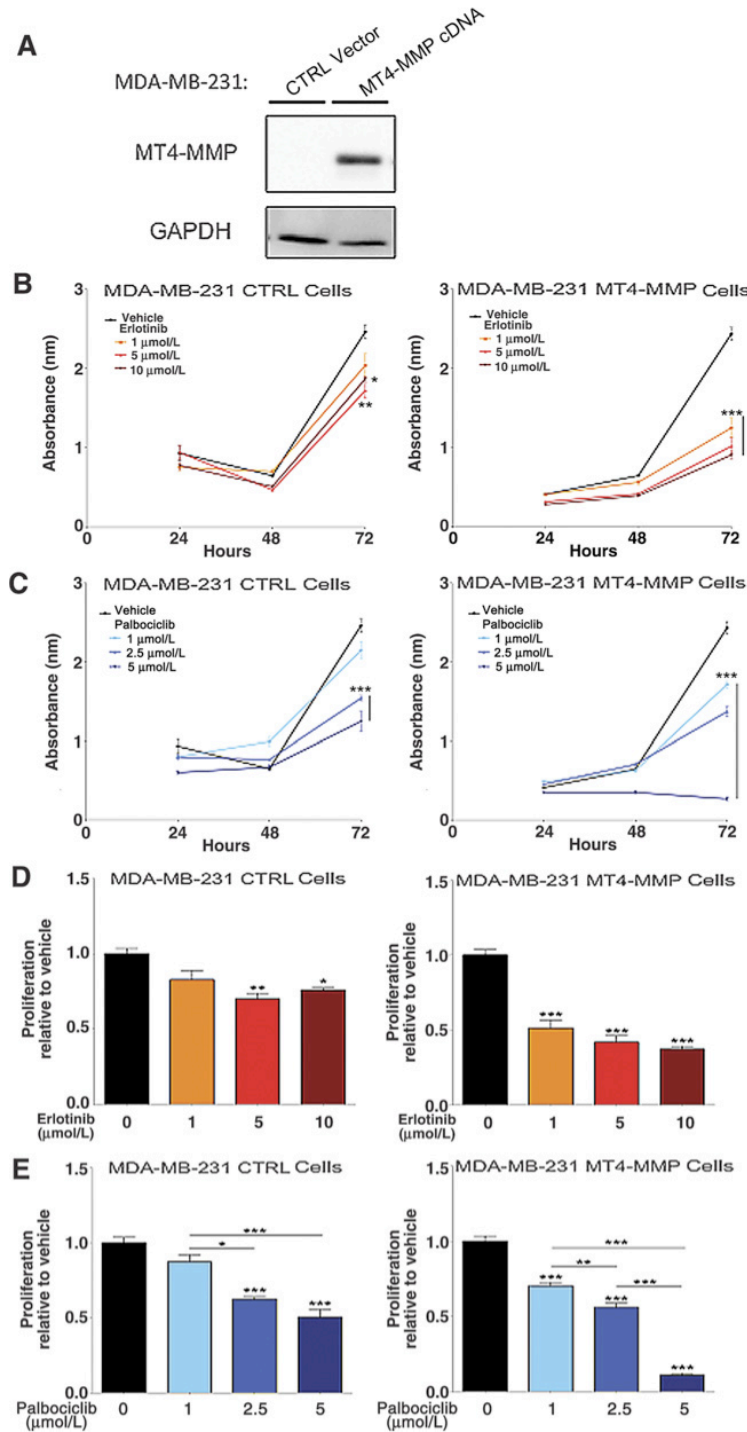


Figure 2. MT4-MMP expression sensitizes TNBC cells expressing EGFR and RB to erlotinib and palbociclib *in vitro*. **A**, Analysis of MT4-MMP expression levels by Western blot analysis in MDA-MB-231 cells stably transfected with MT4-MMP cDNA or control vector. Cell proliferation of MDA-MB-231 cells expressing MT4-MMP (MT4-MMP cells) and control cells (CTRL cells) after 24, 48, and 72 hours of incubation with erlotinib (**B**) or palbociclib (**C**) at indicated concentrations. Rate of cell proliferation compared with control (DMSO) of cells treated for 72 hours with erlotinib (**D**) or palbociclib (**E**). *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$.

we first tested the efficacy of erlotinib and palbociclib in a 3D culture system (on Matrigel) to better recapitulate the *in vivo* context. Both erlotinib (5 $\mu\text{mol/L}$) and palbociclib (0.5 $\mu\text{mol/L}$)

reduced the proliferation of MT4-MMP-expressing MDA-MB-231 cells (Fig. 3F). However, the combination of erlotinib (2.5 $\mu\text{mol/L}$) and palbociclib (0.1 $\mu\text{mol/L}$) resulted in an additive

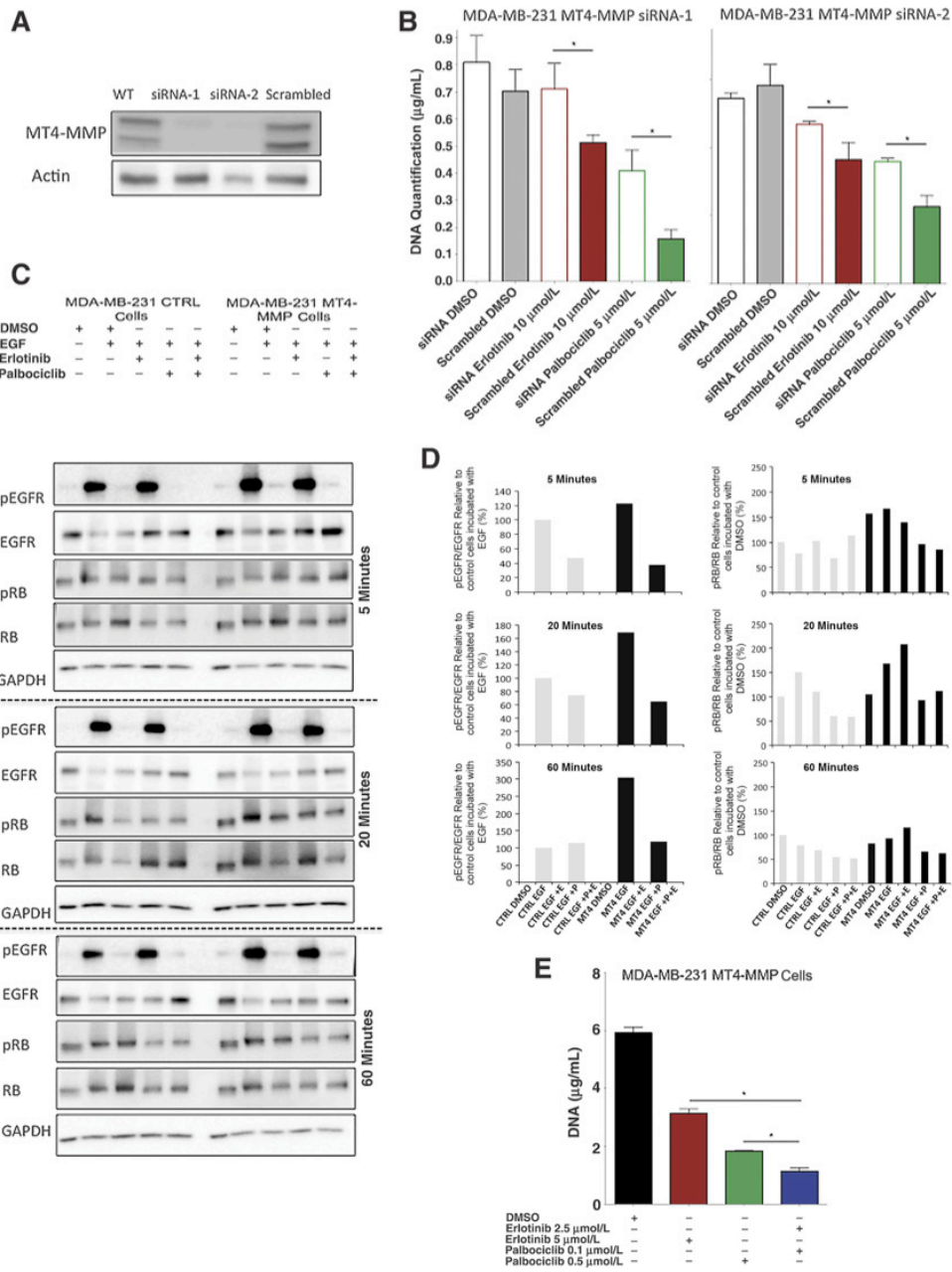


Figure 3.

The MT4-MMP/EGFR/RB signaling axis promotes TNBC cell response to erlotinib and palbociclib. **A**, Western blot analysis for MT4-MMP in MT4-MMP-expressing MDA-MB-231 cells incubated with siRNA (siRNA-1 and siRNA-2) against MT4-MMP or control siRNA (NT-siRNA). Actin is used as a loading control. **B**, Cell proliferation of MT4-MMP cells incubated with siRNA-1 and siRNA-2 against MT4-MMP (siRNA) or control (scrambled) and treated for 72 hours with erlotinib or palbociclib at 5 µmol/L and 10 µmol/L, respectively. DNA quantification was performed to quantify cell number after treatments. **C**, Western blot analysis of phosphorylated EGFR and RB (pEGFR and pRB) and total proteins in total cell lysates from control and MT4-MMP cells incubated in DMEM-free FBS for 1 hour. Cells were stimulated with EGF (20 ng/mL) for 5, 20, and 60 minutes and treated with 0.2% DMSO, erlotinib (10 µmol/L), or palbociclib (5 µmol/L). GAPDH is used as a loading control. **D**, Quantification of EGFR and RB phosphorylation rate after 5, 20, and 60 minutes of cell incubation with EGF in **C**. **E**, MT4-MMP cell proliferation in 3D Matrigel was assessed by DNA quantification after treatment with DMSO (0.2%), erlotinib (2.5 µmol/L and 5 µmol/L), or palbociclib (0.1 µmol/L and 0.5 µmol/L) for 7 days in DMEM with 1% FBS. *, $P \leq 0.05$.

Foidart et al.

inhibitory effect, which was more efficient than higher doses of single treatment with erlotinib (5 $\mu\text{mol/L}$) or palbociclib (0.5 $\mu\text{mol/L}$; Fig. 3F).

To validate these *in vitro* findings, we next tested the impact of MT4-MMP expression on *in vivo* tumor response to erlotinib and palbociclib in mono- and combination therapy. Immunodeficient Rag1^{-/-} mice were subcutaneously injected with MDA-MB-231 cells producing or not MT4-MMP and treated with vehicle, erlotinib (50 mg/kg/day), palbociclib (75 mg/kg/day) or the combination. As previously reported (12–14), MT4-MMP-expressing xenografts grew faster than control xenografts when treated with vehicle (Fig. 4A). While mice bearing control tumors did not respond to single or combined treatments (Fig. 4B), tumor growth of MT4-MMP xenografts was inhibited by erlotinib and palbociclib with the combination eliciting a stronger effect (Fig. 4C). Consistent with the *in vitro* data, MT4-MMP and EGFR-sensitized tumors to erlotinib and palbociclib single agents with a striking effect using the combination.

Combination therapy of erlotinib and palbociclib inhibited the tumor proliferation index and RB phosphorylation in MT4-MMP xenografts

Assessment of Ki67 by IHC (Fig. 4D) and computerized quantification of staining density of control xenografts revealed no significant effect of single treatment with erlotinib on tumor cell proliferation ($P = 0.69$). In sharp contrast, palbociclib ($P = 0.0159$) or the combination of palbociclib + erlotinib ($P = 0.0159$) reduced the proliferation index of control xenografts (Fig. 4E), without significantly affecting the tumor volume at the end of the assay (Fig. 4B). In MT4-MMP tumors, Ki67 density was not affected by erlotinib ($P = 0.40$), but decreased by approximately 70% with palbociclib ($P = 0.0047$) and 80% with the combination ($P = 0.0001$). In contrast, a slight tumor reduction was achieved by palbociclib and erlotinib + palbociclib in control xenografts (20% and 30%, respectively).

Analysis of the RB phosphorylation status of whole tumor extracts revealed a strong phosphorylation of RB in MT4-MMP xenografts when compared with control tumors treated with vehicle. Interestingly, erlotinib + palbociclib combination led to a strong reduction of RB phosphorylation in MT4-MMP tumors (Fig. 4F and G).

MT4-MMP, EGFR, and RB are predictive biomarkers for response to erlotinib–palbociclib combination in PDX-TNBC

To validate our findings in more accurate and robust models of TNBC, we used a panel of 37 PDX of TNBC (Fig. 5A). We performed an IHC study on TMAs of PDX tumors (Supplementary Fig. S2) and found similar expression profiles of MT4-MMP, EGFR, and RB to those of the human samples (Fig. 1B–D). RB expression was maintained in 59% of PDX-TNBC (Fig. 5B). Coexpression of MT4-MMP and EGFR was quite similar to that of human samples with 81% of PDX-TNBC expressing both MT4-MMP and EGFR (Fig. 5C), and 46% being triple positive for MT4-MMP, EGFR, and RB (Fig. 5D). Ki67 density staining was higher in PDX than in human samples and no MT4-MMP-negative cases were found. This is likely due to the higher success of engraftment in mice of the aggressive human tumors with high Ki67 index.

We next selected PDX-TNBC with 4 different expression profiles of MT4-MMP, EGFR, and RB (Fig. 5E) to further support the concept that the combination of erlotinib + palbociclib is efficient

in these models. Nude mice were transplanted subcutaneously with fragments of these selected PDX-TNBC generating five experimental groups: one MT4-MMP⁺/EGFR⁺/RB⁻ (HBCx-4B), one MT4-MMP⁺/EGFR⁻/RB⁻ (HBCx-14), one MT4-MMP⁺/EGFR⁻/RB⁺ (HBCx-16), and two triple-positive MT4-MMP⁺/EGFR⁺/RB⁺ (PDX3 and HBCx-8). The growth of tumor associated with RB loss was not inhibited by erlotinib, palbociclib, or erlotinib + palbociclib treatments, and this was obtained independently of MT4-MMP and EGFR status (Fig. 6A and B). All RB-positive tumors responded to erlotinib + palbociclib combination therapy. MT4-MMP⁺/EGFR⁻/RB⁺ (HBCx-16) grew slowly, as expected, and was sensitive to palbociclib treatment (Fig. 6C). Intriguingly, this PDX was also sensitive to erlotinib and erlotinib + palbociclib combination. Importantly, a PDX-TNBC producing MT4-MMP, EGFR, and RB (PDX3) was sensitive to erlotinib or palbociclib with a striking improvement with erlotinib + palbociclib treatment (Fig. 6D). Another PDX-TNBC expressing the three biomarkers (HBCx-8) was sensitive to palbociclib but not to erlotinib (Erlor; Fig. 6E). IHC analysis of other HER family members (HER2, HER3, and HER4) in PDX3 and HBCx-8 did not reveal any difference (Supplementary Fig. S3). Moreover, MT4-MMP coimmunoprecipitated specifically with EGFR, but not with HER2 or HER3 in COS1 cells expressing EGFR, HER2, and HER3 and transfected with MT4-MMP cDNA (Supplementary Fig. S4A–S4C). Therefore, the nonresponse of the PDX HBCx-8 to erlotinib is not due to any change in copy number of EGFR gene (data not shown), but most likely due to an intrinsic pathway-driven resistance. Nevertheless, the combination therapy led to a stronger inhibition of tumor growth than palbociclib alone in both PDXs. Finally, we obtained tumor inhibition rates >65% with the erlotinib + palbociclib combination in all the RB-positive PDX-TNBC (Fig. 6F).

Quantification of Ki67 staining in intact tumor areas, excluding the necrotic regions, confirmed the tumor growth inhibition in RB-positive PDX-TNBC. The proliferation index rate was not modified by any treatment in PDX-TNBC with RB loss (Fig. 6G and H). As expected, Ki67 density was reduced by erlotinib, palbociclib, and erlotinib + palbociclib in RB-positive PDX-TNBC, except with poorly sensitive PDX-TNBC (HBCx-8) to erlotinib, in which Ki67 was only reduced by the combination (Fig. 6I–K). Similarly, activated caspase-3 staining was markedly increased in tumor compartments of tumors sensitive to erlotinib, palbociclib, and the combination in RB-positive tumors expressing MT4-MMP and EGFR (Supplementary Fig. S5A–S5F).

Discussion

Here, we show that anti-EGFR and anti-CDK4/6 are effective in TNBC tumors expressing MT4-MMP, EGFR, and RB, which represents approximately 50% of human TNBC tumors. By using TNBC xenografts and PDX models established from patients with no prior neoadjuvant therapy (20), we found that the expression of these three biomarkers strongly sensitized tumors to erlotinib–palbociclib combination therapy.

The innovation of this study relies on exploring PDX-TNBC for defining subgroups that can benefit from a combination of anti-EGFR and anti-CDK4/6 drugs. On the basis of the association status of MT4-MMP/EGFR/RB, we identified two subgroups of TNBC with differential response to erlotinib and palbociclib combination: sensitive tumors (RB⁺/MT4-MMP⁺/EGFR⁺) and insensitive tumors with RB loss, independently of MT4-MMP or

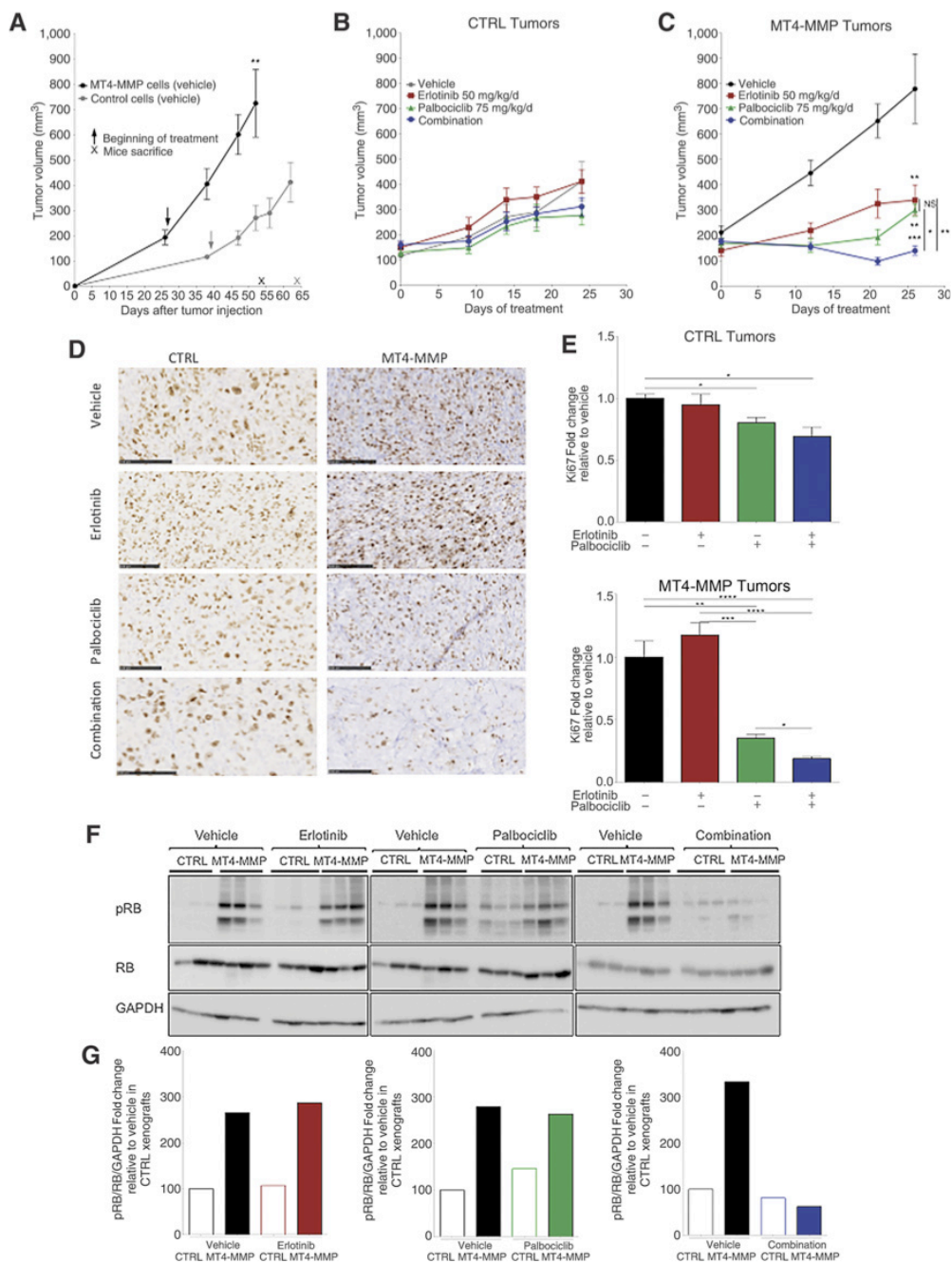


Figure 4.

Expression of MT4-MMP enhances the xenograft response to erlotinib, palbociclib, and the combination. **A**, Tumor growth curves of MDA-MB-231 control xenografts (control cells) and xenografts expressing MT4-MMP (MT4-MMP cells) treated with vehicle. Arrows indicate the day when treatment started. Tumor growth curves of control xenografts (**B**) and MT4-MMP xenografts treated with erlotinib (50 mg/kg/day), palbociclib (75 mg/kg/day), or the combination (**C**). **D**, Images illustrating the IHC staining for human Ki67 in xenografts. **E**, Fold change in Ki67 staining of treated tumors relative to vehicle of control xenografts (top) or MT4-MMP xenografts (bottom). **F**, Western blot analysis of phosphorylated RB (pRB) and total RB protein of tumor lysates from control and MT4-MMP tumors treated with vehicle, erlotinib, palbociclib, or combination. GAPDH is used as a loading control. **G**, Quantification of RB phosphorylation (pRB)/RB/GAPDH rate in tumors in **C**. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$.

Foidart et al.

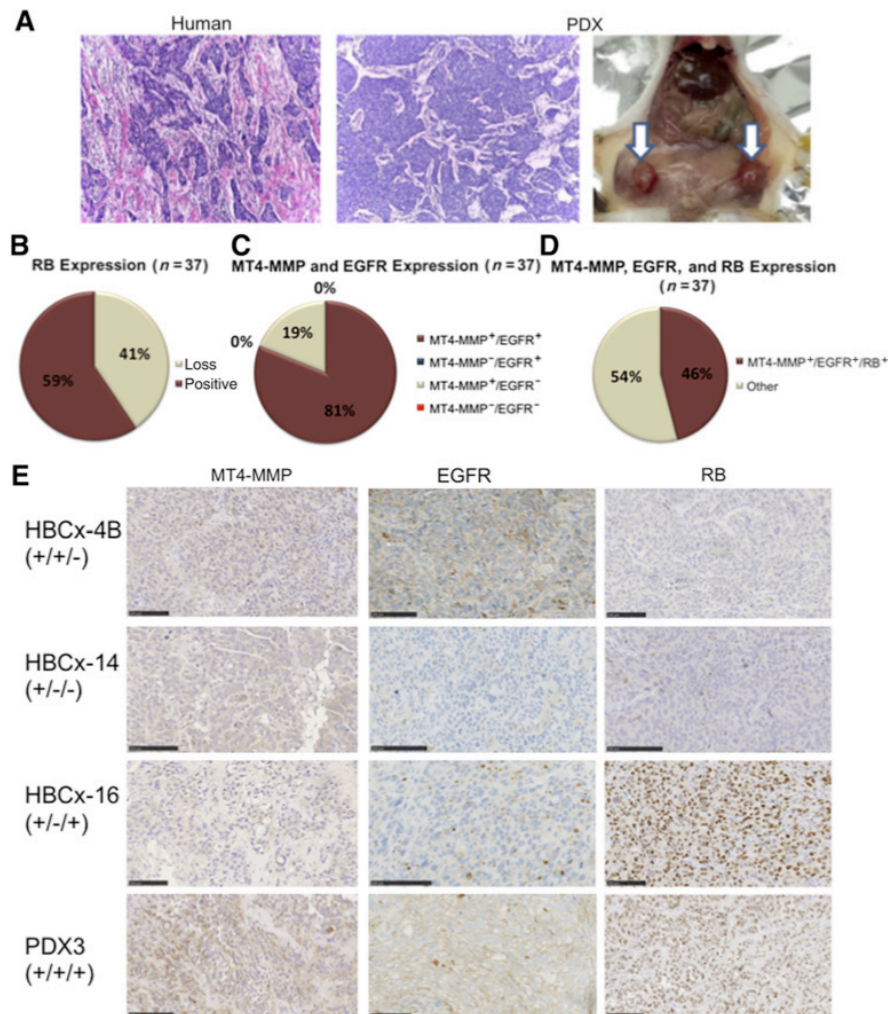


Figure 5. Expression of the MT4-MMP/EGF/RB axis is maintained in PDX-TNBC. **A**, Images illustrating the histology of a primary TNBC tumor (human) and the PDX-TNBC after 3 passages in the mammary fat pad of NOD/SCID mice (PDX). Diagrams representing the frequency of PDX-TNBC subgroups based on their expression profile of RB (**B**); MT4-MMP and EGFR (**C**); and MT4-MMP, EGFR, and RB together (**D**). **E**, Image illustrating IHC staining for MT4-MMP, EGFR, and RB in PDX-TNBC. Four groups were defined: MT4-MMP⁺/EGFR⁺/RB⁻ (HBCx-4B), MT4-MMP⁺/EGFR⁻/RB⁻ (HBCx-14), MT4-MMP⁺/EGFR⁻/RB⁺ (HBCx-16), and MT4-MMP⁺/EGFR⁺/RB⁺ (PDX3).

EGFR expression. Moreover, in TNBCs expressing EGFR and nonresponsive to erlotinib, the combination with palbociclib reversed tumor insensitivity and increased the antitumor effect, indicating that TNBC resistant to EGFR inhibitors could be very sensitive to a combination with CDK4/6 in the clinic. This study demonstrates that the association of the MT4-MMP, EGFR, and RB is worth considering in TNBC to select patients who may benefit from combination-targeted therapy.

TNBC is a molecularly and clinically heterogeneous disease. Paradoxically, TNBC has a higher response to chemotherapy (30%–40%) compared with other breast cancer subtypes, but also has the highest rate of relapse (21). Also, the lack of well-recognized actionable targets in TNBC subclassification hampers

the use of available targeted therapies. Although EGFR is frequently overexpressed in TNBC, phase II and phase III clinical trials using anti-EGFR inhibitors as single agents (cetuximab, erlotinib) failed to show clinical benefit in unselected patients with TNBC (4). Consequently, this has drastically decreased the interest of EGFR as a potential target in TNBC (22, 23). Our data show that patient stratification based on the expression of relevant biomarkers for EGFR activation/signaling could help to select subgroups of patients with TNBC that might respond to EGFR inhibitors. MT4-MMP is a specific copartner of EGFR that promotes its activation upon ligand binding resulting in increased cyclin and CDK activities, and enhanced RB phosphorylation (12). The clinical relevance of the MT4-MMP/EGFR axis in TNBC

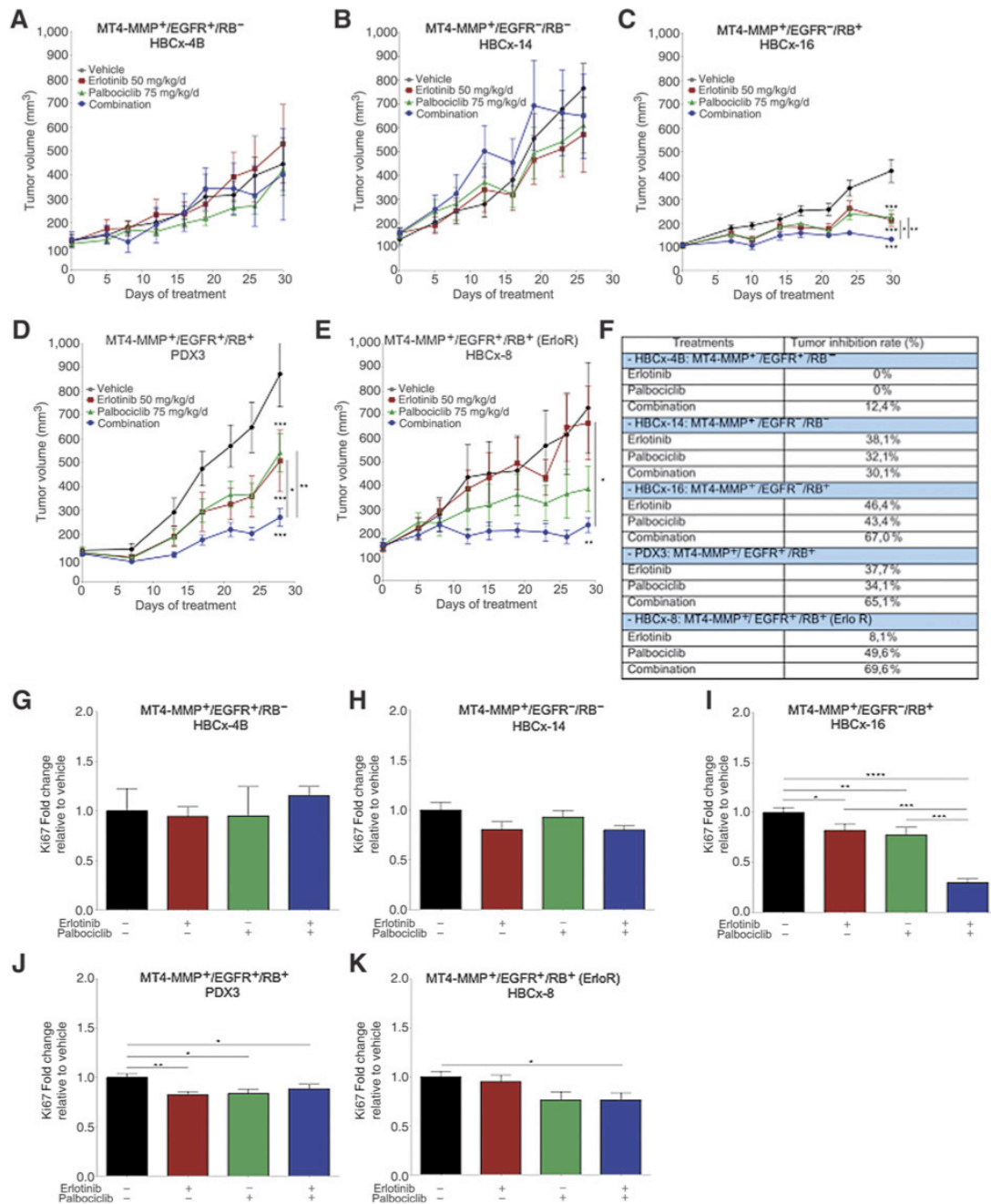


Figure 6.

PDX-TNBC expressing MT4-MMP and RB were more sensitive to erlotinib and palbociclib combination therapy. Investigation of erlotinib, palbociclib, and combination efficacy in PDX. PDX-TNBC differentially expressing MT4-MMP, EGFR, and RB were grown in nude mice. When tumors reached 100–125 mm³, mice were treated for 5 days a week with erlotinib 50 mg/kg/day, palbociclib 75 mg/kg/day, or the combination for 4 weeks. Tumor growth curves and drug response of the PDX-TNBC: (MT4-MMP⁺/EGFR⁺/RB⁻) HBCx-4B (A), (MT4-MMP⁺/EGFR⁻/RB⁻) HBCx-14 (B), (MT4-MMP⁺/EGFR⁻/RB⁺) HBCx-16 (C), and (MT4-MMP⁺/EGFR⁺/RB⁺) PDX3 (D). E, PDX positive for MT4-MMP⁺/EGFR⁺/RB⁺ (HBCx-8) with intrinsic resistance to erlotinib (Erlor). F, Summary table of tumor growth inhibition of treated tumors compared with vehicle. G–K, Quantification of Ki67-positive cells and Ki67 fold changes in response to erlotinib, palbociclib, and the combination on tumor sections from PDX-TNBC models in A–E. *, P ≤ 0.05; **, P ≤ 0.01; ***, P ≤ 0.001.

Foidart et al.

was previously validated in human samples demonstrating that 72.5% of TNBC produce MT4-MMP and EGFR (15). This study conducted on a PDX-TNBC bank further confirms the relevance of MT4-MMP and EGFR double positivity that was found in 81% of PDX-TNBC. Interestingly, MT4-MMP, EGFR, and RB were found present together in 49% of human samples and 46% of PDX-TNBC. While this triple positivity did not correlate with any clinicopathologic features, it defines a TNBC subtype sensitive to EGFR and CDK4/6 inhibitors that notably displayed a higher response to the combination of the two inhibitors. When analyzing the abundance of Ki67 expression in the human TNBC cohort, we found an inverse correlation with intact RB expression (Fig. 1F). Consistent with these data, 30% of TNBC displayed high Ki67 level and low RB expression, which has been suggested as a predictive factor for response to chemotherapy (24, 25). Similarly, we found that approximately 32% of TNBC with RB loss displayed high Ki67 density. Altogether, these data show that 30% of RB loss TNBC would benefit from chemotherapy and 70% of RB positive TNBC would have more profit from targeted therapies. In this context, we are providing a proof of principle of a therapy combination that is worth considering in this TNBC subtype.

While, there is striking evidence of TNBC enrichment for cell-cycle genes (26, 27), Finn and colleagues (9) have reported that TNBC cell lines are clearly less sensitive *in vitro* to CDK4/6 inhibition when used in monotherapy compared with ER-positive cell lines. Consistent with our *in vitro* data, MDA-MB-231 and HS-578T cells negative for MT4-MMP were less or not sensitive to palbociclib. The sensitivity to palbociclib was enhanced in these cells after ectopic expression of MT4-MMP. Interestingly, expression of MT4-MMP in MDA-MB-468 cells negative for RB and producing EGFR responded to erlotinib but not to palbociclib. Mechanistically, MT4-MMP enhances EGFR activation and RB phosphorylation (12), which renders cancer cells more sensitive to CDK4/6 and EGFR inhibitors. Accordingly, RB phosphorylation was strongly reduced in MT4-MMP-expressing cells *in vitro* and in xenografts by palbociclib, in single treatment and more importantly in combination with erlotinib. Studies on other cancer types have reported that sensitivity or resistance mechanisms to CDK4/6 inhibition are orchestrated by RB status (28–30). By linking MT4-MMP-modulated EGFR activation with RB phosphorylation in TNBC, we point to a new signaling axis that can be targeted in TNBC. The EGFR/RB pathway has been explored recently on other cancer types in two studies. Indeed, Zhou and colleagues (29) reported recently an efficient response to the combination of an EGFR inhibitor with MAPK or CDK4/6 blockade in esophageal tumors. In addition, palbociclib reversed non-small cell lung cancer (NSCLC) acquired resistance to EGFR-TKI and the combination of CDK4/6 and EGFR inhibitor has been proposed to be effective in HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC; ref. 30). In NSCLC overexpressing EGFR, the response to single anti-EGFR agents was either not efficient or did not show a sustained effect, due to acquired resistance and RB loss (28). Interestingly, we found a drastic inhibition of tumor growth by the combination of CDK4/6 inhibitor with erlotinib in a PDX-TNBC (HBCx-8) expressing EGFR, MT4-MMP, and RB but unresponsive to erlotinib monotherapy (Erlor; Fig. 6E). In our PDX-TNBC study and in other studies conducted on lung and esophageal cancers (28, 29), combination therapies reversed resistance to EGFR inhibitors, supporting our concept that TNBC resistant to EGFR therapy might benefit from a combination of EGFR with CDK4/6 inhibitors.

We cannot rule out the contribution of other factors to the TNBC response to erlotinib and palbociclib. For instance, the expression of androgen receptors (AR) could influence cell cycle in TNBC (31). It has been reported that the combination of enzalutamide, an AR signaling inhibitor, and palbociclib showed higher antiproliferative effect *in vitro* in AR⁺ and RB⁺ cells (32). Evidence of AR and RB signaling in TNBC was proven by the increased sensitivity of TNBC cells expressing AR to therapy combination of palbociclib with PI3K inhibitors (pictilisib and taselisib; ref. 33). These reports have demonstrated a synergistic effect of CDK 4/6 (palbociclib) and PI3K inhibitors (pictilisib and taselisib) in PIK3CA-mutant AR⁺ TNBC cell lines. In fact, we examined AR expression in our TNBC cohorts by IHC staining with a cutoff of 10% for positivity and found that 17 of 72 (24%) tumors were AR⁺ tumors, among which 94% were RB⁺ and 71% coexpressed MT4-MMP and EGFR (Supplementary Fig. S6). In contrast, only 4 of 37 (10%) PDX-TNBC samples were positive for AR. The discrepancy between the prevalence of AR in human samples compared with PDX-TNBC may be due to the enrichment of the most aggressive tumors during the generation of a PDX (34). However, molecular profiling for AR on TNBC fresh tissues in a prospective study would determine the significance of AR found by IHC. Indeed, AR⁺ tumors are often associated with lower Ki67 and lower aggressiveness (35). Taken together, these data suggest that TNBC can be targeted by combination of CDK4/6 with EGFR, AR or PI3K inhibitors, depending on activated upstream signaling. Of note, we demonstrate that about 50% of TNBC are associated with MT4-MMP/EGFR/RB pathway and could benefit from a combined targeted therapy.

In conclusion, our study demonstrates that anti-EGFR and anti-CDK4/6 drugs are worth considering in TNBC and indicates that the expression of MT4-MMP/EGFR/RB can be used as predictive biomarkers for treatment response of patients with TNBC to a combination therapy. By updating the interest of targeted anti-EGFR therapies in TNBC and identifying three markers predictive of tumor response to a combination of therapy targeting EGFR and CDK4/6, our data pave the way for future clinical trials in TNBC using a personalized medicine.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

J. Collignon is a consultant/advisory board member for Roche, Merck, Amgen, Pfizer, Ipsen, Sanofi, Sirtex, Lilly, Celgene, Bayer, Bristol-Myers Squibb, and Novartis. G. Jerusalem reports receiving commercial research grants from Roche and Novartis, and is a consultant/advisory board member for Novartis, Roche, Pfizer, Lilly, Celgene, Amgen, Bristol-Myers Squibb, Puma Technology, AstraZeneca, Daiichi Sankyo, and AbbVie. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: M. Coibion, A. Noël, N.E. Sounni, G. Jerusalem
 Development of methodology: P. Foidart, C. Yip, M. Lienard, L. Montero-Ruiz, G. Jerusalem
 Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): P. Foidart, C. Yip, J. Radermacher, E. Montaudon, S. Château-Joubert, M. Coibion, V. Jossa, E. Marangoni, G. Jerusalem
 Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): P. Foidart, J. Radermacher, S. Blacher, E. Maquoi, S. Château-Joubert, A. Noël, N.E. Sounni, G. Jerusalem
 Writing, review, and/or revision of the manuscript: P. Foidart, J. Radermacher, J. Collignon, A. Noël, N.E. Sounni, G. Jerusalem
 Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): L. Montero-Ruiz, A. Noël
 Study supervision: J. Collignon, N.E. Sounni, G. Jerusalem

Acknowledgments

The authors thank all the lab members of Sounni and Noël's group for useful technical advice. The authors thank the Biobank of Liège University for providing human samples of TNBC. This project was supported by grants from the Fonds de la Recherche Scientifique - FNRS (F.R.S.-FNRS, Belgium), the Fondation contre le Cancer (foundation of public interest, Belgium), FRS-FNRS, Liège University and Leon Fredericq Foundation, and the Fonds spéciaux de la Recherche (University of Liège, Liège, Belgium).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received June 13, 2018; revised October 15, 2018; accepted November 27, 2018; published first November 30, 2018.

References

- Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and pre-clinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750-67.
- Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:1688-98.
- Mittendorf EA, Phillips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res* 2014;2:361-70.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;13:4429-34.
- Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, Mayer EL, Esteva FJ, Ma CX, et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:2615-23.
- Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:683-92.
- Tredan O, Campone M, Jassem J, Vyzula R, Coudert B, Pacilio C, et al. Ixabepilone alone or with cetuximab as first-line treatment for advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2015;15:8-15.
- Bartholomeusz C, Yamasaki F, Saso H, Kurisu K, Hortobagyi GN, Ueno NT. Gemcitabine overcomes erlotinib resistance in EGFR-overexpressing cancer cells through downregulation of Akt. *J Cancer* 2011;2:435-42.
- Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res* 2009;11:R77.
- DeMichele A, Clark AS, Tan KS, Heitjan DF, Gramlich K, Gallagher M, et al. CDK 4/6 inhibitor palbociclib (PD0332991) in Rb+ advanced breast cancer: phase II activity, safety, and predictive biomarker assessment. *Clin Cancer Res* 2015;21:995-1001.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012;490:61-70.
- Paye A, Truong A, Yip C, Cimino J, Blacher S, Munaut C, et al. EGFR Activation and signaling in cancer cells are enhanced by the membrane-bound metalloprotease MT4-MMP. *Cancer Res* 2014;74:6758-70.
- Chabotiaux V, Sounni NE, Pennington CJ, English WR, van den Brule F, Blacher S, et al. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res* 2006;66:5165-72.
- Host L, Paye A, Detry B, Blacher S, Munaut C, Foidart JM, et al. The proteolytic activity of MT4-MMP is required for its pro-angiogenic and pro-metastatic promoting effects. *Int J Cancer* 2012;131:1537-48.
- Yip C, Foidart P, Somja J, Truong A, Lienard M, Feyereisen E, et al. MT4-MMP and EGFR expression levels are key biomarkers for breast cancer patient response to chemotherapy and erlotinib. *Br J Cancer* 2017;116:742-51.
- Noel A, De Pauw-Gillet MC, Purnell G, Nusgens B, Lapiere CM, Foidart JM. Enhancement of tumorigenicity of human breast adenocarcinoma cells in nude mice by matrigel and fibroblasts. *Br J Cancer* 1993;68:909-15.
- Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, et al. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* 2007;13:3989-98.
- Hatem R, El Botty R, Chateau-Joubert S, Servely JL, Labiod D, de Plater L, et al. Targeting mTOR pathway inhibits tumor growth in different molecular subtypes of triple-negative breast cancers. *Oncotarget* 2016;7:48206-19.
- Hatem R, Labiod D, Chateau-Joubert S, de Plater L, El Botty R, Vacher S, et al. Vandetanib as a potential new treatment for estrogen receptor-negative breast cancers. *Int J Cancer* 2016;138:2510-21.
- Marangoni E, Laurent C, Coussy F, El-Botby R, Chateau-Joubert S, Servely JL, et al. Capecitabine efficacy is correlated with TYMP and RB1 expression in PDX established from triple-negative breast cancers. *Clin Cancer Res* 2018;24:2605-15.
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007;13:2329-34.
- Reeder-Hayes KE, Carey LA, Sikov WM. Clinical trials in triple negative breast cancer. *Breast Dis* 2010;32:123-36.
- Kruser TJ, Wheeler DL. Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res* 2010;316:1083-100.
- Witkiewicz AK, Chung S, Brough R, Vail P, Franco J, Lord CJ, et al. Targeting the vulnerability of RB tumor suppressor loss in triple-negative breast cancer. *Cell Rep* 2018;22:1185-99.
- Witkiewicz AK, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. *Breast Cancer Res* 2014;16:207.
- Wang Y, Zhang T, Kwiatkowski N, Abraham BJ, Lee TI, Xie S, et al. CDK7-dependent transcriptional addiction in triple-negative breast cancer. *Cell* 2015;163:174-86.
- Rao SS, Stoehr J, Dokic D, Wan L, Decker JT, Konopka K, et al. Synergistic effect of eribulin and CDK inhibition for the treatment of triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2017;8:83925-39.
- Niederst MJ, Sequist LV, Poirier JT, Mermel CH, Lockerman EL, Garcia AR, et al. RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat Commun* 2015;6:6377.
- Zhou J, Wu Z, Wong G, Pectasides E, Nagaraja A, Stachler M, et al. CDK4/6 or MAPK blockade enhances efficacy of EGFR inhibition in oesophageal squamous cell carcinoma. *Nat Commun* 2017;8:13897.
- Beck TN, Georgopoulos R, Shagisultanova EI, Sarcu D, Handorf EA, DUBYK C, et al. EGFR and RB1 as dual biomarkers in HPV-negative head and neck cancer. *Mol Cancer Ther* 2016;15:2486-97.
- Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13:674-90.
- Liu CY, Lau KY, Hsu CC, Chen JL, Lee CH, Huang TT, et al. Combination of palbociclib with enzalutamide shows *in vitro* activity in RB proficient and androgen receptor positive triple negative breast cancer cells. *PLoS One* 2017;12:e0189007.
- Asghar US, Barr AR, Cutts R, Beaney M, Babina I, Sampath D, et al. Single-cell dynamics determines response to CDK4/6 inhibition in triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23:5561-72.
- Marangoni E, Poupon MF. Patient-derived tumour xenografts as models for breast cancer drug development. *Curr Opin Oncol* 2014;26:556-61.
- Adamo B, Ricciardi GRR, Ieni A, Franchina T, Fazzari C, Sano MV, et al. The prognostic significance of combined androgen receptor, E-Cadherin, Ki67 and CK5/6 expression in patients with triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2017;8:76974-86.

Résultats

Number of patients	72
Median follow-up	53 months
Median age	60 years
Median progression-free survival	21 months
Median overall survival	24 months
Tumor	
T1	35 (48.6%)
T2	28 (38.9%)
T3	7 (9.7%)
T4	2 (2.8%)
Node	
N0	46 (63.9%)
N1	17 (23.6%)
N2	6 (8.3%)
N3	3 (4.2%)
Metastases	
M0	72 (88.9%)
M1	0
SBR** grade	
I	4 (5.55%)
II	11 (15.3%)
III	57 (79.2%)
Ki67	
Negative (<20%)	15 (20.8%)
Positive (≥20%)	55 (76.4%)
Unknown	2
CK* 5/6	
Negative (<10%)	32 (44.4%)
Positive (≥10%)	40 (55.6%)
Prognostic stage (TNM 8 th edition AJCC-UICC)	
I	30 (41.7%)
II	19 (26.4%)
III	23 (31.9%)
IV	0

* Bloom Richardson; ** Cytokeratin

Supplemental Table 1. Clinicopathological characteristics of the human TNBC cohort

Supplemental Table 1

Résultats

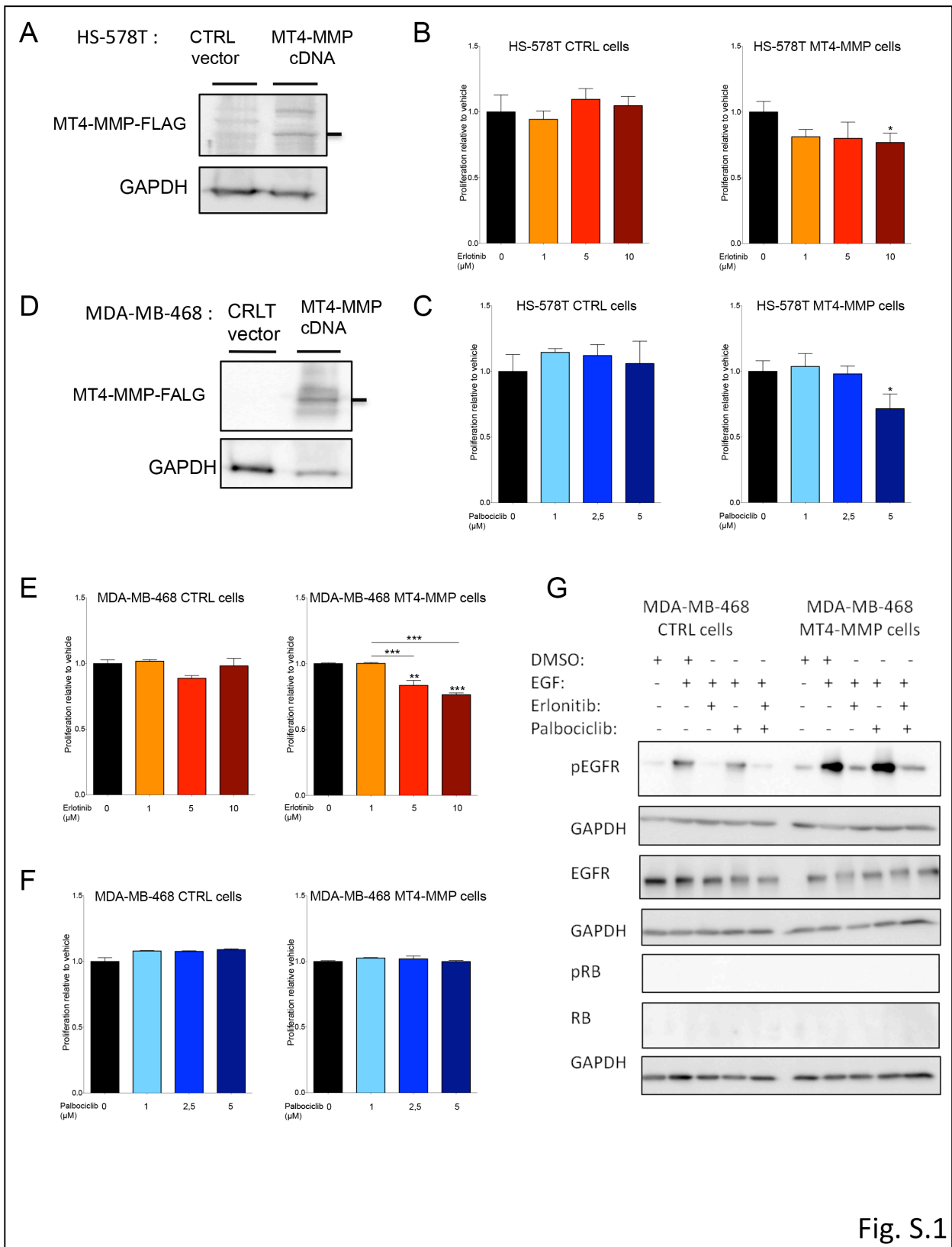
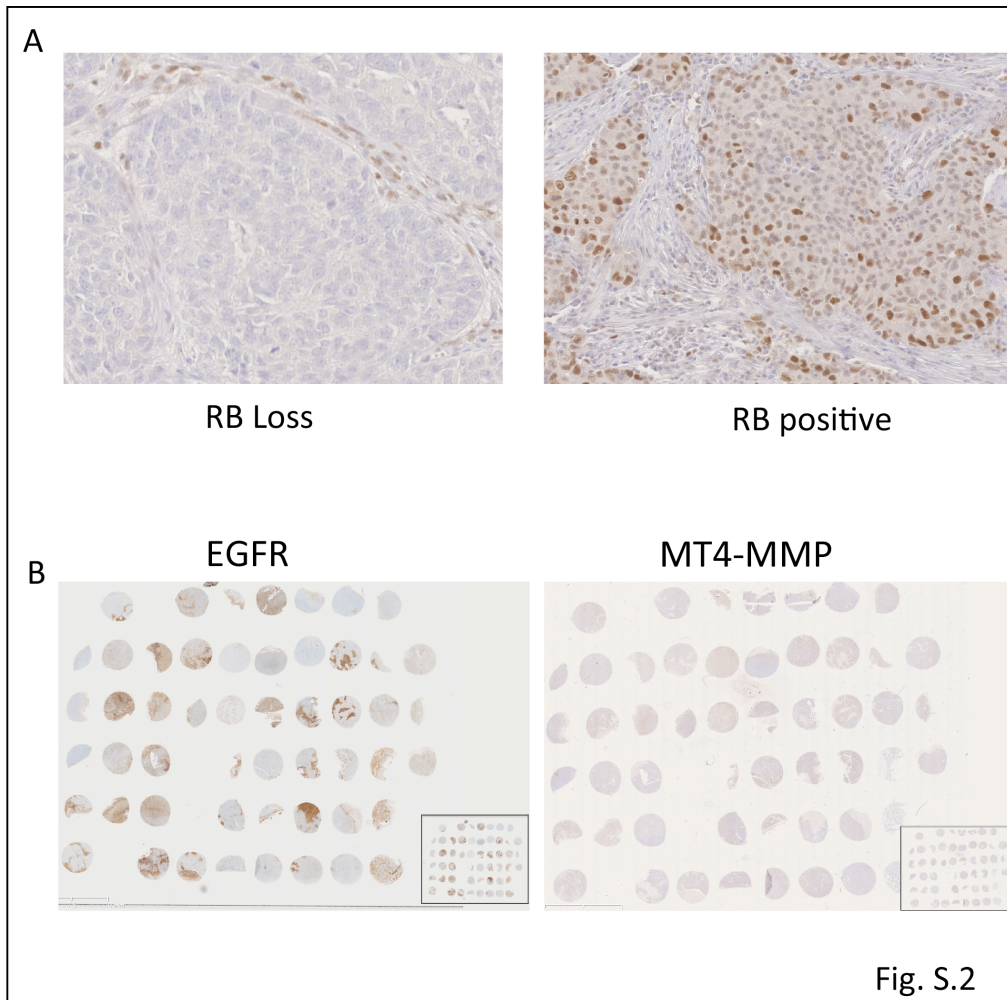


Fig. S.1

Supplemental Fig 1: MT4-MMP expression sensitized TNBC breast cancer cells to erlotinib and to palbociclib only when cells express RB (HS-578T cells expressing RB but not in MDA-MB-468 cells with RB loss). (A) Western blot analysis for MT4-MMP in HS-578T transiently transfected with MT4-MMP cDNA with FLAG or control vector. (B) Rate of cell proliferation compared to control (DMSO) of HS-578T cells expressing MT4-MMP (MT4-MMP cells) and control cells (CTRL cells) after 48h incubation with erlotinib or, (C) palbociclib at indicated concentrations. (D) Western blot analysis for MT4-MMP in MDA-MB-468 stably transfected with MT4-MMP cDNA or control vector.

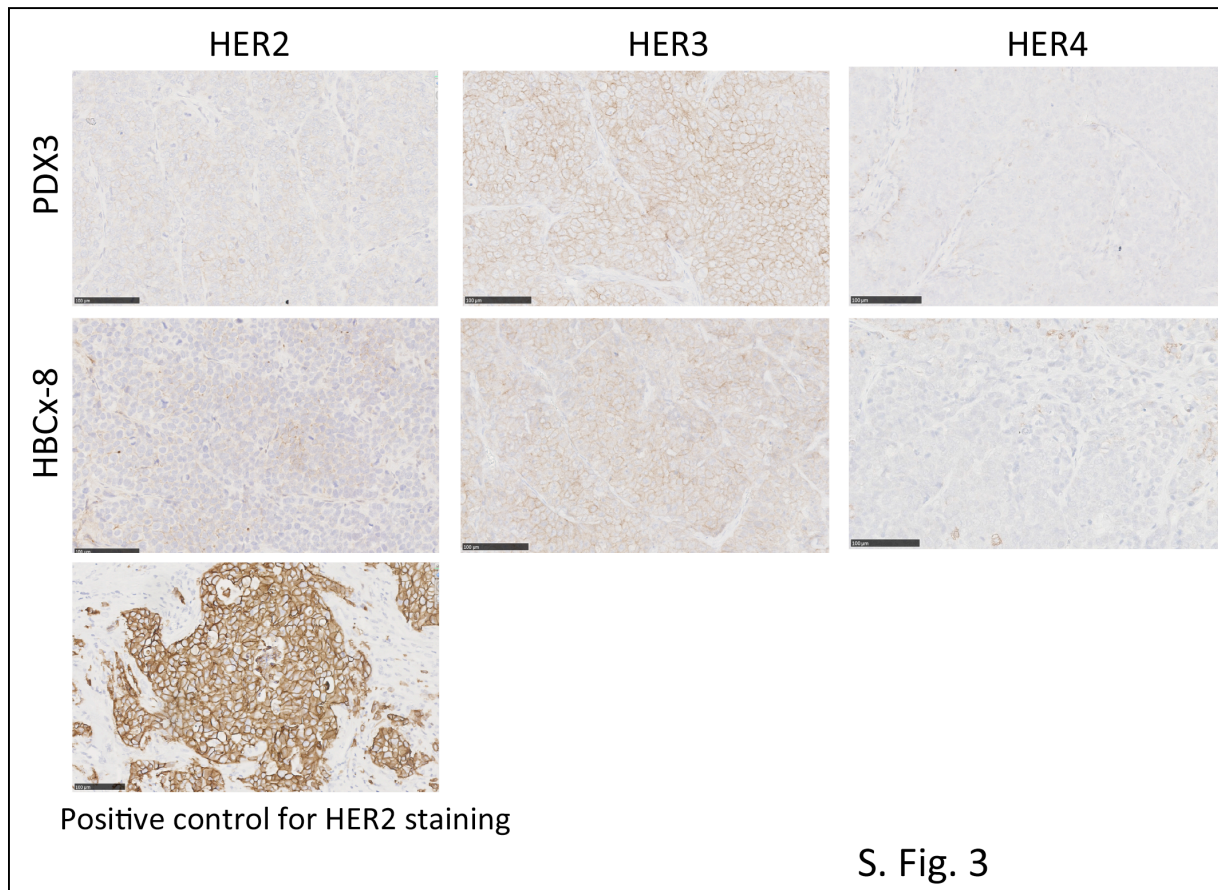
Résultats

(E) Rate of cell proliferation compared to control (DMSO) of MDA-MB-468 control cells (CTRL cells) and MT4-MMP cells after 72h incubation with erlotinib or, (F) palbociclib at indicated concentrations. (G) Western blot analysis of phosphorylated EGFR and RB and total EGFR and RB proteins in total cell lysates from control and MT4-MMP MDA-MB-468 cells incubated in DMEM free FBS for 1h. Cells were stimulated with EGF (20 ng/ml) for 60 min and treated with 0.2% DMSO, erlotinib (10 μ M) or palbociclib (5 μ M). *, p-value \leq 0.05; **, p-value \leq 0.01; ***, p-value \leq 0.001



Supplemental Fig 2: (A) Images of IHC staining for RB from a human TNBC biobank, illustrating negative and positive staining in tumor compartments. (B) Representative illustration of tissue microarray slides of PDX-TNBC stained for EGFR and MT4-MMP.

Résultats



Supplemental Figure 3: Comparison of the expression levels of HER family members (HER2, HER3 and HER4) in PDXs expressing the three biomarkers. Immunohistochemistry analysis of HER2, HER3 and HER4 in the two PDXs expressing MT4-MMP, EGFR and RB. The positive control for HER2 staining is a HER2 breast cancer sample.

Résultats

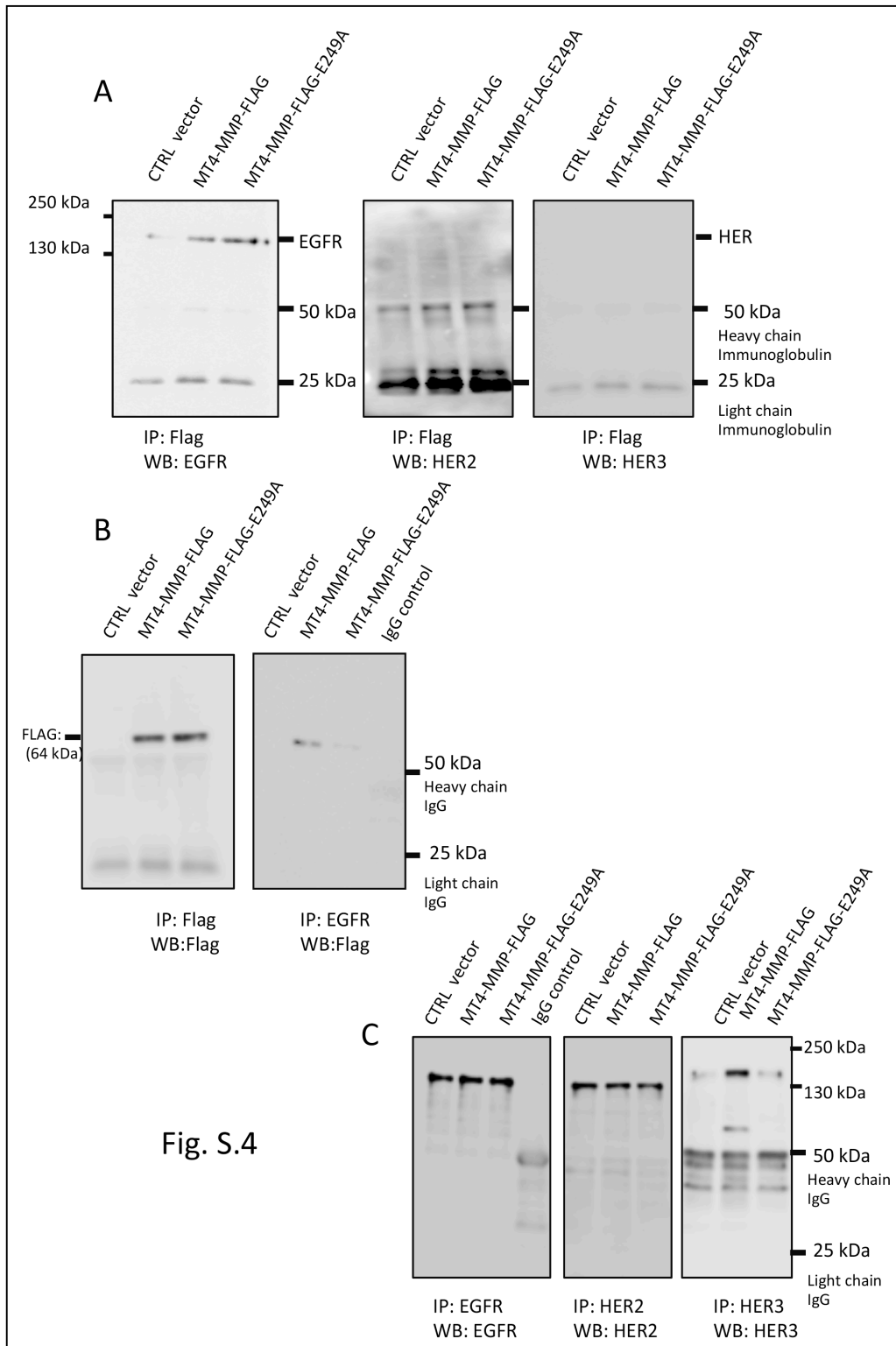
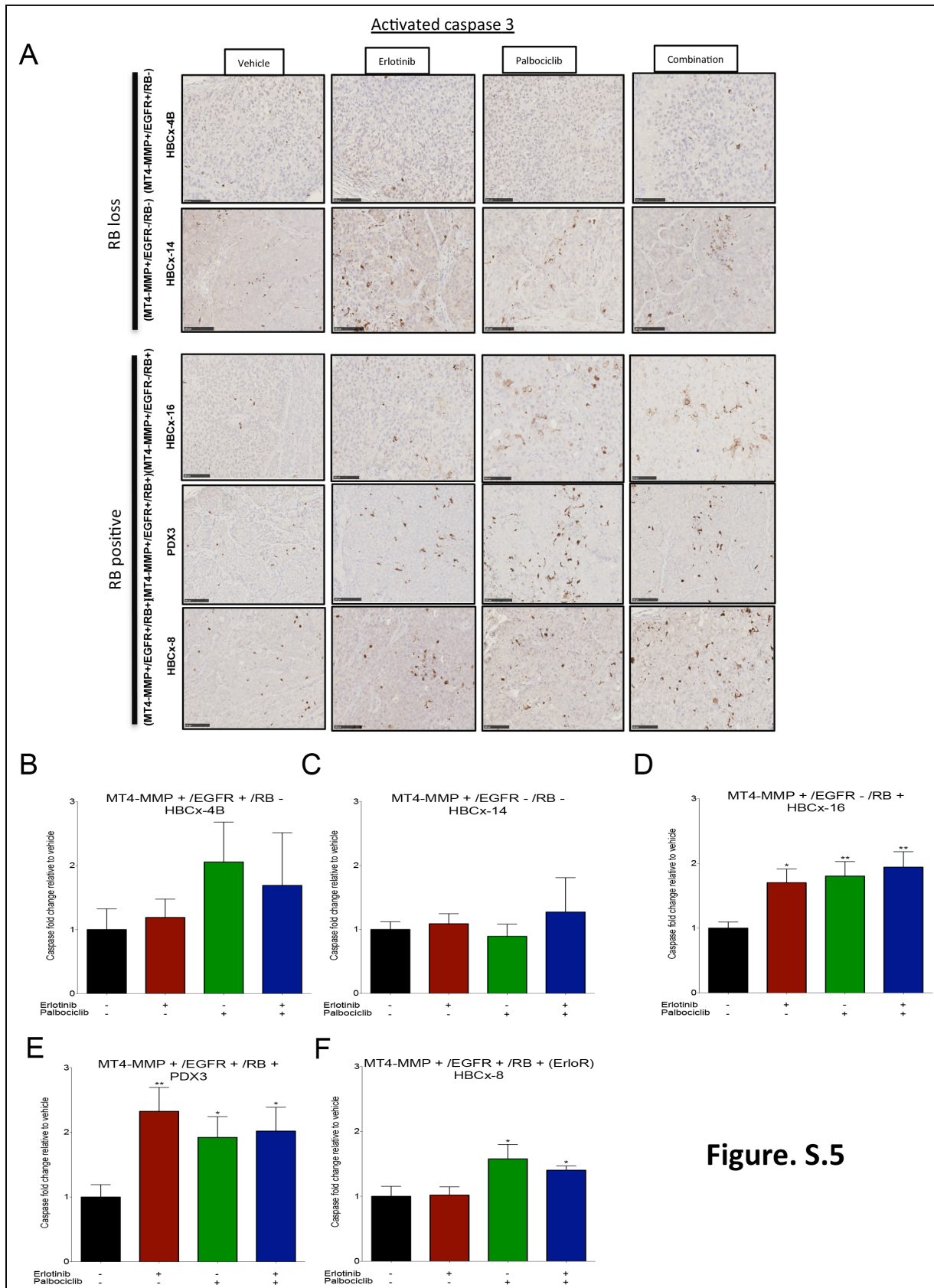


Fig. S.4

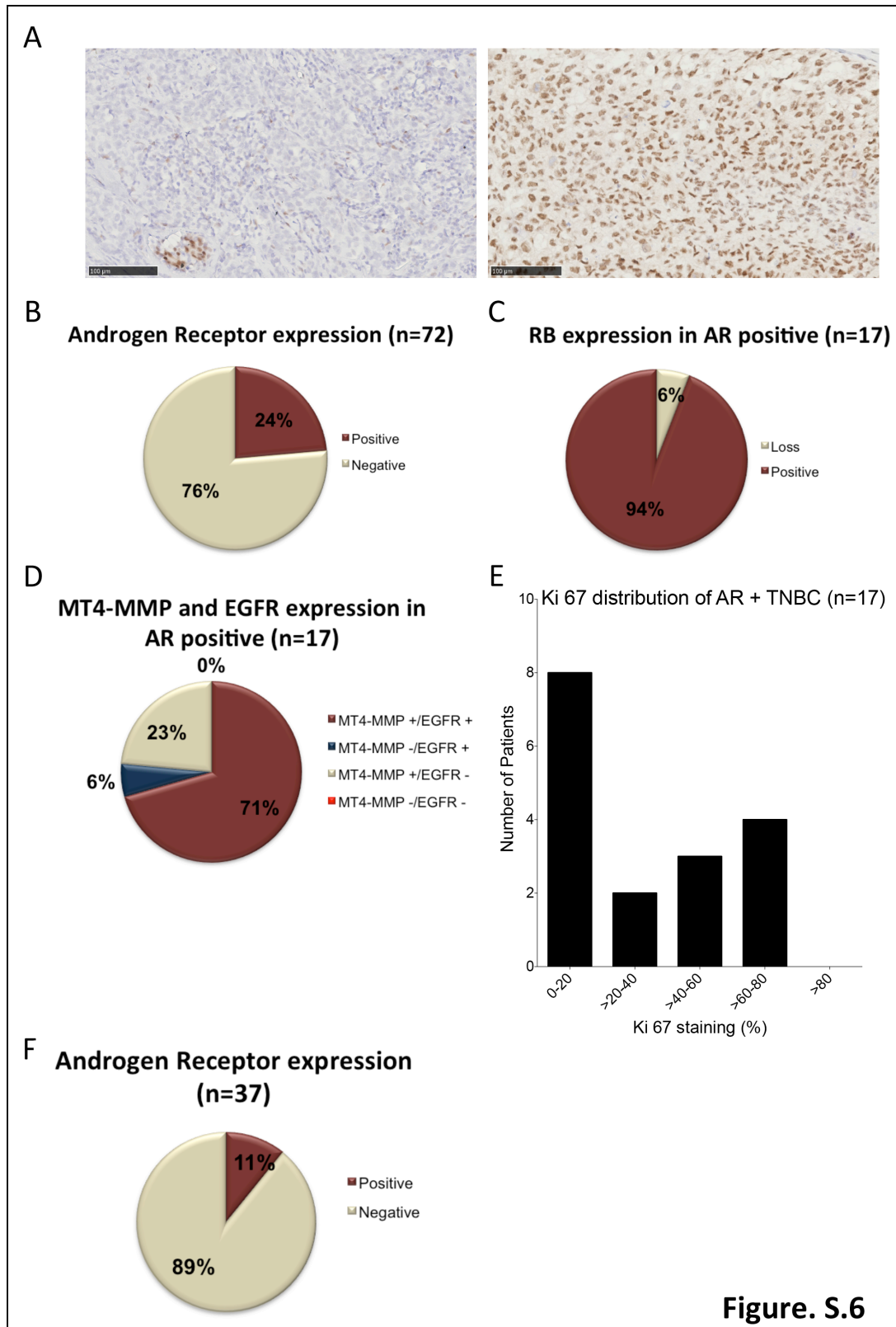
Supplemental Fig 4: MT-MMP was found in immune complex with EGFR but not with HER2 and HER3. COS-1 cells were transfected with MT4-MMP or its inactive form (MT4-MMPE249A) with FLAG or control vector. (A) MT4-MMP was immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and the co-immunoprecipitation of HER family members (EGFR, HER2 and HER3) was revealed by western blot analysis. (B) Confirmation of MT4-MMP immunoprecipitation by western blot for FLAG (left panel) and invers IP for EGFR followed by western blot for FLAG. (C) Controls of IP for EGFR, HER2 and HER3.

Résultats



Supplemental Fig 5: Pro-apoptotic effect of elotinib, palbociclib and the combination in PDX-TNBC. (A) Images illustrating activated caspase-3 staining in the PDX-TNBC models treated with erlotinib or palbociclib in monotherapy or the combination. (B) Computerized quantification of activated caspase-3 in whole tumor sections after the exclusion of necrotic areas. *, p-value ≤ 0.05 ; **, p-value ≤ 0.01

Résultats



Supplemental Fig 6: AR expression in the human and PDX TNBC cohorts (A) Images illustrating negative (left) and positive (right) staining for AR. (B) Diagram representing the frequency of AR positive in the human TNBC cohort. (C) Frequency of AR in RB positive and, (D) in MT4-MMP/EGFR positive TNBC samples. (E) Correlation of AR and Ki67 expression in the human TNBC cohort. (F) Frequency of AR in PDX-TNBC cohort and, (F) in RB positive samples.

Résultats

3. Troisième partie : revue sur la MT4-MMP

Publication n°3 :

MT4-MMP: The GPI-Anchored Membrane-Type Matrix Metalloprotease with Multiple Functions in Diseases .

*Cassandra Yip, **Pierre Foidart**, Agnès Noël and Nor Eddine Sounni*

Int J Mol Sci. 2019 Cancer Res. 2018 Jan.

Cette revue sur la MT4-MMP est disponible en annexes (annexe 1).

4. Quatrième partie : articles issus de la collaboration avec l'équipe du Docteur Elisabetta Marangoni

Publication n°4 :

Capecitabine efficacy is correlated with TYMP and RB expression in PDX established from triple-negative breast cancer.

*Elisabetta Marangoni, Cécile Laurent, Florence Coussy, Rania El Botty, Sophie Château-Joubert, Jean-Luc Servely, Ludmilla de Plater, Franck Assayag, Ahmed Dahmani, Elodie Montaudon, Fariba Némati, Justine Fleury, Sophie Vacher, David Gentien, Audrey Rapinat, **Pierre Foidart**, Nor Eddine Sounni, Agnès Noël, Anne Salomon, Marick Lae, Didier Decaudin, Sergio Roman-Roman, Ivan Bièche, Martine Piccard, and Fabien Rey.*

Clin Cancer Res. 2018 Jun.

Cet article est disponible en annexes (annexe 2) : outre une relecture attentive de l'article et des suggestions de corrections, nous avons contribué aux manipulations par le marquage en Rb ou pRb des lames de TMA de cette étude et leurs analyses.

Publication n°5 :

Response of triple-negative breast cancer patient-derived xenografts (TNBC-PDX) with BRCAness phenotype, high expression of SLFN11 and RB1 loss to topoisomerase I inhibitors.

*Florence Coussy, Rania El-Botty, Sophie Château-Joubert, Ahmed Dahmani, Elodie Montaudon, Sophie Leboucher, Ludivine Morisset, Pierre Painsec, Laura Sourd, Léa Huguet, Fariba Némati, Jean-Luc Servely, Thibault Larcher, Sophie Vacher, Cécile Reyes, Philippe La Rosa, Georges Lucotte, Tatiana Popova, **Pierre Foidart**, Nor Eddine Sounni, Agnès Noël, Didier Decaudin, Anne Salomon, Fabien Rey, Christopher Mueller, Petra Ter Brugge, Jos Jonkers, Marc-Henri Stern, Ivan Bièche, Yves Pommier and Elisabetta Marangoni.*

Submitted in Science Translational Medicine, under revision.

Cet article a été révisé et les manipulations pour répondre aux « reviewers » sont en cours : outre une relecture attentive de l'article et des suggestions de corrections, nous avons contribué aux manipulations par le marquage en Rb ou pRb des lames de TMA de cette étude et leurs analyses. N'étant pas encore publié, il n'est pas repris en annexes.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Nous avons choisi de différencier la discussion et les perspectives de celles décrites dans les différents articles récemment et présentés dans la partie « résultats » de cette thèse.

Au cours de ce travail, nous avons, dans un premier temps, confirmé la haute expression de la MT4-MMP et de l'EGFR sur une biobanque d'échantillons de TNBC indemnes de toute thérapie systémique. En effet, 72,5% (59/81) de ces échantillons les co-exprimaient avec une co-localisation retrouvée dans 79% de ces 59 cas. De façon surprenante, bien que la MT4-MMP possède des caractéristiques pro-angiogéniques et pro-métastatiques [315, 330, 332], nous avons rétrospectivement observé un meilleur taux de survie des patientes exprimant la MT4-MMP et traitées par chimiothérapie. L'expression de la MT4-MMP sensibilise les cellules tumorales aux agents ciblant l'ADN, tant *in vitro* (Epirubicine, Cyclophosphamide, Cisplatine) qu'*in vivo* sur des xénogreffes (Epirubicine). En revanche, la MT4-MMP n'augmente pas la réponse *in vitro* au Paclitaxel qui interfère avec l'internalisation et le recyclage à la membrane de la MT4-MMP [383]. La présence de la MT4-MMP sensibilise également les cellules tumorales à l'Erlotinib, comme le montrent nos expériences *in vivo* sur des xénogreffes et l'emploi de doses suboptimales d'Epirubicine et d'Erlotinib. Une réduction drastique de la prolifération est uniquement observée pour les tumeurs exprimant la MT4-MMP. Ces résultats indiquent que l'expression de la MT4-MMP sensibilise les cellules tumorales à des agents anti-cancéreux et à des thérapies ciblant l'EGFR. Ils apportent une nouvelle compréhension des résultats des essais cliniques utilisant des anti-EGFR qui se sont révélés décevants sur des patientes atteintes de TNBC, qu'ils soient utilisés en monothérapie ou en combinaison avec la chimiothérapie. De nouvelles questions apparaissent alors. Ces échecs sont-ils uniquement liés à un défaut de sélection des patientes ? Existe-t-il également des mécanismes de résistance qui pourraient être contournés ?

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons établi que près de la moitié des patientes atteintes de TNBC expriment simultanément l'EGFR, la MT4-MMP et Rb. Or, notre laboratoire avait démontré *in vitro* que la MT4-MMP majore la phosphorylation de Rb et sensibilise les cellules tumorales au Palbociclib. Ces constats nous ont incités à tester les inhibiteurs CDK4/6 en combinaison avec des anti-EGFR. Nous avons alors prouvé *in vivo* sur des xénogreffes transplantées avec des cellules MDA-MB-231 (exprimant l'EGFR et Rb) que l'expression de la MT4-MMP sensibilise les tumeurs à l'Erlotinib, au Palbociclib et plus encore à la combinaison Erlotinib-Palbociclib. Les xénogreffes n'exprimant que l'EGFR et Rb ne sont, en revanche, pas sensibles à ces traitements. Nous avons confirmé cette observation via le recours à des PDX-TNBC, modèle plus représentatif de la tumeur humaine. Notre travail permet de relancer l'intérêt antérieurement porté aux anti-EGFR dans le traitement des TNBC : il convient à la fois de mieux sélectionner les patientes pouvant en bénéficier et de les combiner à d'autres thérapies ciblées. Enfin, il est fondamental de considérer le nouvel intérêt de la MT4-MMP : outre le fait d'être une cible thérapeutique potentielle, elle peut être envisagée, avec l'EGFR et Rb, comme un trio moléculaire prédictif de réponse à d'autres thérapies ciblées.

La considération de la MT4-MMP comme « biomarqueur » prédictif de réponse à des thérapies ciblées est une découverte originale qui peut mener à reconsidérer l'ensemble des MMPs comme tel dans les TNBC et d'autres cancers dans lesquels elles sont surexprimées.

Discussion et perspectives

Il y a 30 ans, les MMPs apparaissaient comme des cibles thérapeutiques intéressantes qui ont suscité un élan de recherche fondamentale et le développement d'inhibiteurs synthétiques des MMPs (MMPi) par plusieurs firmes pharmaceutiques. En dépit de résultats encourageants dans les modèles précliniques, les inhibiteurs à large spectre des MMPs se sont révélés décevants dans les études cliniques. Plusieurs raisons permettent d'expliquer ces échecs [299, 335–339] :

- la représentation insuffisante des tumeurs humaines par les modèles précliniques en vigueur.
- l'utilisation d'inhibiteurs à large spectre dont la faible spécificité entraîne de lourds effets secondaires intolérables (douleurs et raideurs articulaires par inhibition de la MMP-1 et fibrose en conséquence).
- l'emploi de ces inhibiteurs dans des stades trop tardifs de la maladie alors qu'ils s'étaient avérés encourageants dans des stades plus précoces dans les modèles précliniques.
- l'ignorance des propriétés anti-tumorales de certaines MMPs qui ont également été inhibées.

Désormais, la compréhension bien plus fine des MMPs et de nouvelles techniques de génétique telles que la CRISPR-Cas9 (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crisper associated protein ») ouvrent de nouvelles perspectives pour cibler individuellement les MMPs. Le domaine catalytique est bien conservé parmi les différentes MMPs, ce qui rend difficile le développement d'inhibiteurs hautement spécifiques de l'une ou l'autre MMP. Cependant, il n'en est pas de même pour d'autres domaines des MMPs qui peuvent être relativement spécifiques des différentes MMPs et qui sont appelés les « exosites ». Des MMPi plus spécifiques ont alors été mis au point en ciblant ces exosites [299]. Ainsi de nouveaux inhibiteurs ont vu le jour. Dyax Corp® a développé le Dx-2400 dirigé contre la MMP-14 (MT1-MMP) [384]. Actuellement, c'est essentiellement la MMP-9 qui apparaît être une cible prometteuse avec déjà deux anticorps monoclonaux synthétisés et qui s'avèrent efficaces dans des xénogreffes de carcinomes colorectaux (AB0041 et AB0046). L'AB0041 a déjà sa version humanisée, le GS-5745 (Andecaliximab) qui à ce jour est le seul MMPi de nouvelle génération en essai clinique [385, 386]. Grâce à des techniques de séquençage des tumeurs de plus en plus poussées (comme le « single cell RNA sequencing »), il est probable qu'à l'avenir, le profilage de l'expression des MMPs d'une tumeur sera accessible et permettra de proposer au patient les MMPi sélectifs des MMPs défavorables les plus exprimées par sa tumeur. Notons qu'en ce qui concerne la MT4-MMP, les analyses au niveau ARN ne sont pas concluantes et il est impératif de la rechercher au niveau protéique [330]. La situation idéale serait alors de les tester avant le développement des métastases [299]. Afin de mimer cette situation prémétastatique, Winer et al. ont établi un modèle murin de TNBC agressif. Les souris ont été traitées pendant 7 jours après que la tumeur primaire soit devenue détectable, soit par un véhicule soit par le SD-7300, un inhibiteur spécifique des MMP-2, -9 et 13. Ils ont ensuite excisé la tumeur et sacrifié un mois plus tard les souris afin d'analyser la dissémination métastatique pulmonaire. Le traitement par SD-7300 conférait un avantage en survie des souris et réduisait significativement la dissémination métastatique soulignant l'importance de l'emploi des MMPi à un stade précoce [338]. Cependant, chez l'humain, de nombreuses micrométastases ne sont pas détectables et il est probable que l'on puisse en réalité uniquement

Discussion et perspectives

étudier l'impact des MMPi sur la DFS et le délai avant récurrence plutôt que sur le taux de récurrences.

L'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt des anticorps dirigés contre une MMP individuelle. Dans ce contexte, notre laboratoire développe plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre la MT4-MMP. Il convient maintenant de s'assurer de leur haut degré de spécificité et de leur absence de toxicité (notamment cardiovasculaire ou ostéoarticulaire).

Comme nous l'avons vu au chapitre 10 de l'introduction, alors que l'EGFR est exprimé dans 50 à 75% des TNBC, les essais cliniques employant, en monothérapie ou en combinaison avec la chimiothérapie, des TKI ou des anticorps monoclonaux anti-EGFR se sont avérés décevants. Nos travaux soulignent l'intérêt de reconsidérer les thérapies anti-EGFR dans le contexte des TNBC. Cependant, ces thérapies utilisées pour traiter d'autres types de cancers présentent des limites, notamment en raison de résistance intrinsèque ou acquise vis-à-vis des TKI. Différentes pistes ont été explorées pour comprendre ces limitations et certaines hypothèses doivent encore être évaluées :

- **les mutations de l'EGFR.** L'Erlotinib et le Géfinitib, TKI anti-EGFR de première génération, sont remboursés pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) métastatique en cas de mutation activatrice de l'EGFR soit par délétion de l'exon 19 soit par substitution L858R au niveau de l'exon 21 [387, 388]. Malheureusement une résistance aux traitements apparaît après quelques mois chez la plupart des patients et dans la moitié des cas, elle est attribuée à une mutation secondaire de l'EGFR par substitution de la thréonine par de la méthionine à la position 790 au niveau de l'exon 20 (T790M). L'Osimertinib, anti-EGFR de troisième génération, peut inhiber l'EGFR présentant cette mutation. Une résistance à l'Osimertinib peut cependant survenir en cas de mutation par substitution de la cystéine en position 797 par de la sérine (C797S) [389]. Dans les TNBC, les mutations de l'EGFR sont rares, présentes chez environ 10% des patientes. Il s'agit essentiellement de la délétion de l'exon 19 et de la mutation L858R. La mutation T790M a également été décrite par Bermanian et al. dans les cancers du sein sans qu'elle n'entraîne une activation constitutive de l'EGFR [390]. Dans les cas de TNBC présentant une mutation activatrice de l'EGFR, le rôle de la MT4-MMP ne serait pas fondamental, sachant que nos travaux montrent que l'activation de l'EGFR pourrait être amplifiée en présence de la MT4-MMP à la surface des cellules cancéreuses. Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que la MT4-MMP peut être internalisée et recyclée selon un mécanisme impliquant les protéines cdc42 et RhoA [320]. Il serait donc intéressant d'explorer son effet sur l'internalisation de l'EGFR, d'autant que cette internalisation pourrait influencer la réponse aux anticorps bloquant l'EGFR.
- **les mutations au niveau des voies de signalisation de l'EGFR.** Ces mutations ont été particulièrement bien décrites dans le cancer colorectal et rendent inutile l'emploi des anticorps monoclonaux anti-EGFR puisqu'elles sont activatrices et se situent en aval de l'EGFR. Il s'agit des mutations activatrices de NRAS/KRAS, de BRAF, de PI3K, d'Akt ou de mTOR. La perte de fonction de PTEN est également impliquée puisque cette protéine agit normalement comme rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR [391]. A nouveau, ces mutations sont fort rares dans les TNBC avec par exemple un taux

Discussion et perspectives

de mutations de *KRAS* variant de 0 à 7,7% suivant les études [392–395]. Nous avons démontré que l'activation de l'EGFR, en présence de la MT4-MMP, induit une inactivation de Rb selon une voie de signalisation qui n'a pas été identifiée. Il ne s'agit ni de la voie des MAPK ni de la voie PI3K/Akt/mTOR. L'exploration ultérieure de la voie de signalisation intermédiaire, conduisant à cette inactivation de Rb, devra mettre l'accent sur l'importance de cette voie et anticiper son rôle dans les mécanismes de résistance.

- **l'activation d'autres récepteurs tyrosine kinase.** Les voies de signalisation dépendantes de l'EGFR peuvent également être activées par d'autres récepteurs tyrosine kinase, et ce d'autant plus qu'ils sont surexprimés en cas d'amplification génique. Il s'agit d'une des voies de résistance aux traitements anti-EGFR dans le NSCLC. Ainsi, le récepteur à l'Hepatocyte Growth Factor (HGF), le récepteur MET, stimule la voie des PI3K/Akt par l'intermédiaire de l'activation de HER3 et rend l'Erlotinib et le Géfitinib inefficaces [396]. Le FGFR1 peut, via une boucle autocrine, activer les voies de signalisation PI3K/Akt/mTOR et MEK/ERK. Ce récepteur a été corrélé à des résistances au Géfitinib [397]. Ces pistes doivent encore être explorées dans les TNBC. Il conviendra également d'étudier le rôle de la MT4-MMP dans l'activation de FGFR1 ou de c-Met et d'investiguer l'éventuelle spécificité d'interaction de la MT4-MMP aux autres récepteurs tyrosine kinase.
- l'acquisition par les cellules cancéreuses d'un phénotype mésenchymateux au cours de **la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)**. Celle-ci entraîne une perte du phénotype épithélial des cellules cancéreuses (perte d'expression de marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine) qui acquièrent un phénotype plus mésenchymateux (expression de vimentine et de N-cadhérine) et sont dès lors moins sensibles à des thérapies efficaces contre les cancers épithéliaux, comme les anti-EGFR. En effet, en cas d'EMT, les voies de signalisation des MAPKineses, de l'Akt et du NF- κ B y sont activées essentiellement par l'AXL, un autre récepteur tyrosine kinase qui est alors surexprimé et rend l'Erlotinib inefficace. Il s'agit d'un des mécanismes de résistance aux traitements anti-EGFR dans les NSCLC [398]. Une boucle d'activation est observée en cas d'EMT, bien que non élucidée totalement, puisque la surexpression d'AXL repose sur la vimentine et que l'activation d'AXL favorise ensuite l'EMT [398]. L'AXL est surexprimé dans beaucoup de tumeurs solides et confère en général un mauvais pronostic [399, 400]. L'EMT est fréquente dans les TNBC et l'AXL y est d'ailleurs souvent surexprimé. L'emploi d'inhibiteurs AXL réduit l'acquisition d'un phénotype EMT par les cellules tumorales [401]. Chabottaux et al. ont montré une abondance de marquage de MT4-MMP dans les cellules épithéliales de tumeurs de cancer du sein [330]. En analysant les TNBC de notre biobanque et les PDX-issus de l'institut Marie Curie, nous avons observé que la MT4-MMP est exprimée en majorité dans le compartiment tumoral. Cependant, elle est également abondante dans certain cas au niveau du stroma. Il est fort probable qu'il s'agisse de cellules inflammatoires, sachant que les macrophages expriment la MT4-MMP. Cependant nous ne pouvons pas exclure une expression ou une extinction de son expression lors de l'EMT, d'autant que l'évolution de l'expression de la MT4-MMP dans les cellules cancéreuses au cours de ce processus n'a pas encore été explorée.

Discussion et perspectives

Devant l'absence de mécanismes de résistance largement partagés par les patientes, il est un fait que certaines patientes atteintes de TNBC pourraient répondre aux anti-EGFR disponibles. Ces patientes ne peuvent pas actuellement en bénéficier en raison d'une faible OS sur les populations entières de patientes des différents essais cliniques employant les anti-EGFR. Il est donc essentiel de déterminer quelles sont ces patientes qui pourraient être traitées par des médicaments déjà existants sans devoir attendre le développement de nouveaux traitements, ce qui prend en général une décennie. Plusieurs stratégies peuvent ainsi être envisagées :

- identifier les biomarqueurs associés aux mécanismes de résistances aux anti-EGFR et combiner les anti-EGFR avec d'autres inhibiteurs atténuant l'impact de ces mécanismes (fig 41) [402, 403]. Par exemple, Liu et al. ont observé une réponse importante *in vitro* et *in vivo* dans des xénogreffes de TNBC (lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-468) à la combinaison de TKI anti-EGFR (Lapatinib *in vitro*, Erlotinib *in vivo*) et d'un inhibiteur de mTOR, la Rapamycine alors que la réponse au seul TKI anti-EGFR est médiocre [404].
- identifier des biomarqueurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR. Ainsi, Savage et al. ont, via l'emploi de PDX-TNBC et de séquençage d'ARN en « single cell », identifié un sous-type « bon répondeur » de TNBC exprimant des taux élevés d'EGFR et appartenant au sous-type intrinsèque MSL. Ce sous-type possède des caractéristiques de cellules souches et un potentiel tumorigène et prométastatique [405]. Notre laboratoire a, lui, montré *in vitro* et *in vivo* l'intérêt de la combinaison de deux biomarqueurs, la MT4-MMP et l'EGFR, pour prédire la réponse aux anti-EGFR.

Une autre attitude envisageable serait de combiner les anti-EGFR avec d'autres modalités thérapeutiques que la seule chimiothérapie :

- ainsi, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* sur xénogreffes (transplantées avec des cellules MDA-MB-231) que l'inhibition de l'EGFR par le Lapatinib sensibilise les TNBC à l'ABT-888 (Véliparib), un PARPi. En effet, le Lapatinib induit une cassure double-brin mise à profit par le Véliparib par la suite. En outre, l'EGFR et BRCA1 peuvent former un complexe protéique qui est réduit en présence de Lapatinib. Enfin, le Lapatinib maintient l'EGFR et le BRCA1 dans le cytosol, à distance de leurs substrats nucléaires [406]. Par ailleurs, il a été prouvé que l'activation de la kinase c-Met mène à une phosphorylation de PARP, laquelle est impliquée dans la résistance aux PARPi. Or, c-Met et l'EGFR partagent de multiples voies de signalisation. Il est donc rationnel d'envisager que l'EGFR puisse participer à la résistance aux PARPi dans les TNBC et de tester en étude clinique la combinaison d'anti-EGFR et de PARPi [406].
- notre travail a montré que la combinaison de l'Erlotinib au Palbociclib est prometteuse pour les PDX-TNBC co-exprimant l'EGFR, la MT4-MMP et Rb. Nous n'avons actuellement pas mis en évidence le mécanisme impliqué entre la surface cellulaire et le noyau. Cette recherche fera assurément l'objet de travaux ultérieurs dans notre laboratoire.

Par ailleurs, une autre optique est de considérer l'EGFR comme une cible non pas pour l'emploi d'anti-EGFR mais pour l'utilisation d'ADC permettant de libérer des agents de chimiothérapie spécifiquement aux cellules exprimant l'EGFR via des anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR (fig 41). Des essais cliniques ayant recours à cette stratégie sont en cours dans les TNBC exprimant des taux élevés d'EGFR avec des chimiothérapies telles que la

Discussion et perspectives

Doxorubicine (NCT02833766, phase II) ou le MMAF (« monométhyl auristatin E ») combiné à l'anticorps anti-EGFR ABT-806 sous la forme de l'ADC ABBV-221 (NCT02365662, phase I incluant des cancers de différentes histologies) [403].

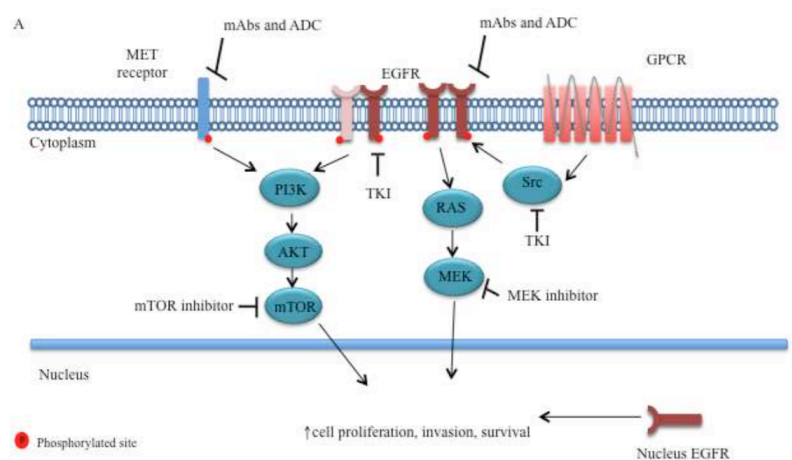


Fig 41 : Cibles potentielles sur les voies de l'EGFR pour le développement de thérapies contre les TNBC.

D'après Costa et al., 2017 [403].

Enfin, l'immunothérapie, avec les « checkpoint inhibiteurs », connaît un essor sans précédent en oncologie. Un grand nombre d'études cliniques sur la place de l'immunothérapie dans le traitement des TNBC sont en cours. Nous manquons encore actuellement de facteurs prédictifs de réponse aux « checkpoints inhibiteurs » qui soient largement validés et il semble également que la combinaison de l'immunothérapie avec d'autres modalités de traitements augmente les chances de réponse tumorale. Les traitements anti-EGFR et les inhibiteurs CDK4/6 pourraient y jouer un rôle de choix. Il apparaît ainsi que la réponse au Cétuximab de xénogreffes, dont le système immunitaire a été reconstitué et qui ont été transplantées avec une lignée de cellules de cancer du poumon, dépend de la réponse immune anti-tumorale médiée par les lymphocytes T [407]. Combiner des anti-EGFR avec des « checkpoint inhibiteurs » pour le traitement des TNBC représente donc une option intéressante à explorer, surtout en cas d'expression élevée de l'EGFR [402]. Comme mentionné aux pages 86 et 87, Teo et al. ont montré que la combinaison d'un inhibiteur de PI3K α (Alpelisib) et d'un inhibiteur Ribociclib (LEE011) permet de fortement inhiber la prolifération de TNBC dans des modèles précliniques (xénogreffes et PDX-TNBC). Par ailleurs, ils ont démontré *in vitro* que la combinaison majore l'immunogénicité intratumorale et la mort immunogénique. Ils l'ont donc testée sur le modèle murin syngénique AT3OVA. La combinaison y majore les réponses immunes antitumorales et l'expression de PD-1 et CTLA-4 à la surface des lymphocytes T. L'ajout de « checkpoint inhibiteurs » à leur combinaison sur le modèle AT3OVA avec une quadrithérapie (Alpelisib + Ribociclib + anti-PD-1 + anti-CTLA-4) a entraîné des résultats extrêmement encourageants puisqu'elle réduit la prolifération de toutes les tumeurs ainsi traitées (10/10) et qu'elle permet l'obtention d'une réponse de longue durée dans la moitié des cas. En effet, 5 des 10 tumeurs ainsi traitées sont encore en régression un an après arrêt du traitement, ce qui se traduit par une augmentation significative de survie des souris ainsi traitées [370].

Il serait intéressant de chercher une éventuelle majoration de l'immunogénicité dans un modèle préclinique immunocompétent avec la combinaison Erlotinib-Palbociclib et de définir si la MT4-MMP impacte cette immunogénicité. La co-expression de l'EGFR, de la MT4-MMP et de Rb pourrait alors permettre de traiter les patients par la combinaison Erlotinib-Palbociclib

Discussion et perspectives

à laquelle il serait possible d'ajouter des « checkpoint inhibiteurs ». Dans l'ensemble, notre travail ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques qui méritent de plus amples investigations.

Bibliographie

Bibliographie

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J cancer* 2015; 136: E359–E386.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87–108.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2019; 69: 7–30.
- [4] Pilleron S, Sarfati D, Janssen-Heijnen M, et al. Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study. *Int J Cancer* 2019; 144: 49–58.
- [5] Belgian Cancer Registry. Cancer Incidence Projections in Belgium 2015 to 2025, <https://www.kankerregister.org> (2017).
- [6] Belgian Cancer Registry. Cancer Burden in Belgium, <https://www.kankerregister.org> (2016).
- [7] Autier P, Boniol M, LaVecchia C, et al. Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: Retrospective trend analysis of WHO mortality database. *BMJ* 2010; 341: 1–7.
- [8] Allemani C, Weir HK, Carreira H, et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet* 2015; 385: 977–1010.
- [9] Belgian Cancer Registry. Cancer Survival in Belgium 2004–2008, <https://www.kankerregister.org> (2012).
- [10] Oeffinger KC, Fontham ETH, Etzioni R, et al. Breast Cancer Screening for Women at Average Risk 2015 Guideline Update From the American Cancer Society. *JAMA* 2015; 314: 1599–1614.
- [11] van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun S-S, et al. Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk. *Am J Epidemiol* 2000; 152: 514–527.
- [12] Nelson HD, Zakher B, Cantor A, et al. Risk Factors for Breast Cancer for Women Aged 40 to 49 Years. *Ann Intern Med* 2012; 635–648.
- [13] Ritte R, Lukanova A, Tjønneland A, et al. Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: A cohort study. *Int J Cancer* 2013; 132: 2619–2629.
- [14] Cronin KAC, Richardson LC, Henley SJ, et al. Vital signs: racial disparities in breast cancer severity—United States, 2005–2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2012; 61: 2–6.
- [15] Kerlikowske K, Ichikawa L, Miglioretti DL, et al. Longitudinal Measurement of Clinical Mammographic Breast Density to Improve Estimation of Breast Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 386–395.

Bibliographie

- [16] Gierach GL, Ichikawa L, Kerlikowske K, et al. Relationship between mammographic density and breast cancer death in the breast cancer surveillance consortium. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 1218–1227.
- [17] Yaghjyan L, Colditz GA, Collins LC, et al. Mammographic Breast Density and Subsequent Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women According To Tumor Characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 1179–1189.
- [18] Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, et al. Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1856–1865.
- [19] Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, et al. Body Mass Index, Serum Sex Hormones, and Breast Cancer Risk in Postmenopausal Women. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1218–1226.
- [20] Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, et al. Endogenous Steroid Hormone Concentrations and Risk of Breast Cancer Among Premenopausal Women. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1406–1415.
- [21] Fortner RT, Eliassen AH, Spiegelman D. Premenopausal endogenous steroid hormones and breast cancer risk : results. *Breast Cancer Res* 2013; 15: 1–11.
- [22] Chen Z, Arendell L, Aickin M, et al. Hip bone density predicts breast cancer risk independently of Gail score. *Cancer* 2008; 113: 907–915.
- [23] Qu X, Zhang X, Qin A, et al. Bone mineral density and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 138: 261–271.
- [24] Dorgan JF, Stanczyk FZ, Kahle LL, et al. Prospective case-control study of premenopausal serum estradiol and testosterone levels and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 2010; 12: 1–8.
- [25] Yager JD, Davidson NE. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2006; 354: 270–282.
- [26] Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: Pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol* 2010; 11: 530–542.
- [27] Wolf I, Sadetzki S, Catane R, et al. Diabetes mellitus and breast cancer. *Lancet Oncol* 2008; 9: 103–111.
- [28] Gunter MJ, Hoover DR, Yu H, et al. Insulin, Insulin-like growth factor-I, and Risk of Breast cancer in Postmenopausal Women. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 48–60.
- [29] Hoover RH, Hyer M, Pfeiffer RM, et al. Adverse Health Outcomes in Women Exposed In Utero to Diethylstilbestrol. *N Engl J Med* 2011; 365: 1304–1314.
- [30] Verloop J, Van Leeuwen FE, Helmerhorst TJM, et al. Cancer risk in DES daughters. *Cancer Causes Control* 2010; 21: 999–1007.

Bibliographie

- [31] Han X, Stevens J, Truesdale KP, et al. Body mass index at early adulthood, subsequent weight change and cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 2014; 135: 2900–2909.
- [32] Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, et al. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2016; 375: 794–798.
- [33] Colditz GA, Rosner B. Cumulative Risk of Breast Cancer to Age 70 Years According to Risk Factor Status: Data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 2000; 152: 950–964.
- [34] Bruzzi P, Negri E, La Vecchia C, et al. Short term increase in risk of breast cancer after full term pregnancy. *Bmj* 1988; 297: 1096–1098.
- [35] Prentice RL, Caan B, Chlebowski RT, et al. Low-Fat Dietary Pattern and Risk of Invasive Breast Cancer. *Jama* 2006; 295: 629–642.
- [36] Modan B, Ron E, Lerner-Geva L, et al. Cancer Incidence in a Cohort of Infertile Women. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 1038–1042.
- [37] Kaunitz AM, Pinkerton JA V., Manson JAE. Hormonal contraception and risk of breast cancer: A closer look. *Menopause* 2018; 25: 477–479.
- [38] Marjoribanks J, Farquhar C, Roberts H, et al. Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women (Review). *Cochrane database Syst Rev* 2017, <https://www.cochranelibrary.com> (2017).
- [39] Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 229–237.
- [40] Nichols HB, De González AB, Lacey J V., et al. Declining incidence of contralateral breast cancer in the United States from 1975 to 2006. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1564–1569.
- [41] Mcpherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321: 624–628.
- [42] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358: 1389–1399.
- [43] Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes A-M, et al. Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics. *Breast Cancer Basic Clin research* 2014; 8: 145–155.
- [44] Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21: 134–147.
- [45] Hirko KA, Chen WY, Willett WC, et al. Alcohol consumption and risk of breast cancer by molecular subtype: Prospective analysis of the nurses' health study after 26 years of follow-up. *Int J Cancer* 2016; 138: 1094–1101.

Bibliographie

- [46] Schütze M, Boeing H, Pischon T, et al. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. *BMJ* 2011; 342: 1–10.
- [47] Gram IT, Park SY, Kolonel LN, et al. Smoking and risk of breast cancer in a racially/ethnically diverse population of mainly women who do not drink alcohol the MEC Study. *Am J Epidemiol* 2015; 182: 917–925.
- [48] Schernhammer ES, Hankinson SE. Urinary melatonin levels and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1084–1087.
- [49] Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, et al. Surveillance for Breast Cancer in Women Treated with Chest Radiation for a Childhood, Adolescent or Young Adult Cancer: A Report from the Children’s Oncology Group. *Ann Intern Med* 2010; 152: 444–455.
- [50] Pukkala E, Kesminiene A, Poliakov S, et al. Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident. *Int J Cancer* 2006; 119: 651–658.
- [51] Pijpe A, Andrieu N, Easton DF, et al. Exposure to diagnostic radiation and risk of breast cancer among carriers of BRCA1/2 mutations: Retrospective cohort study (GENE-RAD-RISK). *BMJ* 2012; 345: 1–15.
- [52] Chen WY. Factors that modify breast cancer risk in women (last updated in March 2019), <https://www.uptodate.com>.
- [53] Chowdhury R, Sinha B, Sankar MJ, et al. Breastfeeding and maternal health outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr* 2015; 104: 96–113.
- [54] Pizot C, Boniol M, Mullie P, et al. Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer* 2016; 52: 138–154.
- [55] Irwin ML, Varma K, Alvarez-Reeves M, et al. Randomized Controlled Trial of Aerobic Exercise on Insulin and Insulin-like Growth Factors in Breast Cancer Survivors: The Yale Exercise and Survivorship Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 306–313.
- [56] Fentiman IS, D’Arrigo C. Pathogenesis of breast carcinoma. *Int J Clin Pract* 2004; 58: 35–40.
- [57] Estourgie SH, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, et al. Lymphatic Drainage Patterns from the Breast. *Ann Surg* 2004; 239: 232–237.
- [58] Rivenbark AG, O’Connor SM, Coleman WB. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer. *Am J Pathol* 2013; 183: 1113–1124.
- [59] Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93: 1046–1052.
- [60] Abner A, Connolly J, Recht A, et al. The Relation between the Presence and Extent of Lobular Carcinoma In Situ and the Risk of Local Recurrence for Patients with Infiltrating Carcinoma of the Breast Treated with Conservative Surgery and Radiation

Bibliographie

- Therapy. *Cancer* 2000; 88: 1072–1077.
- [61] Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, et al. Crosstalk between the Estrogen Receptor and the HER Tyrosine Kinase Receptor Family: Molecular Mechanism and Clinical Implications for Endocrine Therapy Resistance. *Endocr Rev* 2008; 29: 217–233.
- [62] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.
- [63] Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; 26: v8–v30.
- [64] Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, et al. The benefits and harms of breast cancer screening: An independent review. *Lancet* 2012; 380: 1778–1786.
- [65] Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, et al. Breast-Cancer Screening — Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2015; 372: 2353–2358.
- [66] Welch HG, Prorok PC, O’Malley AJ, et al. Breast-Cancer Tumor Size, Overdiagnosis, and Mammography Screening Effectiveness. *N Engl J Med* 2016; 375: 1438–1447.
- [67] Gøtzsche PC JK. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev* 2013, <https://www.cochranelibrary.com> (2013).
- [68] Perry N, Broeders M, de Wolf C, et al. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition - Summary document. *Ann Oncol* 2008; 19: 614–622.
- [69] Pisano ED, Gatsonis C, Hendrick E, et al. Diagnostic Performance of Digital versus Film Mammography for Breast-Cancer Screening. *N Engl J Med* 2005; 353: 1773–1783.
- [70] Bleyer A, Welch HG. Effect of Three Decades of Screening Mammography on Breast-Cancer Incidence. *N Engl J Med* 2012; 367: 1998–2005.
- [71] Bleyer A, Baines C, Miller AB. Impact of screening mammography on breast cancer mortality. *Int J Cancer* 2016; 138: 2003–2012.
- [72] Esserman LJ, Shieh Y, Rutgers EJT, et al. Impact of mammographic screening on the detection of good and poor prognosis breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130: 725–734.
- [73] Venkatesan A, Chu P, Kerlikowske K, et al. Positive Predictive Value of Specific Mammographic Findings according to Reader and Patient Variables. *Radiology* 2009; 250: 648–657.
- [74] D’Orsi C, Sickles EA, Mendelson E, et al. Breast Imaging Reporting and Data System, 5th ed. *Am Coll Radiol*.
- [75] Stavros A, Thickman D, Rapp C, et al. Solid Breast Nodules: Use of Sonography to Distinguish between Benign and Malignant Lesions. *Radiology* 1995; 196: 123–124.
- [76] Elston CW, Ellis O. Pathological prognostic factors in breast cancer . I . The value of

Bibliographie

- histological grade in breast cancer : experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403–410.
- [77] Singletary BSE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. 2002; 20: 3628–3636.
- [78] Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2784–2795.
- [79] Cronin M, Pho M, Dutta D, et al. Measurement of Gene Expression in Archival Paraffin-Embedded Tissues Development and Performance of a 92-Gene Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay. *Am J Pathol* 2004; 164: 35–42.
- [80] Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among Gene-Expression– Based Predictors for Breast Cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 560–569.
- [81] Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer : American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. 2013; 31: 3997–4014.
- [82] Parise CA, Bauer KR, Brown MM, et al. Breast Cancer Subtypes as Defined by the Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), and the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) among Women with Invasive Breast Cancer in California, 1999–2004. *Breast J* 2009; 2: 593–602.
- [83] O’Brien KM, Cole SR, Tse C, et al. Intrinsic Breast Tumor Subtypes , Race , and Long-Term Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 6100–6111.
- [84] Dowsett M, Nielsen TO, A’Hern R, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer : Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 1656–1664.
- [85] Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747–752.
- [86] Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 2001; 98: 10869–10874.
- [87] Sørli T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS* 2003; 100: 8418–8423.
- [88] Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010; 12: 1–18.
- [89] Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, et al. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol* 2007; 8: R157.1-R157.16.

Bibliographie

- [90] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes — dealing with the diversity of breast cancer : highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011; 22: 1736–1747.
- [91] TCGA (The Cancer Genome Atlas Network). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490: 61–70.
- [92] Hortobagyi GN, Edge SB, Giuliano A. New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. *ASCO Educ B* 2018; 457–467.
- [93] Robertson IJ, Hand F, Kell MR. FDG-PET/CT in the staging of local/regional metastases in breast cancer. *Breast* 2011; 20: 491–494.
- [94] Gospodarowicz, Christian Wittekind JB. *TNM Classification des Tumeurs Malignes*. 2018.
- [95] Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *Oncologist* 2004; 9: 606–616.
- [96] G.Febbo P, Ladanyi M, D.Aldape K, et al. NCCN Task Force Report: Evaluating the Clinical Utility of Tumor Markers in Oncology. *J Natl Compr Cancer Netw* 2011; 9: S1–S32.
- [97] Carcinoma T of E-SBC. Treatment of Early-Stage Breast Cancer Carcinoma. *JAMA* 1991; 265: 391–395.
- [98] Fredholm H, Eaker S, Frisell J, et al. Breast Cancer in Young Women: Poor Survival Despite Intensive Treatment. *PLoS One* 2009; 4: e7695 1-9.
- [99] Partridge AH, Hughes ME, Warner ET, et al. Subtype-dependent relationship between young age at diagnosis and breast cancer survival. *J Clin Oncol* 2016; 34: 3308–3314.
- [100] Bastiaannet E, Liefers GJ, de Craen AJM, et al. Breast cancer in elderly compared to younger patients in the Netherlands: stage at diagnosis, treatment and survival in 127,805 unselected patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 124: 801–807.
- [101] Water W Van De, Rea D, Craen AJM De, et al. Association Between Age at Diagnosis and Disease-Specific Mortality Among Postmenopausal Women WithHormoneReceptor–Positive BreastCancer. *JAMA* 2012; 307: 590–597.
- [102] Swain SM, Jeong J-H, Geyer CE, et al. Longer Therapy, Iatrogenic Amenorrhea, and Survival in Early Breast Cancer Sandra. *N Engl J Med* 2010; 362: 2053–2065.
- [103] Silber JH, Rosenbaum PR, Clark AS, et al. Characteristics Associated With Differences in Survival Among Black and White Women With Breast Cancer. *JAMA* 2013; 310: 389–397.
- [104] Killelea BK, Yang VQ, Wang SY, et al. Racial Differences in the Use and Outcome of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Results From the National Cancer Database. *J Clin Oncol* 2015; 33: 4267–4276.
- [105] Keenan T, Moy B, Mroz EA, et al. Comparison of the Genomic Landscape Between

Bibliographie

- Primary Breast Cancer in African American Versus White Women and the Association of Racial Differences With Tumor Recurrence Tanya. *J Clin Oncol* 2015; 33: 3621–3627.
- [106] Passarelli MN, Newcomb PA, Hampton JM, et al. Cigarette Smoking Before and After Breast Cancer Diagnosis: Mortality From Breast Cancer and Smoking-Related Diseases. *J Clin Oncol* 2016; 34: 1315–1322.
- [107] Noone A, Howlander N, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2015. *Natl Cancer Inst*, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/ (2018).
- [108] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials Early. *Lancet* 2005; 365: 1687–1717.
- [109] De Boer M, Van Dijk JAAM, Bult P, et al. Breast cancer Prognosis and Occult lymph Node Metastases, isolated tumor cells, and Micrometastases. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 410–425.
- [110] Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, et al. Prognostic significance of nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3153–3158.
- [111] Chu KC, Anderson WF, Fritz A, et al. Frequency distributions of breast cancer characteristics classified by estrogen receptor and progesterone receptor status for eight racial/ethnic groups. *Cancer* 2001; 92: 37–45.
- [112] Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, et al. DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients Charlotte. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 28: 9–20.
- [113] Falette N, Paperin MP, Treilleux I, et al. Prognostic Value of P53 Gene Mutations in a Large Series of Node-negative Breast Cancer Patients. *Cancer Res* 1998; 58: 1451–1455.
- [114] Ferrero-potis M, Hacène K, Bouchet C, et al. Relationship between c-erbB-2 and Other Tumor Characteristics in. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4745–4754.
- [115] Pawlowski V, Révillion F, Hebbar M, et al. Prognostic Value of the Type I Growth Factor Receptors in a Large Series of Human Primary Breast Cancers Quantified with a Real- Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4217–4225.
- [116] Insa A, Lluch A, Prosper F, et al. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 56: 67–78.
- [117] Park S, Koo JS, Kim MS, et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast* 2012; 21: 50–57.
- [118] Colleoni M, Sun Z, Price KN, et al. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer

Bibliographie

- Study Group Trials I to V. *J Clin Oncol* 2016; 34: 927–935.
- [119] Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, et al. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: A population-based study. *Br J Cancer* 2014; 110: 565–572.
- [120] Thakkar JP, Mehta DG. A Review of an Unfavorable Subset of Breast Cancer: Estrogen Receptor Positive Progesterone Receptor Negative. *Oncologist* 2011; 16: 276–285.
- [121] Gusterson B, Gelber R, Goldhirsch A, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. 1992; 1049–1056.
- [122] Chia S, Norris B, Speers C, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Overexpression As a Prognostic Factor in a Large Tissue Microarray Series of Node-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5697–5704.
- [123] Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, et al. Distinct Clinical and Prognostic Features of Infiltrating Lobular Carcinoma of the Breast: Combined Results of 15 International Breast Cancer Study Group Clinical Trials. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3006–3014.
- [124] Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014; 384: 164–172.
- [125] Ejlertsen B, Jensen M, Rank F, et al. Population-Based Study of Peritumoral Lymphovascular Invasion and Outcome Among Patients With Operable Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 729–735.
- [126] De Azambuja E, Cardoso F, De Castro G, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96: 1504–1513.
- [127] Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, et al. Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* 2008; 17: 323–334.
- [128] Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5287–5312.
- [129] Weissenbacher TM, Zschage M, Janni W, et al. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: Is the tumor-node-metastasis classification justified? *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122: 27–34.
- [130] Lynch SP, Lei X, Chavez-Macgregor M, et al. Multifocality and multicentricity in breast cancer and survival outcomes. *Ann Oncol* 2012; 23: 3063–3069.
- [131] Harris LN, Ismaila N, McShane LM, et al. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2016; 34: 1134–1150.

Bibliographie

- [132] Dubsy P, Brase JC, Jakesz R, et al. The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2-breast cancer patients. *Br J Cancer* 2013; 109: 2959–2964.
- [133] Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1160–1167.
- [134] Nielsen TO, Parker JS, Leung S, et al. A Comparison of PAM50 Intrinsic Subtyping with Immunohistochemistry and Clinical Prognostic Factors in Tamoxifen-Treated Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5222–5232.
- [135] Goetz MP, Gradishar WJ, Anderson BO, et al. Breast cancer, version 3.2018. *J Natl Compr Cancer Netw* 2019; 17: 118–126.
- [136] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011; 378: 771–784.
- [137] Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2011; 365: 1273–1283.
- [138] Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Numb Er 11 Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody Against Her2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783–792.
- [139] Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012; 367: 1783–91.
- [140] Baselga J, Cortés J, Kim S-B, et al. New England Journal Medicine. *N Engl J Med* 2008; 366: 109–119.
- [141] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: Meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 2012; 379: 432–444.
- [142] Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology Guideline Recommendations for Sentinel Lymph Node Biopsy in Early-Stage Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7703–7720.
- [143] Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 927–933.
- [144] Donker M, van Tienhoven G, Straver M, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 1303–1310.
- [145] Poortmans PM, Collette S, Kirkove C, et al. Internal Mammary and Medial Supraclavicular Irradiation in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 317–327.

Bibliographie

- [146] Whelan TJ, Olivotto IA, Parulekar WR, et al. Regional Nodal Irradiation in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 307–316.
- [147] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: Meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet* 2014; 383: 2127–2135.
- [148] Odermatt R, Wolfer A, Zaman K. Hormonothérapie dans le cancer du sein : efficacité et effets adverses. *Rev Med Suisse* 2013; 9: 1090–1094.
- [149] Davies C, Pan H, Godwin J, et al. 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* 2013; 381: 805–816.
- [150] Francis PA, Regan MM, Fleming GF, et al. Adjuvant Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med* 2015; 372: 436–46.
- [151] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: Patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* 2015; 386: 1341–1352.
- [152] Goss PE, Ingle JN, Pritchard KI, et al. Extending Aromatase-Inhibitor Adjuvant Therapy to 10 Years. *N Engl J Med* 2016; 375: 209–219.
- [153] Moja L, Tagliabue G, Balduzzi S, et al. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2012.
- [154] Pivot X, Romieu G, Debled M, et al. 6 months versus 12 months of adjuvant trastuzumab for patients with HER2-positive early breast cancer (PHARE): A randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 741–748.
- [155] Mavroudis D, Saloustros E, Malamos N, et al. Six versus 12 months of adjuvant trastuzumab in combination with dose-dense chemotherapy for women with HER2-positive breast cancer: a multicenter randomized study by the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Ann Oncol* 2015; 26: 1333–1340.
- [156] Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-gebhart MJ, et al. 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label , randomised controlled trial. *Lancet* 2013; 382: 1021–1028.
- [157] von Minckwitz G, Procter M, De Azambuja E, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2017; 377: 122–131.
- [158] Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015; 26: 1533–1546.
- [159] Cardoso F, Senkus E, Costa A, et al. 4th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 4). *Ann Oncol* 2018; 29: 1634–1657.
- [160] Swain SM, Baselga J, Kim S-B, et al. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in

Bibliographie

- HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 2015; 372: 724–734.
- [161] Krop IE, Kim SB, González-Martín A, et al. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 689–699.
- [162] Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 2733–2743.
- [163] Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 2108–2121.
- [164] Yang XR, Sherman ME, Rimm DL, et al. Differences in Risk Factors for Breast Cancer Molecular Subtypes in a Population-Based Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 439–443.
- [165] Bauer KR, Brown M, Cress RD, et al. Descriptive Analysis of Estrogen Receptor (ER)-Negative, Progesterone Receptor (PR)-Negative, and HER2-Negative Invasive Breast Cancer, the So-called Triple-Negative Phenotype. *Cancer* 2007; 109: 1721–1728.
- [166] Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes Control* 2009; 20: 1071–1082.
- [167] Carey LA, Perou CM, Livasy C, et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006; 295: 2492–2502.
- [168] Millikan RC, Newman B, Tse C, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 109: 123–139.
- [169] Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, et al. Incidence and Outcome of BRCA Mutations in Unselected Patients with Triple Receptor-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 1082–1089.
- [170] Hartman AR, Kaldate RR, Sailer LM, et al. Prevalence of BRCA Mutations in an Unselected Population of Triple-Negative Breast Cancer Anne-Renee. *Cancer* 2012; 118: 2787–2795.
- [171] Network NCC. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. *NCCN Clin Pract Guidel Oncol*, <https://www.nccn.org> (2019).
- [172] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-Negative Breast Cancer : Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4429–4435.
- [173] Collett K, Stefansson IM, Eide J, et al. A Basal Epithelial Phenotype Is More Frequent in Interval Breast Cancers Compared with Screen Detected Tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1108–1113.
- [174] von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J, et al. Definition and Impact of Pathologic Complete Response on Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy in Various Intrinsic Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1796–1804.
- [175] Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, et al. Clinicopathological Features, Patterns of

Bibliographie

- Recurrence, and Survival Among Women With Triple-Negative Breast Cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer* 2012; 118: 5463–5472.
- [176] Smid M, Wang Y, Zhang Y, et al. Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Res* 2008; 68: 3108–3115.
- [177] Lin NU, Claus E, Sohl J, et al. Sites of Distant Relapse and Clinical Outcomes in Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: High Incidence of Central Nervous System Metastases. *Cancer* 2008; 113: 2638–2645.
- [178] Gobbini E, Ezzalfani M, Bachelot T, et al. Time trends of overall survival among metastatic breast cancer patients in the real-life ESME cohort Elisa. *Eur J Cancer* 2018; 96: 17–24.
- [179] Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, et al. Molecular Classification and Molecular Forecasting of Breast Cancer : Ready for Clinical Application ? *J Clin Oncol* 2005; 23: 7350–7360.
- [180] Turner NC, Reis-filho JS. Tackling the Diversity of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 6380–6389.
- [181] Pareja F, Geyer FC, Marchiò C, et al. Triple-negative breast cancer : the importance of molecular and histologic subtyping , and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer* 2016; eCollection.
- [182] Garrido-castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer : Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov* 2019; 9: 176–198.
- [183] Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011; 121: 2750–2767.
- [184] Lehmann BD, Jovanovic B, Chen X, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes : Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* 2016; 11: e0157368.
- [185] Masuda H, Baggerly K, Wang Y, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5533–5540.
- [186] Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, et al. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 1688–1699.
- [187] Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, et al. Phase II Trial of Bicalutamide in Patients with Androgen Receptor – Positive , Estrogen Receptor – Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5505–5512.
- [188] Traina TA, Miller K, Yardley DA, et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor – Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2018; 36: 884–890.

Bibliographie

- [189] Bonnefoi H, Grellety T, Tredan O, et al. A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). *Ann Oncol* 2016; 812–818.
- [190] Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res* 2014; 16: 406 1–14.
- [191] Millis SZ, Gatalica Z, Winkler J, et al. Predictive Biomarker Profiling of > 6000 Breast Cancer Patients Shows Heterogeneity in TNBC, With Treatment Implications. *Clin Breast Cancer* 2015; 15: 473–481.
- [192] Asghar US, Barr AR, Cutts R, et al. Single-Cell Dynamics Determines Response to CDK4/6 Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 5561–5573.
- [193] Tredan O, Reslan L. Les anticorps conjugués Antibody drug conjugates in oncology. *La Lett du cancérologue* 2012; XXI: 274–278.
- [194] Modi S, Pusztai L, Forero A, et al. Abstract PD3-14: phase 1 study of the antibody–drug conjugate SGN-LIV1A in patients with heavily pretreated triple-negative meta- static breast cancer. *Cancer Res* 2018; 78,SABCS17: PD3-14.
- [195] Bardia A, Mayer IA, Vahdat LT, et al. Sacituzumab Govitecan-hziy in Refractory Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2019; 380: 741–751.
- [196] Balko JM, Giltneane JM, Wang K, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov* 2014; 4: 232–245.
- [197] Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; 434: 917–921.
- [198] Tutt A, Tovey H, Cheang MCU, et al. A randomised phase III trial of carboplatin compared with docetaxel in BRCA1/2 mutated and pre-specified triple negative breast cancer “BRCAness” subgroups: the TNT Trial. *Nat Med* 2018; 24: 628–637.
- [199] Robson M, Im S-A, Senkys E, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline. *N Engl J Med* 2017; 377: 523–533.
- [200] Litton JK, Rugo HS, Ettl J, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline. *N Engl J Med* 2018; 379: 753–763.
- [201] Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of ‘BRCAness’ in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 814–819.
- [202] Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 105–113.
- [203] Adams S, Gray RJ, Demaria S, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized

Bibliographie

- Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2959–2966.
- [204] Emens LA, Cruz C, Eder JP, et al. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncol* 2019; 5: 74–82.
- [205] Dieci M V, Criscitiello C, Goubar A, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer : a retrospective multicenter study. *Ann Oncol* 2014; 25: 611–618.
- [206] Emens LA, Middleton G. The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy : Harnessing Potential Synergies. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 436–444.
- [207] Mittendorf EA, Philips A V, Meric-bernstam F, et al. PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Immunol Res* 2014; 2: 361–370.
- [208] Emens LA, Loi S, Rugo HS, et al. Abstract GS1-04: IMpassion130: Efficacy in immune biomarker subgroups from the global, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of atezolizumab + nab-paclitaxel in patients with treatment-naïve, locally advanced or metastatic triple-n. 2019; 79,SABCS18: GS1-04.
- [209] Kwa MJ, Adams S. Checkpoint Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): Where To Go From Here. *Cancer* 2018; 124: 2086–2103.
- [210] Roll JD, Rivenbark AG, Sandhu R, et al. Dysregulation of the epigenome in triple-negative breast cancers: Basal-like and claudin-low breast cancers express aberrant DNA hypermethylation. *Exp Mol Pathol* 2013; 95: 276–287.
- [211] Shu S, Lin CY, He HH, et al. Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple negative breast cancer. *Nature* 2016; 529: 413–417.
- [212] Arteaga CL, Engelman JA. ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics. *Cancer Cell* 2014; 25: 282–303.
- [213] Kovacs E, Zorn JA, Huang Y, et al. A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annu Rev Biochem* 2015; 84: 739–764.
- [214] Yarden Y, Pines G. The ERBB network: At last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 553–563.
- [215] Adamczyk KA, Klein-Scory S, Moradian Tehrani M, et al. Characterization of soluble and exosomal forms of the EGFR released from pancreatic cancer cells. *Life Sci* 2011; 89: 304–312.
- [216] Maramotti S, Paci M, Miccichè F, et al. Soluble epidermal growth factor receptor isoforms in non-small cell lung cancer tissue and in blood. *Lung Cancer* 2012; 76: 332–338.
- [217] Wilken JA, Perez-Torres M, Nieves-Alicea R, et al. Shedding of Soluble Epidermal Growth Factor Receptor (sEGFR) Is Mediated by a Metalloprotease/Fibronectin/Integrin Axis and Inhibited by Cetuximab. *Biochemistry* 2013; 52: 4531–4540.

Bibliographie

- [218] Maramotti S, Paci M, Manzotti G, et al. Soluble Epidermal Growth Factor Receptors (sEGFRs) in Cancer: Biological Aspects and Clinical Relevance. *Int J Mol Sci* 2016; 17: E593 1-12.
- [219] Peles E, Yarden Y. Neu and its ligands: From an Oncogene to Neural Factors. *BioEssays* 1993; 15: 815–824.
- [220] Riese DJ, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays* 1998; 20: 41–48.
- [221] Hubert P. Les facteurs de croissance “ EGF “ et leurs récepteurs. *Bull Cancer* 2006; Hors série: 17–24.
- [222] Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 2003; 284: 2–13.
- [223] Zeng F, Harris RC. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 28: 2–11.
- [224] Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003; 284: 99–110.
- [225] Higashiyama S, Abraham JA, Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like Growth Factor Stimulation of Smooth Muscle Cell Migration: Dependence on Interactions with Cell Surface Heparan Sulfate. *J Cell Biol* 1993; 122: 933–940.
- [226] Borrell-Pagès M, Rojo F, Albanell J, et al. TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *EMBO J* 2003; 22: 1114–1124.
- [227] Dempsey PJ, Garton K, Raines E. Emerging Roles of TACE as a Key Protease in ErbB Ligand Shedding. *Mol Interv* 2002; 2: 136–141.
- [228] Sahin U, Weskamp G, Kelly K, et al. Distinct Roles for ADAM10 and ADAM17 in Ectodomain Shedding of Six EGFR Ligands. 2011; 164: 769–779.
- [229] Anklesaria P, Teixido J, Laiho M, et al. Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor α to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation. *PNAS* 1990; 87: 3289–3293.
- [230] Inui S, Higashiyama S, Hashimoto K, et al. Possible role of coexpression of CD9 with membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth. *J Cell Physiol* 1997; 171: 291–298.
- [231] Iwamoto R, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor : a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 335–344.
- [232] Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 2005; 17: 1183–1193.
- [233] Singh AB, Sugimoto K, Harris RC. Juxtacrine Activation of Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor by Membrane-anchored Heparin-binding EGF-like Growth Factor Protects Epithelial Cells from Anoikis While Maintaining an Epithelial Phenotype. *J Biol Chem* 2007; 282: 32890–32901.

Bibliographie

- [234] Tada H, Sasada R, Kawaguchi Y, et al. Processing and Juxtacrine Activity of Membrane-Anchored Betacellulin. *J Cell Biochem* 1999; 72: 423–434.
- [235] Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: The biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003; 284: 54–65.
- [236] Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, et al. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: Implications for cancer. *Pharmacol Ther* 2009; 122: 1–8.
- [237] Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* 2014; 79: 34–74.
- [238] Seshacharyulu P, Ponnusamy M, Haridas D, et al. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16: 15–31.
- [239] Marotta LLC, Almendro V, Marusyk A, et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44(+)CD24(-) stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest* 2011; 121: 2723–2735.
- [240] Zhu H, Cao X, Ali-Osman F, et al. EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocation of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity. *Cancer Lett* 2010; 294: 101–110.
- [241] Weihua Z, Tsan R, Huang WC, et al. Survival of Cancer Cells Is Maintained by EGFR Independent of Its Kinase Activity. *Cancer Cell* 2008; 13: 385–393.
- [242] Han W, Lo HW. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: Biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett* 2012; 318: 124–134.
- [243] Jones S, Rappoport JZ. Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 51: 23–28.
- [244] Balbis A, Posner BI. Compartmentalization of EGFR in Cellular Membranes: Role of Membrane Rafts. *J Cell Biochem* 2010; 109: 1103–1108.
- [245] Henriksen L, Grandal MV, Knudsen SLJ, et al. Internalization Mechanisms of the Epidermal Growth Factor Receptor after Activation with Different Ligands. *PLoS One* 2013; 8: e58148 1-12.
- [246] Sigismund S, Woelk T, Puri C, et al. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *PNAS* 2005; 102: 2760–2765.
- [247] Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, et al. Clathrin-Mediated Internalization Is Essential for Sustained EGFR Signaling but Dispensable for Degradation. *Dev Cell* 2008; 15: 209–219.
- [248] Sigismund S, Algisi V, Nappo G, et al. Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate. *EMBO J* 2013; 32: 2140–2157.
- [249] Waterman H, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett* 2001; 490: 142–152.

Bibliographie

- [250] Sorkin A. Internalization of the epidermal growth factor receptor : role in signalling. *Biochem Soc* 2001; 29: 480–484.
- [251] Mosesson Y, Shtiegman K, Katz M, et al. Endocytosis of Receptor Tyrosine Kinases Is Driven by Monoubiquitylation, Not Polyubiquitylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 21323–21326.
- [252] Duan L, Miura Y, Dimri M, et al. Cbl-mediated Ubiquitylation Is Required for Lysosomal Sorting of Epidermal Growth Factor Receptor but Is Dispensable for Endocytosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 28950–28960.
- [253] Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, et al. Ubiquitin Ligase Activity and Tyrosine Phosphorylation Underlie Suppression of Growth Factor Signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 1999; 4: 1029–1040.
- [254] Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, et al. Differential Effects of EGFR Ligands on Endocytic Sorting of the Receptor. *Traffic* 2009; 10: 1115–1127.
- [255] Brand TM, Iida M, Li C, et al. The Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network and its Role in Cancer. *Discov Med* 2011; 12: 419–32.
- [256] Lin S-Y, Makino K, Xia W, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 802–808.
- [257] Hanada N, Lo HW, Day CP, et al. Co-regulation of B-Myb Expression by E2F1 and EGF Receptor. *Mol Carcinog* 2006; 45: 10–17.
- [258] Jaganathan S, Yue P, Paladino DC, et al. A Functional Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor, Src and Stat3 Heteromeric Complex in Pancreatic Cancer Cells. *PLoS One* 2011; 6: e19605 1-13.
- [259] Lo H-W, Cao X, Zhu H, et al. Cyclooxygenase-2 Is a Novel Transcriptional Target of the Nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 Signaling Axes. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 232–245.
- [260] Dittmann KH, Mayer C, Ohneseit PA, et al. Celecoxib Induced Tumor Cell Radiosensitization by Inhibiting Radiation Induced Nuclear EGFR Transport and DNA-Repair: A COX-2 Independent Mechanism. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70: 203–212.
- [261] Hsu SC, Miller SA, Wang Y, et al. Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *Am J Transl Res* 2009; 1: 249–258.
- [262] Wang SC, Nakajima Y, Yu YL, et al. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1359–1368.
- [263] Demory ML, Boerner JL, Davidson R, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Translocation to the Mitochondria. *J Biol Chem* 2009; 284: 36592–36604.
- [264] Cao X, Zhu H, Ali-Osman F, et al. EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocalization: A potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis. *Mol Cancer* 2011; 10: 1–13.

Bibliographie

- [265] Prenzel N, Zwick E, Daub H, et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 1999; 402: 884–888.
- [266] Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995; 376: 337–341.
- [267] Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family : spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 124–134.
- [268] Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, et al. Co-expression of Epidermal Growth Factor Receptor And Transforming Growth Factor a Predicts Worse Prognosis In Breast-Cancer Patients. *Int J Cancer* 2000; 89: 484–487.
- [269] Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: Correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3798–3807.
- [270] Wong AJ, Bignert SH, Bignert DD, et al. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification (oncogenes/in situ hybridization/chromosomes). *Med Sci* 1987; 84: 6899–6903.
- [271] Gialeli C, Kletsas D, Mavroudis D, et al. Targeting Epidermal Growth Factor Receptor in Solid Tumors: Critical Evaluation of the Biological Importance of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Curr Med Chem* 2009; 16: 3797–3804.
- [272] Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37: S9–S15.
- [273] Ménard S, Casalini P, Campiglio M, et al. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2965–2978.
- [274] Hubert P, Faivre S. *Ciblage des récepteurs Erb-B/HER*. L'innovati. 2008.
- [275] Zandi R, Larsen AB, Andersen P, et al. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* 2007; 19: 2013–2023.
- [276] Park HS, Jang MH, Kim EJ, et al. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol* 2014; 27: 1212–1222.
- [277] Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development : EGFR gene and cancer. *FEBS J* 2010; 277: 301–308.
- [278] Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997; 8: 1197–1206.
- [279] Teng YHF, Tan WJ, Thike AA, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in triple negative breast cancer : possible implications for targeted therapy. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R35 1-9.

Bibliographie

- [280] Gullick WJ. Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br Med Bull* 1991; 47: 87–98.
- [281] El Hachem G. EGFR inhibition in metastatic triple negative breast cancer : a losing target. *Int Clin Pathol J* 2018; 6: 134–135.
- [282] Baselga J, Gomez P, Awada A, et al. Randomized Phase II Study of the Anti–Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Cetuximab With Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31: 2586–2593.
- [283] Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, et al. TBCRC 001: Randomized Phase II Study of Cetuximab in Combination With Carboplatin in Stage IV Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2615–2623.
- [284] O’Shaughnessy J, Weckstein DJ, Vukelja SJ, et al. Abstract: Randomized phase II study of weekly irinotecan/carboplatin with or without cetuximab in patients with metastatic breast cancer 2007. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106, SABC2: S32–S33.
- [285] Crozier JA, Advani PP, LaPlant B, et al. N0436 (Alliance) : A phase II trial of irinotecan plus cetuximab in patients with metastatic breast cancer previously exposed to anthracycline and/or taxane-containing therapy. *Clin Breast Cancer* 2016; 16: 23–30.
- [286] Trédan O, Campone M, Jassem J, et al. Ixabepilone Alone or With Cetuximab as First-Line Treatment for Advanced/Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 2015; 15: 8–15.
- [287] Mamot C, Ritschard R, Wicki A, et al. Immunoliposomal delivery of doxorubicin can overcome multidrug resistance mechanisms in EGFR-overexpressing tumor cells. *J Drug Target* 2012; 20: 422–432.
- [288] Nabholz JM, Abrial C, Mouret-Reynier MA, et al. Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane based chemotherapy in operable triple negative breast cancer: Identification of biologically-defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol* 2014; 25: 1570–1577.
- [289] Nabholz JM, Chalabi N, Radosevic-Robin N, et al. Multicentric neoadjuvant pilot Phase II study of cetuximab combined with docetaxel in operable triple negative breast cancer. *Int J Cancer* 2016; 138: 2274–2280.
- [290] Baselga J, Albanell J, Ruiz A, et al. Phase II and Tumor Pharmacodynamic Study of Gefitinib in Patients with Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5323–5333.
- [291] von Minckwitz G, Jonat W, Fasching P, et al. A multicentre phase II study on gefitinib in taxane- and anthracycline-pretreated metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 89: 165–72.
- [292] Dickler MN, Cobleigh MA, Miller KD, et al. Efficacy and safety of erlotinib in patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115: 115–121.
- [293] Schuler M, Awada A, Harter P, et al. A phase II trial to assess efficacy and safety of

Bibliographie

- afatinib in extensively pretreated patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 1149–1159.
- [294] Layman RM, Ruppert AS, Lynn M, et al. Severe and prolonged lymphopenia observed in patients treated with bendamustine and erlotinib for metastatic triple negative breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71: 1183–1190.
- [295] Bernsdorf M, Ingvar C, Jörgensen L, et al. Effect of adding gefitinib to neoadjuvant chemotherapy in estrogen receptor negative early breast cancer in a randomized phase II trial. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126: 463–470.
- [296] Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 221–233.
- [297] Caley MP, Martins VLC, O’Toole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care* 2015; 4: 225–234.
- [298] Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 617–629.
- [299] Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. *Mol Cancer Ther* 2018; 17: 1147–1155.
- [300] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases : Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 2010; 141: 52–67.
- [301] Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, et al. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 3–19.
- [302] Yip C, Foidart P, Noël A, et al. MT4-MMP : The GPI-Anchored Membrane-Type Matrix Metalloprotease with Multiple Functions in Diseases. *Int J Mol Sci* 2019; 20: E354 1-13.
- [303] Manzetti S, McCulloch DR, Herington AC, et al. Modeling of enzyme–substrate complexes for the metalloproteases MMP-3, ADAM-9 and ADAM-10. *J Comput Aided Mol Des* 2003; 17: 551–565.
- [304] Woskowicz AM, Weaver SA, Shitomi Y, et al. MT-LOOP-dependent localization of membrane type i matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to the cell adhesion complexes promotes cancer cell invasion. *J Biol Chem* 2013; 288: 35126–35137.
- [305] English WR, Holtz B, Vogt G, et al. Characterization of the role of the ‘MT-loop’: An eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 2001; 276: 42018–42026.
- [306] Puente XS, Pendás AM, Llano E, et al. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 944–949.
- [307] Wang Y, Johnson AR, Ye QZ, et al. Catalytic Activities and Substrate Specificity of the Human Membrane Type 4 Matrix Metalloproteinase Catalytic Domain. *J Biol Chem*

Bibliographie

- 1999; 274: 33043–33049.
- [308] English WR, Puente XS, Freije JMP, et al. Membrane Type 4 Matrix Metalloproteinase (MMP17) Has Tumor Necrosis Factor- α Convertase Activity but Does Not Activate Pro-MMP2. *J Biol Chem* 2000; 275: 14046–14055.
- [309] Kolkenbrock H, Essers L, Ulbrich N, et al. Biochemical Characterization of the Catalytic Domain of Membrane-Type 4 Matrix Metalloproteinase. *Biol Chem* 1999; 380: 1103–1108.
- [310] Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, et al. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* 2003; 22: 55–61.
- [311] Gao G, Plaas A, Thompson VP, et al. ADAMTS4 (Aggrecanase-1) Activation on the Cell Surface Involves C-terminal Cleavage by Glycosylphosphatidyl Inositol-anchored Membrane Type 4-Matrix Metalloproteinase and Binding of the Activated Proteinase to Chondroitin Sulfate and Heparan Sulfate on Sy. *J Biol Chem* 2004; 279: 10042–10051.
- [312] Martín-Alonso M, García-Redondo AB, Guo D, et al. Deficiency of MMP17/MT4-MMP Proteolytic Activity Predisposes to Aortic Aneurysm in Mice. *Circ Res* 2015; 117: e13–e26.
- [313] Rozanov D V., Hahn-Dantona E, Strickland DK, et al. The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein LRP Is Regulated by Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) Proteolysis in Malignant Cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 4260–4268.
- [314] Rikimaru A, Komori K, Sakamoto T, et al. Establishment of an MT4-MMP-deficient mouse strain representing an efficient tracking system for MT4-MMP/MMP-17 expression in vivo using β -galactosidase. *Genes to Cells* 2007; 12: 1091–1100.
- [315] Host L, Paye A, Detry B, et al. The proteolytic activity of MT4-MMP is required for its pro-angiogenic and pro-metastatic promoting effects. *Int J Cancer* 2012; 131: 1537–1548.
- [316] Sohail A, Sun Q, Zhao H, et al. MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 289–302.
- [317] Sternlicht M, Werb Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 463–516.
- [318] Hieronimus B, Pfohl J, Busch C, et al. Expression and Characterization of Membrane-Type 4 Matrix Metalloproteinase (MT4-MMP) and its Different Forms in Melanoma. *Cell Physiol Biochem* 2017; 42: 198–210.
- [319] Udenfriend S, Kodukula K. How Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Membrane Proteins Are Made. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 563–591.
- [320] Truong A, Yip C, Paye A, et al. Dynamics of internalization and recycling of the prometastatic membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) in breast cancer cells. *FEBS J* 2016; 283: 704–722.

Bibliographie

- [321] Sohail A, Marco M, Zhao H, et al. Characterization of the Dimerization Interface of Membrane Type 4 (MT4)-Matrix Metalloproteinase. *J Biol Chem* 2011; 286: 33178–33189.
- [322] Blanco MJ, Rodríguez-Martín I, Learte AIR, et al. Developmental expression of membrane type 4-matrix metalloproteinase (Mt4-mmp/ Mmp17) in the mouse embryo. *PLoS One* 2017; 12: e0184767 1-21.
- [323] Kim I-J, Zhang Y, Meister M, et al. Lamina Restriction of Retinal Ganglion Cell Dendrites and Axons: Subtype-Specific Developmental Patterns Revealed with Transgenic Markers. *J Neurosci* 2010; 30: 1452–1462.
- [324] Leigh NR, Schupp MO, Li K, et al. Mmp17b Is Essential for Proper Neural Crest Cell Migration In Vivo. *PLoS One* 2013; 8: E76484 1-12.
- [325] Srichai MB, Colleta H, Gewin L, et al. Membrane-Type 4 Matrix Metalloproteinase (MT4-MMP) Modulates Water Homeostasis in Mice. *PLoS One* 2011; 6: e17099 1-9.
- [326] Clemente C, Rius C, Alonso-Herranz L, et al. MT4-MMP deficiency increases patrolling monocyte recruitment to early lesions and accelerates atherosclerosis. *Nat Commun* 2018; 9: 910 1–16.
- [327] Kajita M, Kinoh H, Ito N, et al. Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: Isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts. *FEBS Lett* 1999; 457: 353–356.
- [328] Gauthier MC, Racine C, Ferland C, et al. Expression of membrane type-4 matrix metalloproteinase (metalloproteinase- 17) by human eosinophils. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 1667–1673.
- [329] Grant GM, Giambernardi TA, Grant AM, et al. Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18, and MMP-20) in cultured human cells. *Matrix Biol* 1999; 18: 145–148.
- [330] Chabottaux V, Sounni NE, Pennington CJ, et al. Membrane-Type 4 Matrix Metalloproteinase Promotes Breast Cancer Growth and Metastases. *Cancer Res* 2006; 66: 5165–5172.
- [331] Paye A, Truong A, Yip C, et al. EGFR Activation and Signaling in Cancer Cells Are Enhanced by the Membrane-Bound Metalloprotease MT4-MMP. *Cancer Res* 2014; 74: 6758–6770.
- [332] Chabottaux V, Ricaud S, Host L, et al. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) induces lung metastasis by alteration of primary breast tumour vascular architecture. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 4002–4013.
- [333] Salz T, Deng C, Pampo C, et al. Histone Methyltransferase hSETD1A Is a Novel Regulator of Metastasis in Breast Cancer. *Mol Cancer Res* 2014; 13: 461–469.
- [334] Zhu YY, Bai K, Yu JP, et al. Association Between Histone Methyltransferase hSETD1A and Prognosis in Patients With Triple-Negative Breast Cancer After Surgery. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e3783 1-7.

Bibliographie

- [335] Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer. *Science* (80-) 2002; 295: 2387–2392.
- [336] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161–174.
- [337] Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 657–672.
- [338] Winer A, Janosky M, Harrison B, et al. Inhibition of Breast Cancer Metastasis by Presurgical Treatment with an Oral Matrix Metalloproteinase Inhibitor: A Preclinical Proof-of-Principle Study. *Mol Cancer Ther* 2016; 15: 2370–2377.
- [339] Dufour A, Overall CM. Missing the target : Matrix metalloproteinase antitargets in inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34: 233–242.
- [340] Schmidt M. Palbociclib - From bench to bedside and beyond. *Breast Care* 2016; 11: 177–181.
- [341] Sobhani N, D'Angelo A, Pittacolo M, et al. Updates on the CDK4/6 Inhibitory Strategy and Combinations in Breast Cancer. *Cells* 2019; 8: E321 1-29.
- [342] Rocca A, Schirone A, Maltoni R, et al. Progress with palbociclib in breast cancer: Latest evidence and clinical considerations. *Ther Adv Med Oncol* 2017; 9: 83–105.
- [343] Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2015; 14: 130–146.
- [344] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, et al. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16 INK4a. *Cell* 1997; 88: 593–602.
- [345] Burd CE, Sorrentino JA, Clark KS, et al. Monitoring Tumorigenesis and Senescence In Vivo with a p16INK4a-Luciferase Model Christin. *Cell* 2013; 152: 340–351.
- [346] Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, et al. The meaning of p16 ink4a expression in tumors : Functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle* 2011; 10: 2497–2503.
- [347] LaPak KM, Burd CE. The Molecular Balancing Act of p16 INK4a in Cancer and Aging. *Mol Cancer Res* 2013; 12: 167–183.
- [348] Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, et al. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 2006; 25: 1620–1628.
- [349] Bartkova J, Lukas J, Müller H, et al. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 1994; 57: 353–361.
- [350] Etemadmoghadam D, Weir BA, Au-Yeung G, et al. Synthetic lethality between CCNE1 amplification and loss of BRCA1. *PNAS* 2013; 110: 19489–19494.
- [351] Caldon CE, Sergio CM, Kang J, et al. Cyclin E2 Overexpression Is Associated with

Bibliographie

- Endocrine Resistance but not Insensitivity to CDK2 Inhibition in Human Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 1488–1499.
- [352] Musgrove EA, Liuschkis R, Cornish AL, et al. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p16 INK4 , p15 INK4B and p21Waf1/cip1 in human breast cancer. *Int J Cancer* 1995; 63: 584–591.
- [353] Mukherjee S, Conrad SE. C-Myc Suppresses p21WAF1/CIP1 Expression during Estrogen Signaling and Antiestrogen Resistance in Human Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 17617–17625.
- [354] Aaltonen K, Amini RM, Heikkilä P, et al. High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. *Br J Cancer* 2009; 100: 1055–1060.
- [355] Niméus-Malmström E, Koliadi A, Ahlin C, et al. Cyclin B1 is a prognostic proliferation marker with a high reproducibility in a population-based lymph node negative breast cancer cohort. *Int J Cancer* 2010; 127: 961–967.
- [356] O’Brien N, Conklin D, Beckmann R, et al. Preclinical Activity of Abemaciclib Alone or in Combination with Antimitotic and Targeted Therapies in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 2018; 17: 897–907.
- [357] Petrelli F, Ghidini A, Pedersini R, et al. Comparative efficacy of palbociclib, ribociclib and abemaciclib for ER+ metastatic breast cancer: an adjusted indirect analysis of randomized controlled trials. *Breast Cancer Res Treat* 2019; 174: 597–604.
- [358] Rugo HS, Finn RS, Diéras V, et al. Palbociclib plus letrozole as first-line therapy in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer with extended follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2019; 174: 719–729.
- [359] Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, et al. Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Ann Oncol* 2018; 29: 1541–1547.
- [360] Johnston S, Martin M, Di Leo A, et al. MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *npj Breast Cancer* 2019; 5: 1–9.
- [361] Tripathy D, Im SA, Colleoni M, et al. Ribociclib plus endocrine therapy for premenopausal women with hormone-receptor-positive, advanced breast cancer (MONALEESA-7): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018; 19: 904–915.
- [362] Turner NC, Slamon DJ, Ro J, et al. Overall Survival with Palbociclib and Fulvestrant in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 1926–1936.
- [363] Sledge GW, Toi M, Neven P, et al. MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2– Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy. *J Clin Oncol* 2017; 35: 2875–2884.
- [364] <http://www.afphb.be>, <https://www.ehealth.fgov.be/fr/esante/professionnels-de-la->

Bibliographie

sante/civars-chapitre-iv.

- [365] Patnaik A, Rosen LS, Tolaney SM, et al. Efficacy and Safety of Abemaciclib , an Inhibitor of CDK4 and CDK6, for Patients with Breast Cancer, Non–Small Cell Lung Cancer, and Other Solid Tumors. *Cancer Discov* 2016; 6: 740–753.
- [366] Gianni L, Bisagni G, Colleoni M, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab and pertuzumab plus palbociclib and fulvestrant in HER2-positive, ER-positive breast cancer (NA-PHER2) : an exploratory, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2018; 19: 249–256.
- [367] Finn RS, Dering J, Conklin D, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res* 2009; 11: R77 1-13.
- [368] DeMichele A, Clark AS, Tan KS, et al. CDK 4/6 Inhibitor Palbociclib (PD0332991) in Rbþ Advanced Breast Cancer: Phase II Activity, Safety, and Predictive Biomarker Assessment. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 995–1001.
- [369] Liu T, Yu J, Deng M, et al. CDK4/6-dependent activation of DUB3 regulates cancer metastasis through SNAIL1. *Nat Commun* 2017; 8: 13923 1–12.
- [370] Teo ZL, Versaci S, Dushyanthen S, et al. Combined CDK4/6 and PI3Ka Inhibition Is Synergistic and Immunogenic in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res* 2017; 77: 6340–6352.
- [371] Yamamoto T, Kanaya N, Somlo G, et al. Synergistic anti-cancer activity of CDK4/6 inhibitor palbociclib and dual mTOR kinase inhibitor MLN0128 in pRb-expressing ER-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2019; 174: 615–625.
- [372] Mcclendon AK, Dean JL, Rivadeneira DB, et al. CDK4/6 inhibition antagonizes the cytotoxic response to anthracycline therapy. *Cell Cycle* 2012; 11: 2747–2755.
- [373] Vora SR, Juric D, Kim N, et al. CDK 4/6 Inhibitors Sensitize PIK3CA Mutant Breast Cancer to PI3K Inhibitors. *Cancer Cell* 2014; 26: 136–149.
- [374] Herrera-Abreu MT, Palafox M, Asghar U, et al. Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Res* 2016; 76: 2301–2313.
- [375] Goel S, DeCristo MJ, Watt AC, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature* 2017; 548: 471–475.
- [376] Deng J, Wang ES, Jenkins RW, et al. CDK4/6 Inhibition Augments Antitumor Immunity by Enhancing T-cell Activation. *Cancer Discov* 2018; 8: 216–233.
- [377] Rugo H, Kabos P, Dickler M., et al. Abstract P1-09-01: A phase 1b study of abemaciclib plus pembrolizumab for patients with hormone receptor-positive (HR+), human epidermal growth factor receptor 2- negative (HER2-) metastatic breast cancer (MBC). *Cancer Res* 2018; 78,SABCS17: P1-09–01.
- [378] Goetz MP, O’Shaughnessy J, Sledge GW, et al. Abstract GS6-02: The benefit of

Bibliographie

- abemaciclib in prognostic subgroups: An exploratory analysis of combined data from the MONARCH 2 and 3 studies. *Cancer Res* 2018; 78,SABCS17: GS6-02.
- [379] O’leary B, Cutts RJ, Liu Y, et al. The Genetic Landscape and Clonal Evolution of Breast Cancer Resistance to Palbociclib plus Fulvestrant in the PALOMA-3 Trial. *Cancer Discov* 2018; 8: 1390–1403.
- [380] Turner NC, Liu Y, Zhu Z, et al. Abstract CT039: Cyclin E1 (CCNE1) expression associates with benefit from palbociclib in metastatic breast cancer (MBC) in the PALOMA3 trial. *Cancer Res* 2018; 78,SABCS17: CT039.
- [381] Marangoni E, Poupon MF. Patient-derived tumour xenografts as models for breast cancer drug development. *Curr Opin Oncol* 2014; 26: 556–561.
- [382] Schnaeker EM, Ossig R, Ludwig T, et al. Microtubule-Dependent Matrix Metalloproteinase-2/Matrix Metalloproteinase-9 Exocytosis: Prerequisite in Human Melanoma Cell Invasion. *Cancer Res* 2004; 64: 8924–8931.
- [383] Yip C, Foidart P, Somja J, et al. MT4-MMP and EGFR expression levels are key biomarkers for breast cancer patient response to chemotherapy and erlotinib. *Br J Cancer* 2017; 116: 742–751.
- [384] Itoh Y. METALLOPROTEINASE BINDING PROTEINS. *Expert Opin Ther Pat* 2010; 20: 1091–1095.
- [385] Levin M, Udi Y, Solomonov I, et al. Next generation matrix metalloproteinase inhibitors — Novel strategies bring new prospects. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2017; 1864: 1927–1939.
- [386] Shah MA, Starodub A, Sharma S, et al. Andecaliximab/GS-5745 alone and combined with mFOLFOX6 in advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: Results from a phase I study. *Clin Cancer Res* 2018; 24: 3829–3837.
- [387] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *2004* 2004; 350: 2129–2139.
- [388] Paez JG, Jänne P, Lee J, et al. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation With Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science (80-)* 2004; 304: 1497–500.
- [389] Thress KS, Paweletz CP, Felip E, et al. Acquired EGFR C797S mediates resistance to AZD9291 in advanced non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* 2015; 21: 560–562.
- [390] Bemanian V, Sauer T, Touma J, et al. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR / HER-1) Gatekeeper Mutation T790M Is Present in European Patients with Early Breast Cancer. *PLoS One* 2015; 10: e0134398 1-11.
- [391] Berg M, Soreide K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discov Med* 2012; 14: 207–214.

Bibliographie

- [392] Grob TJ, Heilenkötter U, Geist S, et al. Rare oncogenic mutations of predictive markers for targeted therapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 561–567.
- [393] Tilch E, Seidens T, Cocciardi S, et al. Mutations in EGFR, BRAF and RAS are rare in triple-negative and basal-like breast cancers from Caucasian women. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 143: 385–392.
- [394] Sohrab PS, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple negative breast cancers. *Nature* 2013; 486: 395–399.
- [395] Pereira CBL, Leal MF, de Souza CRT, et al. Prognostic and Predictive Significance of MYC and KRAS Alterations in Breast Cancer from Women Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. *PLoS One* 2013; 8: e60576 1-9.
- [396] Engelman JA, Jänne PA. Mechanisms of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2895–2899.
- [397] Terai H, Soejima K, Yasuda H, et al. Activation of the FGF2-FGFR1 Autocrine Pathway: A Novel Mechanism of Acquired Resistance to Gefitinib in NSCLC. *Mol Cancer Res* 2013; 11: 759–767.
- [398] Zhang Z, Lee JC, Lin L, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet* 2012; 44: 852–860.
- [399] Linger RMA, Keating AK, Earp HS, et al. TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer. *Adv Cancer Res* 2008; 100: 35–83.
- [400] Linger RM, Keating AK, Earp HS, et al. Taking aim at Mer and Axl receptor tyrosine kinases as novel therapeutic targets in solid tumors. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 1073–1090.
- [401] Leconet W, Chentouf M, du Manoir S, et al. Therapeutic activity of anti-AXL antibody against triple-negative breast cancer patient-derived xenografts and metastasis. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 2806–2816.
- [402] Nakai K, Hung M-C, Yamaguchi H. A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res* 2016; 6: 1609–1623.
- [403] Costa R, Shah AN, Santa-Maria CA, et al. Targeting Epidermal Growth Factor Receptor in triple negative breast cancer: New discoveries and practical insights for drug development. *Cancer Treat Rev* 2017; 53: 111–119.
- [404] Liu T, Yacoub R, Taliaferro-Smith LD, et al. Combinatorial Effects of Lapatinib and Rapamycin in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 1460–1469.
- [405] Savage P, Blanchet-Cohen A, Revil T, et al. A Targetable EGFR-Dependent Tumor-Initiating Program in Breast Cancer. *Cell Rep* 2017; 21: 1140–1149.

Bibliographie

- [406] Nowsheen S, Cooper T, Stanley JA, et al. Synthetic Lethal Interactions between EGFR and PARP Inhibition in Human Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One* 2012; 7: e46614 1-10.
- [407] Yang X, Zhang X, Mortenson ED, et al. Cetuximab-mediated Tumor Regression Depends on Innate and Adaptive Immune Responses. *Mol Ther* 2013; 21: 91–100.

Annexes

Annexe 1 : Revue sur la MT4-MMP



International Journal of
Molecular Sciences



Review

MT4-MMP: The GPI-Anchored Membrane-Type Matrix Metalloprotease with Multiple Functions in Diseases

Cassandre Yip, Pierre Foidart, Agnès Noël and Nor Eddine Sounni *

Laboratory of Tumor and Development Biology, Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliqué-Cancer (GIGA-Cancer), University of Liège, Liège 4000, Belgium; cassandre.yip@uliege.be (C.Y.); pierre.foidart@chuliege.be (P.F.); agnes.noel@uliege.be (A.N.)

* Correspondence: nesounni@uliege.be; Tel.: +3243662570

Received: 24 December 2018; Accepted: 12 January 2019; Published: 16 January 2019



Abstract: MT4-MMP (or MMP17) belongs to the Membrane-Type Matrix Metalloproteinase (MT-MMP) family. This family of proteases contributes to extracellular matrix remodeling during several physiological processes, including embryogenesis, organogenesis, tissue regeneration, angiogenesis, wound healing, and inflammation. MT4-MMP (MMP17) presents unique characteristics compared to other members of the family in terms of sequence homology, substrate specificity, and internalization mode, suggesting distinct physiological and pathological functions. While the physiological functions of MT4-MMP are poorly understood, it has been involved in different pathological processes such as arthritis, cardiovascular disease, and cancer progression. The *mt4-mmp* transcript has been detected in a large diversity of cancers. The contribution of MT4-MMP to tumor development has been further investigated in gastric cancer, colon cancer, head and neck cancer, and more deeply in breast cancer. Given its contribution to different pathologies, particularly cancers, MT4-MMP represents an interesting therapeutic target. In this review, we examine its biological and structural properties, and we propose an overview of its physiological and pathological functions.

Keywords: MT4-MMP; cancer; diseases

1. Introduction

The integrity of interstitial compartments is crucial for tissue homeostasis. The perturbation of the extracellular matrix and its related components destabilizes this balance, leading to pathogenesis. Matrix Metalloproteinases (MMPs) are the main remodeling enzymes of the extracellular matrix. This protease family counts more than 20 members, and most of them are secreted in the extracellular microenvironment. The membrane-type MMP (MT-MMPs) are associated to the membrane by a transmembrane domain, an amino-terminal link, or a glycosylphosphatidylinositol anchor (GPI). Together, secreted or attached to the membrane, MMPs can directly cleave almost all components of the extracellular matrix (ECM). However, the GPI anchor confers to MMPs a unique location in the lipid raft, giving access to a specific set of substrates. Only two MT-MMPs display this anchor: MT4-MMP (MMP-17) and MT6-MMP (MMP-25). In this review, we focus on MT4-MMP. Discovered more than 20 years ago, this protease aroused interest only a decade ago [1–4]. MT4-MMP exhibits unique characteristics, which distinguishes it from other MMPs. Unlike the others, it is unable to activate pro-MMP2 and cleaves only a few ECM components [5,6]. Its sensitivity to tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) is also different, with MT4-MMP being more sensitive to TIMP1 than TIMP2 [6,7]. These differences are probably due to the least degree of sequence identity [1]. MT4-MMP has been involved in inflammation and angiogenesis, contributing to associated pathologies such as

osteoarthritis and atherosclerosis, as well as thoracic aortic aneurysms and dissection (TAAD) [2,8,9]. Interestingly, inflammation and angiogenesis are two pillars of tumor development. The *mt4-mmp* transcript has been detected in prostate carcinomas, oral carcinomas, osteosarcomas, gastrointestinal adenocarcinomas, embryonal carcinomas, leukemias, lung carcinomas, glioblastomas, cervical carcinomas, melanomas, adrenal adenocarcinomas, and thyroid carcinomas [3,10–12]. MT4-MMP was first described in breast cancers [1], in which it has been more widely investigated compared to the other cancers. The pro-angiogenic and pro-metastatic functions of MT4-MMP have been highlighted in breast cancer [4,13]. MT4-MMP-mediated metastatic dissemination has been also pointed out in colon cancer and head and neck cancer [3,11]. All these data propel MT4-MMP onto the stage of future potential therapeutic treatments.

2. Characteristics of the MMP family

The MMPs are endopeptidases characterized by the presence of a zinc ion in the catalytic domain. Twenty-four members have been identified and are separated into two different groups: The soluble MMPs (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -19, -20, -21, -22, -27, and -28) and the MMPs linked to the membrane by a transmembrane domain (MMP-14, -15, -16, and -24), a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (MMP-17 and -25), or an amino-terminal signal peptide (MMP-23A and -23B). The groups are shown in Figure 1.

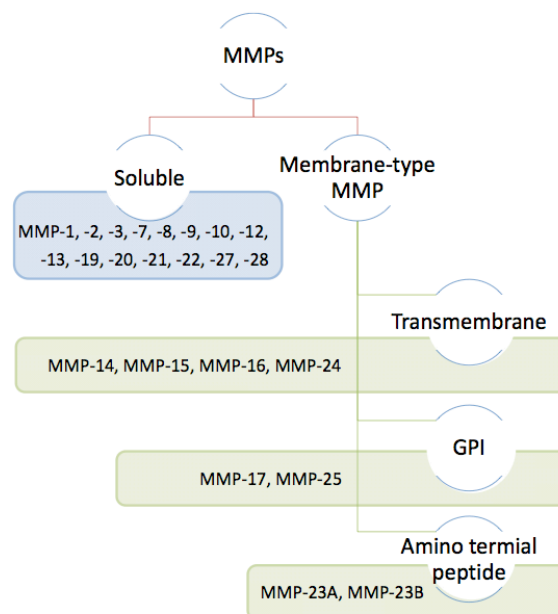


Figure 1. Classification of different Matrix Metalloproteinases (MMPs) according to their structure. Matrix Metalloproteases are either soluble (MMPs) or membrane-tethered (MT-MMPs). MMP14 (MT1-MMP), MMP15 (MT2-MMP), MMP16 (MT3-MMP), and MMP24 (MT5-MMP) are attached to the cell membrane by a transmembrane domain. MMP17 (MT4-MMP) and MMP25 (MT6-MMP) are linked to the cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor (GPI).

The MMPs share common structures including: (1) The pre-domain, an N-terminal sequence driving the MMP to the endoplasmic reticulum (ER); (2) the pro-domain, keeping enzymes in an inactive form; and (3) the catalytic domain, implicated in the recognition and cleavage of substrates. These are shown in Figure 2.

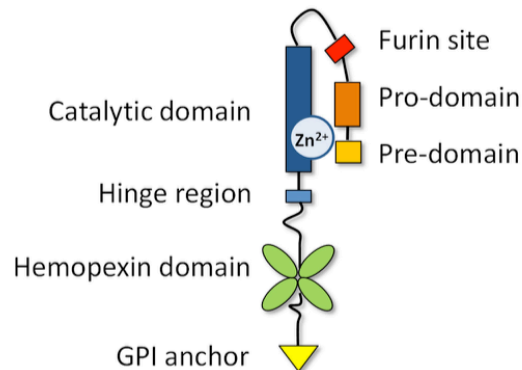


Figure 2. Structural domains of MT4-MMP, including the pre-domain or signal peptide (amino acids 1 to 41), the pro-domain (42–128), the catalytic domain with a zinc ion (129–297), a linker (298–333) containing the furin site (R–X–K/R–R), the hemopexin domain (334–535), and the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored to the membrane (572–605).

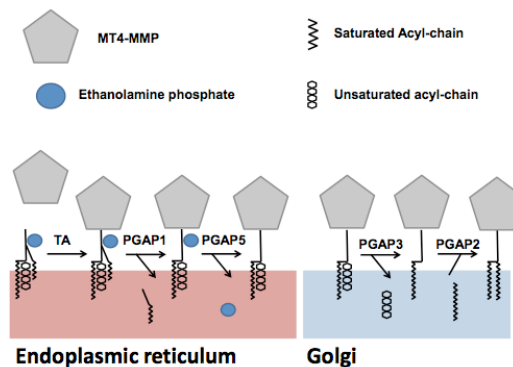
The catalytic domain is characterized by a consensus sequence “HEXXHXXGXXH”, which allows the linking of a zinc ion. The presence of a zinc ion facilitates the binding of H₂O molecules, thus providing the hydrolytic reactions of peptides and substrates [14]. Except for MMP-7, -26, and -23, all MMP family members display an hemopexin domain known to play a role in substrate recognition, proteolytic activity, and inhibitor binding. The GPI-anchored MT4-MMP displays unique features as compared to other MT-MMP members [15]. First, MT4-MMP is distantly related in its amino acid sequence to the other members. The catalytic domain displays less than 40% sequence identity, while the sequence identity is more than 65% among the other MMP members [1]. Second, MT4-MMP is unable to process pro-MMP2 into its active form, in contrast with MT1-, MT2-, MT3-, and MT5-MMP [5,6,16]. The pro-MMP2-activating MT-MMPs contain eight amino acids located in the catalytic domain, the so-called “MT-loop”, which are lacking in MT4-MMP [17]. It has been reported that the pro-MMP2 activation is impaired when the MT-loop of MT1-MMP is deleted or inhibited by neutralizing antibodies [18]. These results are consistent with the capacity of the MT-Loop of MT1-MMP to interact with the fibronectin-like domain of pro-MMP2. Furthermore, a mutation in the MT-Loop of MT1-MMP impairs pro-MMP2 activation [19]. Thirdly, unlike other MMPs, MT4-MMP has a small repertoire of substrates among the ECM, with the exception of weak hydrolyzing capacities against fibrinogen, fibrin, and gelatin [5,6]. However, MT4-MMP is efficient in the cleavage of proTNE, ADAMTS4, α -2-macroglobulin, low density lipoprotein receptor-related protein, osteopontin, and cartilage oligomeric matrix protein, as detailed in Table 1 [2,5,6,8,20,21]. Interestingly, a soluble MT4-MMP form has been abundantly detected in the media of cells overexpressing active MT4-MMP, but not in the media of cells overexpressing its inactive form [22]. These data suggest that MT4-MMP is able to process itself by an active autocleavage. Finally, MT4-MMP is most potently inhibited by TIMP1 rather than TIMP2 or TIMP3, unlike the pro-MMP2-activating MT-MMPs that are efficiently inhibited by TIMP-2, -3, and -4, but not by TIMP-1 [6,7].

Table 1. Overview of identified substrates of MT4-MMP.

Substrates	References
ECM substrates:	
Gelatin	Wang et al., 1999 [5]
Fibrin	English et al., 2000 [6]
Fibrinogen	English et al., 2000 [6]
Other substrates:	
proTNF	Wang et al., 1999 [5] English et al., 2000 [6]
COMP	English et al., 2000 [6]
α -2-macroglobulin	English et al., 2000 [6]
LRP1	Rozanov et al., 2004 [20]
ADAMTS4	Gao et al., 2004 [2] Patwari et al., 2005 [23] Clements et al., 2011 [24]
MT4-MMP	Host et al., 2012 [22]
Osteopontin	Martin-Alonso et al., 2015 [8] Papke et al., 2015 [25]
Thrombospondin 4	Martin-Alonso et al., 2015 [8]
α M integrin	Clemente et al., 2018 [9]

3. Biosynthesis and Trafficking

MMPs are synthesized as inactive zymogens. The inactive form is maintained by the interaction between the cysteine sulfhydryl group in the pro-domain and the zinc ion bound to the catalytic domain. The activation of MMPs requires a proteolytic cleavage of their pro-domain [26]. The MT4-MMP contains a furin consensus sequence (R-X-K/R-R) and can be activated by furin [7,27]. The precursor form (69 kDa) is found in the ER and in the Golgi compartment, while the processed form (58 kDa) is present at the membrane [12]. The biosynthesis of GPI proteins such as MT4-MMP follows a unique pathway that starts in the ER and finishes in the Golgi [28]. The mature GPI protein is finally transported to the cytoplasmic membrane by endoplasmic vesicles. In the lumen of the ER, the nascent protein is attached to a preformed GPI present in the inner membrane of the ER by a GPI transamidase. The preformed GPI is then modified following different steps to reach a mature form. The acyl chain is removed by PGAP1 (Post-GPI attachment to proteins 1) and the ethanolamine phosphate chain is released by PGAP5. After arrival in the Golgi, the unsaturated acid is replaced by a saturated fatty acid under the actions of PGAP3 and PGAP2, as illustrated in Figure 3 [28]. The fatty acid remodeling is essential for the incorporation of GPI-anchored proteins into lipid rafts, conferring to them the ability to interact with and degrade specific components of the raft environment. During this process, MT4-MMP is also N-glycosylated at the Asn318 site [12].

**Figure 3.** The biosynthesis of the glycosylphosphatidylinositol anchor on the MT4-MMP.

While MT4-MMP has been shown to colocalize with caveolin-1, a major structural protein associated with lipid rafts in mammalian cells, MT4-MMP internalization is independent of the caveolin-1 pathway [29]. Indeed, its internalization is not disturbed by filipin III, a caveolae pathway inhibitor. Similarly, treatment with chlorpromazine, an inhibitor of the clathrin pathway, does not block MT4-MMP internalization. Moreover, no colocalization of MT4-MMP and clathrin has been observed. MT4-MMP internalization involves a clathrin-independent carriers/GPI-enriched early endosomal compartments (CLIC/GEEC) pathway commonly used for GPI-anchored protein endocytosis, which is shown in Figure 4 [29]. The silencing of CDC42, Rac1, and RhoA, three regulators of the CLIC/GEEC endocytic pathway, disturbs MT4-MMP internalization. This implication of the CLIC/GEEC pathway in MT4-MMP internalization is up till today unique in the MMP family, further underlying the specific features of this membrane-associated enzyme. MT4-MMP present at the cell surface is internalized in early endosomes, and part of the enzyme is intracellularly autodegraded or recycled to the cell surface [29]. We and others have demonstrated the key role of the cysteine residue C564 in MT4-MMP dimerization, whereas the effect of its demonization on its activity is still unknown [29,30].

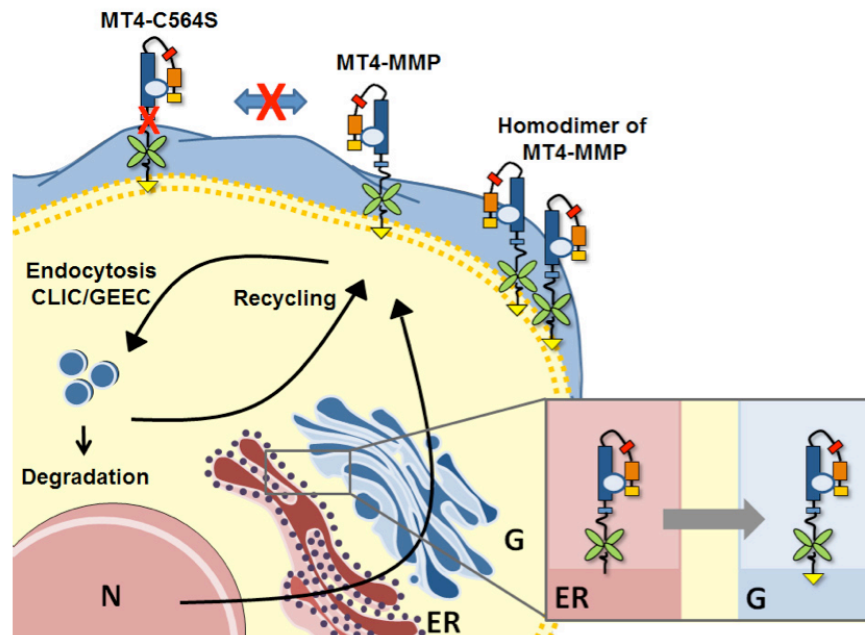


Figure 4. Biosynthesis and trafficking of MT4-MMP. MT4-MMP is associated to the glycosylphosphatidylinositol anchor in the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi (G) before being brought to the membrane. MT4-MMP can form homodimers, but the switch of cysteine with a serine prevents the dimerization. The protease is internalized by the clathrin-independent carriers/GPI-enriched early endosomal compartments pathway (CLIC/GEEC). In the cytoplasm, the protease is degraded or recycled at the membrane. N: Nucleus.

4. Physiological Expression and Functions of MT4-MMP

The spatiotemporal expression of *mt4-mmp* during murine embryonic development has been linked to its key role in angiogenesis, limb development, and brain formation [31]. The implication of MT4-MMP in the neuronal system is not limited only to the brain, but also involved in the migration of neural crest cells during embryogenesis of the zebrafish. Indeed, its inhibition by morpholino or by broad spectrum MMP inhibitors (Marimastat and ONO-4817) results in aberrant neural crest cell migration, with minimal changes in cell proliferation or apoptosis [32]. In transgenic mouse models

expressing different types of retinal ganglion neurons with distinct directional migration, *mt4-mmp* transcripts have been identified in retinal ganglion cells with preferences for nasal motion, but not for ventral motion [33]. These data suggest a role of MT4-MMP in the orientation of the retinal ganglion neuron migration [34]. Overall, MT4-MMP-deficient mice grow normally and display a normal appearance, behaviour, life span, and fertility [21]. The unique observable effect in this model is a hypodipsia with a decreased daily urine output. While the kidney function is normal and MT4-MMP is expressed in the hypothalamus, which regulates thirst, it has been proposed that MT4-MMP may play a role in thirst regulation [35]. The expression of MT4-MMP is prominent in the brain, lungs, and uterus, and is transitional in the spleen, stomach, intestines, and reproductive organs [1,21]. MT4-MMP is also detected in human eosinophils, lymphocytes, monocytes, and macrophages, suggesting a role of this protease in inflammation [1,6,9,21,36,37]. Its expression in eosinophils is increased upon stimulation with TNF- α [37]. While the expression of MT4-MMP has been linked to different physiological processes, the mechanisms underlying these processes are still unknown. In contrast, more investigations were dedicated to understanding the role of this protease in pathologies, and several mechanisms were unravelled and will be described in this review and summarized in Table 2. The mechanism of action of MT4-MMP is not only related to its proteolytic activity, but also to its non-proteolytic function. We previously demonstrated that MT4-MMP is a key precursor and partner of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), and enhances its activation leading to cancer cell proliferation in a non-proteolytic activity [38]. Future studies aiming at targeting these two functions will further define its relevance in cancer and diseases.

Table 2. Proteolytic and non-proteolytic functions of MT4-MMP in different pathologies.

Diseases	Proteolytic Functions	Non-Proteolytic Functions	Unknown
Breast cancer	Angiogenesis ^{1,2} , Metastatic dissemination ^{1,2}	Cell proliferation ³	
Colon cancer			Metastatic dissemination ⁴
Head and neck cancer			Metastatic dissemination ⁵ , Hypoxia ⁵
Osteoarthritis	Processing of ADAMTS4 p68 isoform ^{6,7,8}		
Thoracic aortic aneurysms and dissections	Processing of osteopontin ^{9,10}		
Atherosclerosis	Processing of α MIntegrin ¹¹		

¹ Chabottaux et al., 2009 [4], ² Host et al., 2012 [22], ³ Paye et al., 2014 [38], ⁴ Nimri et al., 2013 [11], ⁵ Huang et al., 2009 [3], ⁶ Gao et al., 2004 [2], ⁷ Patwari et al., 2005 [23], ⁸ Clements et al., 2011 [24], ⁹ Martin-Alonso et al., 2015 [8], ¹⁰ Papke et al., 2015 [25], ¹¹ Clemente et al., 2018 [9].

5. Osteoarthritis

Articular cartilage function depends on ECM homeostasis that is dependent on a fine-tuned equilibrium between synthetic and degradative processes. Osteoarthritis (OA) is characterized by inflammation and a degradation of cartilage resulting from an increase of aggrecanase activity. Accordingly, MT4-MMP has been described with an aggrecanase activity, suggesting a role in cartilage homeostasis [2]. In OA, both *mt4-mmp* mRNA and the protein were found upregulated in this pathology [24,39]. *Mt4-mmp* transcripts are detected in human OA cartilage, but not in intact control cartilage [24]. Patwari et al. demonstrated that interleukin-1 (IL-1) considerably increases MT4-MMP expression in articular cartilage disk explants obtained from the femoropatellar groove of calves and in the conditioned medium [23]. Similar results were observed in C57BL/6Jax mice injected with IL-1 [24]. MT4-MMP is able to cleave the ADAMTS4 p68 isoform, which possesses relatively poor aggrecanase activity, to generate the ADAMTS4 p53 isoform, which is the highly active form [2]. In inflammatory conditions, the amount of total ADAMTS4 protein is not modulated. However, the ADAMTS4 p53 isoform is more abundant than the p68 isoform, reflecting an increase of aggrecanase activity.

The generation of the p53 isoform is directly linked to MT4-MMP expression. Indeed, MT4-MMP null mice are protected from IL-1-induced cartilage aggrecanolytic [24]. All these data imply the role of MT4-MMP in the regulation of aggrecan processing under inflammatory contexts, and open new therapeutic perspectives in osteoarthritis treatment.

6. Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections

The role of MT4-MMP in the regulation of vessel stability in cancer and vascular diseases is well established [4,22,40]. More recently, its role in the thoracic aortic aneurysms and dissections (TAAD) has been reported in an elegant study by Martin-Alonso and colleagues, who performed screening of 58 patients with inherited predispositions to TAAD and identified a missense mutation R373H in the *mt4-mmp* gene that prevents the expression of the protease [8]. In a genetic mouse models of MT4-MMP loss of function, dilated aortas are observed, with dysfunctional vascular smooth muscle cells (VSMCs) and ECM changes [8,21]. Moreover, these mice are hypotensive and display an adventitial fibrosis as described in other mouse models of TAAD [41]. Furthermore, MT4-MMP expression is detected in periaortic progenitors during embryogenesis, suggesting a role of MT4-MMP in the early construction of the aortic wall and VSMC maturation. While no TAAD are observed spontaneously in MT4-MMP-deficient mice, its incidence is increased in MT4-MMP-null mice compared to the wild type mice when vessel wall stress is induced by angiotensin-II treatment. In another model of vascular injury triggered by ligation of the carotid artery, MT4-MMP-null mice display an alteration of vascular remodelling, characterized by a neointima more prominent in the carotid arteries and increased VSMC proliferation. Among the vascular substrates of MT4-MMP, osteopontin has been identified. This protein is expressed in the vessel wall, including in the embryonic aorta, and is associated with VSMC migration and differentiation, and more interestingly with aortic aneurysm [42–45]. Parallel to the increase of osteopontin fragments mediated by MT4-MMP cleavage in the aorta, an increase of c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation is observed, highlighting a signalling pathway activated by MT4-MMP during VSMC maturation. Finally, the restoration of MT4-MMP expression by lentivirus partially rescues the vessel-wall phenotype, providing the way for new therapeutic strategies [8,25]. Atherosclerosis can be associated with TAAD [46,47]. Interestingly, the absence of MT4-MMP expression in mice is correlated with the recruitment of patrolling monocytes and lipid deposits in atherosclerotic plaques. Indeed, MT4-MMP cleaves α M integrin at the surface of crawling monocytes, inducing their detachment and the loss of their function in the regulation of atherosclerosis [9].

7. Cancer

7.1. Gastric Cancer

Wang et al. investigated the expression of *mt4-mmp* transcripts and proteins in 42 cases of gastric cancer and normal tissues, and 40 cases of atrophic gastritis [48]. Interestingly, no difference in MT4-MMP expression is observed between normal tissues and atrophic gastritis cases. However, its expression is higher in gastric cancer patients than in normal and atrophic gastritis tissues. This study highlighted an association of MT4-MMP expression with the depth of tumor invasion, lymph node metastasis and serosal involvement of gastric cancer patients [48]. In an experimental model of gastric cancer cell lines exposed to oxidative stress *in vitro*, the expression of MT4-MMP was increased among other MMPs and β -catenin, suggesting a potential role of this enzyme in the pathogenesis of gastric cancer, dependent on the continuous exposure of the mucosa to oxidative stress [49].

7.2. Colon Cancer

MT4-MMP is expressed in lipid rafts of highly metastatic colon cancer cell line HM-7, but not in the parental lower metastatic cell line LS174T, suggesting a role of MT4-MMP in the metastatic dissemination of colon cancer [11]. Inversely, caveolin-1 is not expressed in metastatic HM-7 cells

and weakly expressed in the cytosolic fraction of parental LS174T cells. Interestingly, the restoration of caveolin-1 expression in metastatic HM-7 cells inhibits MT4-MMP expression in the lipid rafts, suppressing the metastatic phenotype of colon cancer cells. While the role of caveolin-1 in MT4-MMP trafficking has been excluded [29], the impact of caveolin-1 on MT4-MMP expression could be explained by other mechanisms, including the regulation of *mt4-mmp* transcription or translation, or the release of MT4-MMP from the membrane by proteases or phospholipases, which all can be regulated by caveolin-1 activity [11].

7.3. Head and Neck Cancer

Huang et al. described an unprecedented link between hypoxia and the regulation of MT4-MMP expression in head and neck cancer [3]. The experiments on hypopharyngeal squamous cell carcinoma (FADU) and tongue squamous cell carcinoma (SAS) showed an increase of *mt4-mmp* transcripts and proteins in hypoxic conditions or under constitutive expression of HIF-1. In reverse, HIF-1 silencing decreases MT4-MMP expression. Among the key regulators of hypoxia, SLUG has been identified as the major factor responsible for hypoxia and HIF-1 α -induced MT4-MMP expression. Indeed, SLUG activates the transcription of *mt4-mmp* through direct interaction with the E-box located in the promoter of the *mt4-mmp* gene. Interestingly, MT4-MMP silencing reduces HIF-1 α - or SLUG-induced invasiveness and lung dissemination of cancer cells. In a retrospective clinical study, MT4-MMP and HIF-1 α colocalized in 20 out of 68 patients, and the colocalization of the both proteins was associated with poor overall survival [3].

7.4. Breast Cancer

Chabottaux et al. investigated the expression of MT4-MMP in 21 samples of healthy breast tissue and 63 breast adenocarcinomas [13]. Immunohistochemistry staining revealed a higher expression of MT4-MMP in breast adenocarcinomas, while healthy breast tissues presented a negative to moderate positivity [13]. Interestingly, the overexpression of MT4-MMP in MDA-MB-231 cells (triple-negative breast cancer cell line) promotes cell proliferation in the 3D matrix in vitro and in subcutaneous xenografts [13,38]. Moreover, MT4-MMP expression induces lung metastases by destabilizing blood vasculature, characterized by an enlargement of blood vessel lumens and pericyte detachment [4]. While no differences in the production of key angiogenic modulators (VEGF, PDGFR, FGF, and their receptors) were detected, expression of human thrombospondin-2 (TSP-2) is decreased in MT4-MMP xenografts. This result fits with the decrease of this anti-angiogenic factor that has been associated with impaired vascular integrity and permeability in mouse models [50]. Moreover, genetic deletion of TSP-2 in knock-out mice favors tumor growth, metastasis, and angiogenesis [51,52]. Interestingly, Salz et al. found that the transcription of different MMPs, including *mt4-mmp*, is regulated by hSETD1A, a methyltransferase overexpressed in metastatic human breast cancer cell lines and patients [53]. The silencing of hSETD1A decreases H3K4 methylation in promoters, decreasing MMP transcription and leading to decreased cell migration and invasion in vitro, and a reduction of lung metastases in mice [53]. Host et al. provided evidence for the requirement of proteolytic activity for MT4-MMP-mediated proangiogenic and prometastatic effects [22]. In sharp contrast, MT4-MMP has been reported to exert mitogenic effects on triple-negative breast cancer cells that are independent of its proteolytic activity. Indeed, MT4-MMP stimulates cell proliferation by interacting with EGFR and enhancing its activation in response to its ligands, Epidermal Growth Factor (EGF) and Tumor Growth Factor (TGF) [38]. Moreover, superimposition of EGFR and MT4-MMP has been observed in human triple-negative breast cancer (TNBC) patients [54]. Interestingly, MT4-MMP expression has been recently identified as a biomarker for TNBC patient responses to chemotherapy and to a combination of anti-EGFR drugs such as Erlotinib and Palbociclib, an inhibitor of Cyclin-dependent kinases 4 and 6, which are involved in the cell cycle [54,55]. These recent data highlight the clinical relevance of using the MT4-MMP/EGFR axis to select patients who could benefit from specific combinations of targeted therapies.

8. Clinical Inhibitors of MMPs

Almost thirty years ago, MMPs were viewed as interesting targets for therapeutic compounds. Rationally, the TIMPs, endogenous inhibitors of MMPs, have been considered as potential treatments. Unfortunately, the development of clinical drugs has been aborted due to technical difficulties with the production and use of these proteins [56]. Also, studies on TIMPs have revealed dual functions in inhibiting or promoting cancer progression through several mechanisms involving intracellular signalling that are independent from their inhibitory activity of MMPs [57–59]. Other natural inhibitors have been taken into consideration, such as Neovastat, a molecule extracted from shark cartilage, which prevents angiogenesis and metastases. These anti-tumor effects are not only due to the inhibition of MMPs, but also the inhibition of VEGF [60]. Another natural compound is Genistein, a soy isoflavonoid that blocks tumor growth and invasions by altering, among other things, the expression and the activity of MMPs and TIMPs [61,62]. Rapidly, synthetic inhibitors of MMPs have been produced and tested in different clinical trials [63]. However, those clinical trials using broad-spectrum MMP inhibitors were disappointing despite the promising preclinical studies. The clinical benefit was not convincing, and the secondary effects were intolerable [64]. The new generation of MMP inhibitors are designed to be more selective to decrease the secondary effects [65]. Monoclonal antibodies specifically directed against the catalytic domains of MT1-MMP or MMP-9 were promising *in vitro* and *in vivo* [66,67]. To date, only monoclonal anti-MMP-9 (GS-5745; Gilead Science) is being investigated in clinical trials. More recently, an antibody directed towards active MMP-13 has been produced and characterized [68]. Interestingly, MT4-MMP is emerging as a marker of interest to select patients who could benefit from specific combinations of existing treatments [55]. These findings hold new promise in the field of MMPs.

9. Discussion and Perspectives

The specific roles of MMPs and their inhibitors in cancer progression are widely recognized [69]. Although the family of human MMPs is composed of 25 enzymes, only five MMPs, including four soluble forms (MMPs-1, -2, -9, and -13) and a membrane form (MT1-MMP), were intensively studied. This interest in these MMPs is linked to their overexpression identified on the basis of the genomic and transcriptomic data collected on different types of human cancers [70]. Because of its membrane localization and its pericellular proteolytic action, MT1-MMP has been the subject of intensive studies that have elucidated its primordial role in the migration of cancer cells [71,72]. The search for scientific publications in the national center for biotechnology information (NCBI) database by combining the terms “MT1-MMP” and “cancer” reveals 340 articles from 1998 to the present. On the other hand, only 60 scientific articles are proposed for MT4-MMP in cancer. The low interest for this protease is due to the fact that the overexpression of MT4-MMP was not detected in transcriptomic studies. However, analyses by immunohistochemistry showed that the protein is very abundant in the tumor compartment of human breast cancers [13,38,54]. Several hypotheses can be envisaged, such as: (1) The existence of several transcripts resulting from alternative splicing that would not be detected in the transcriptomic analyses, (2) post-transcriptional regulation via miRNAs, (3) translation control, and/or (4) epigenetic mRNA changes [73]. Since 2006, special attention has been brought to the study of MT4-MMP, which has been identified in experimental models of mammary cancers as a driver of metastasis [4,13]. In addition, this protease has unique biochemical characteristics that distinguish it from other MMPs, suggesting different functions [15]. First, MT4-MMP is anchored to the membrane by a GPI anchor, a feature only shared with MT6-MMP, and second, unlike most MT-MMPs, MT4-MMP is inefficient in the activation of pro-MMP2 and hydrolyses very few ECM components [5,6]. Moreover, its sensitivity to TIMPs is different from that of other MMPs [6,7]. One of the plausible explanations for this specificity of MT4-MMP is the low-percentage sequence homology of its catalytic domain compared to other MMPs [1]. All these data suggest that MT4-MMP presents unique functions and different substrates, promoting different pathologies, particularly in tumor progression. All these data support the development of blocking molecules to counter the effects of MT4-MMP. The pathological

functions of this protease depend mainly on its proteolytic activity. Interestingly, the catalytic domain of MT4-MMP possesses a distinct sequence to the other MMPs, allowing the development of specific inhibitors as function-blocking antibodies.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Puente, X.S.; Pendas, A.M.; Llano, E.; Velasco, G.; Lopez-Otin, C. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 944–949. [[PubMed](#)]
2. Gao, G.; Plaas, A.; Thompson, V.P.; Jin, S.; Zuo, F.; Sandy, J.D. ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10042–10051. [[PubMed](#)]
3. Huang, C.H.; Yang, W.H.; Chang, S.Y.; Tai, S.K.; Tzeng, C.H.; Kao, J.Y.; Wu, K.J.; Yang, M.H. Regulation of membrane-type 4 matrix metalloproteinase by SLUG contributes to hypoxia-mediated metastasis. *Neoplasia* **2009**, *11*, 1371–1382. [[CrossRef](#)]
4. Chabottaux, V.; Ricaud, S.; Host, L.; Blacher, S.; Paye, A.; Thiry, M.; Garofalakis, A.; Pestourie, C.; Gombert, K.; Bruyere, F.; et al. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) induces lung metastasis by alteration of primary breast tumour vascular architecture. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 4002–4013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wang, Y.; Johnson, A.R.; Ye, Q.Z.; Dyer, R.D. Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33043–33049. [[CrossRef](#)]
6. English, W.R.; Puente, X.S.; Freije, J.M.; Knauper, V.; Amour, A.; Merryweather, A.; Lopez-Otin, C.; Murphy, G. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14046–14055. [[CrossRef](#)]
7. Sohail, A.; Sun, Q.; Zhao, H.; Bernardo, M.M.; Cho, J.A.; Fridman, R. MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: Properties and expression in cancer. *Cancer Metast. Rev.* **2008**, *27*, 289–302. [[CrossRef](#)]
8. Martin-Alonso, M.; Garcia-Redondo, A.B.; Guo, D.; Camafeita, E.; Martinez, F.; Alfranca, A.; Mendez-Barbero, N.; Pollan, A.; Sanchez-Camacho, C.; Denhardt, D.T.; et al. Deficiency of MMP17/MT4-MMP proteolytic activity predisposes to aortic aneurysm in mice. *Circ. Res.* **2015**, *117*, e13–e26. [[CrossRef](#)]
9. Clemente, C.; Rius, C.; Alonso-Herranz, L.; Martin-Alonso, M.; Pollan, A.; Camafeita, E.; Martinez, F.; Mota, R.A.; Nunez, V.; Rodriguez, C.; et al. MT4-MMP deficiency increases patrolling monocyte recruitment to early lesions and accelerates atherosclerosis. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 910. [[CrossRef](#)]
10. Grant, G.M.; Giamberti, T.A.; Grant, A.M.; Klebe, R.J. Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18, and MMP-20) in cultured human cells. *Matrix Biol.* **1999**, *18*, 145–148. [[CrossRef](#)]
11. Nimri, L.; Barak, H.; Graeve, L.; Schwartz, B. Restoration of caveolin-1 expression suppresses growth, membrane-type-4 metalloproteinase expression and metastasis-associated activities in colon cancer cells. *Mol. Carcinog.* **2013**, *52*, 859–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hieronimus, B.; Pfohl, J.; Busch, C.; Graeve, L. Expression and Characterization of Membrane-Type 4 Matrix Metalloproteinase (MT4-MMP) and its Different Forms in Melanoma. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *42*, 198–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Chabottaux, V.; Sounni, N.E.; Pennington, C.J.; English, W.R.; van den Brule, F.; Blacher, S.; Gilles, C.; Munaut, C.; Maquoui, E.; Lopez-Otin, C.; et al. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5165–5172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Manzetti, S.; McCulloch, D.R.; Herington, A.C.; van der Spoel, D. Modeling of enzyme-substrate complexes for the metalloproteases MMP-3, ADAM-9 and ADAM-10. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2003**, *17*, 551–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Itoh, Y.; Kajita, M.; Kinoh, H.; Mori, H.; Okada, A.; Seiki, M. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 34260–34266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Kolkenbrock, H.; Essers, L.; Ulbrich, N.; Will, H. Biochemical characterization of the catalytic domain of membrane-type 4 matrix metalloproteinase. *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 1103–1108. [[CrossRef](#)]
17. Sounni, N.E.; Janssen, M.; Foidart, J.M.; Noel, A. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol.* **2003**, *22*, 55–61. [[CrossRef](#)]
18. Woskowicz, A.M.; Weaver, S.A.; Shitomi, Y.; Ito, N.; Itoh, Y. MT-LOOP-dependent localization of membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to the cell adhesion complexes promotes cancer cell invasion. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 35126–35137. [[CrossRef](#)]
19. English, W.R.; Holtz, B.; Vogt, G.; Knauper, V.; Murphy, G. Characterization of the role of the “MT-loop”: An eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 42018–42026. [[CrossRef](#)]
20. Rozanov, D.V.; Hahn-Dantona, E.; Strickland, D.K.; Strongin, A.Y. The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4260–4268. [[CrossRef](#)]
21. Rikimaru, A.; Komori, K.; Sakamoto, T.; Ichise, H.; Yoshida, N.; Yana, I.; Seiki, M. Establishment of an MT4-MMP-deficient mouse strain representing an efficient tracking system for MT4-MMP/MMP-17 expression in vivo using beta-galactosidase. *Genes Cells* **2007**, *12*, 1091–1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Host, L.; Paye, A.; Detry, B.; Blacher, S.; Munaut, C.; Foidart, J.M.; Seiki, M.; Sounni, N.E.; Noel, A. The proteolytic activity of MT4-MMP is required for its pro-angiogenic and pro-metastatic promoting effects. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 1537–1548. [[CrossRef](#)]
23. Patwari, P.; Gao, G.; Lee, J.H.; Grodzinsky, A.J.; Sandy, J.D. Analysis of ADAMTS4 and MT4-MMP indicates that both are involved in aggrecanolysis in interleukin-1-treated bovine cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **2005**, *13*, 269–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Clements, K.M.; Flannelly, J.K.; Tart, J.; Brockbank, S.M.; Wardale, J.; Freeth, J.; Parker, A.E.; Newham, P. Matrix metalloproteinase 17 is necessary for cartilage aggrecan degradation in an inflammatory environment. *Ann. Rheum. Dis.* **2011**, *70*, 683–689. [[CrossRef](#)]
25. Papke, C.L.; Yamashiro, Y.; Yanagisawa, H. MMP17/MT4-MMP and thoracic aortic aneurysms: OPNing new potential for effective treatment. *Circ. Res.* **2015**, *117*, 109–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sternlicht, M.D.; Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2001**, *17*, 463–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pei, D. Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: A novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell Res.* **1999**, *9*, 291–303. [[CrossRef](#)]
28. Udenfriend, S.; Kodukula, K. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 563–591. [[CrossRef](#)]
29. Truong, A.; Yip, C.; Paye, A.; Blacher, S.; Munaut, C.; Deroanne, C.; Noel, A.; Sounni, N.E. Dynamics of internalization and recycling of the prometastatic membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) in breast cancer cells. *FEBS J.* **2016**, *283*, 704–722. [[CrossRef](#)]
30. Sohail, A.; Marco, M.; Zhao, H.; Shi, Q.; Merriman, S.; Mobashery, S.; Fridman, R. Characterization of the dimerization interface of membrane type 4 (MT4)-matrix metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 33178–33189. [[CrossRef](#)]
31. Blanco, M.J.; Rodriguez-Martin, I.; Learte, A.I.R.; Clemente, C.; Montalvo, M.G.; Seiki, M.; Arroyo, A.G.; Sanchez-Camacho, C. Developmental expression of membrane type 4-matrix metalloproteinase (Mt4-mmp/Mmp17) in the mouse embryo. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Leigh, N.R.; Schupp, M.O.; Li, K.; Padmanabhan, V.; Gastonguay, A.; Wang, L.; Chun, C.Z.; Wilkinson, G.A.; Ramchandran, R. Mmp17b is essential for proper neural crest cell migration in vivo. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kim, I.J.; Zhang, Y.; Meister, M.; Sanes, J.R. Lamina restriction of retinal ganglion cell dendrites and axons: Subtype-specific developmental patterns revealed with transgenic markers. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 1452–1462. [[CrossRef](#)]
34. Kay, J.N.; de la Huerta, I.; Kim, I.J.; Zhang, Y.; Yamagata, M.; Chu, M.W.; Meister, M.; Sanes, J.R. Retinal ganglion cells with distinct directional preferences differ in molecular identity, structure, and central projections. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 7753–7762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Srichai, M.B.; Colleta, H.; Gewin, L.; Matrisian, L.; Abel, T.W.; Koshikawa, N.; Seiki, M.; Pozzi, A.; Harris, R.C.; Zent, R. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) modulates water homeostasis in mice. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kajita, M.; Kinoh, H.; Ito, N.; Takamura, A.; Itoh, Y.; Okada, A.; Sato, H.; Seiki, M. Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: Isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts. *FEBS Lett.* **1999**, *457*, 353–356. [[CrossRef](#)]
37. Gauthier, M.C.; Racine, C.; Ferland, C.; Flamand, N.; Chakir, J.; Tremblay, G.M.; Laviolette, M. Expression of membrane type-4 matrix metalloproteinase (metalloproteinase-17) by human eosinophils. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 1667–1673. [[CrossRef](#)]
38. Paye, A.; Truong, A.; Yip, C.; Cimino, J.; Blacher, S.; Munaut, C.; Cataldo, D.; Foidart, J.M.; Maquoui, E.; Collignon, J.; et al. EGFR activation and signaling in cancer cells are enhanced by the membrane-bound metalloprotease MT4-MMP. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 6758–6770. [[CrossRef](#)]
39. Xiao, Y.; Li, B.; Liu, J. miRNA27a regulates arthritis via PPARgamma in vivo and in vitro. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 5454–5462.
40. Sourni, N.E.; Paye, A.; Host, L.; Noel, A. MT-MMPS as Regulators of Vessel Stability Associated with Angiogenesis. *Front. Pharmacol.* **2011**, *2*, 111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Li, W.; Li, Q.; Jiao, Y.; Qin, L.; Ali, R.; Zhou, J.; Ferruzzi, J.; Kim, R.W.; Geirsson, A.; Dietz, H.C.; et al. Tgfr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 755–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Scatena, M.; Liaw, L.; Giachelli, C.M. Osteopontin: A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 2302–2309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Isoda, K.; Nishikawa, K.; Kamezawa, Y.; Yoshida, M.; Kusuhara, M.; Moroi, M.; Tada, N.; Ohsuzu, F. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ. Res.* **2002**, *91*, 77–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gao, H.; Steffen, M.C.; Ramos, K.S. Osteopontin regulates alpha-smooth muscle actin and calponin in vascular smooth muscle cells. *Cell Biol. Int.* **2012**, *36*, 155–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Giachelli, C.; Bae, N.; Lombardi, D.; Majesky, M.; Schwartz, S. Molecular cloning and characterization of 2B7, a rat mRNA which distinguishes smooth muscle cell phenotypes in vitro and is identical to osteopontin (secreted phosphoprotein I, 2aR). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *177*, 867–873. [[CrossRef](#)]
46. Frischhertz, B.P.; Shamszad, P.; Pedroza, C.; Milewicz, D.M.; Morris, S.A. Thoracic aortic dissection and rupture in conotruncal cardiac defects: A population-based study. *Int. J. Cardiol.* **2015**, *184*, 521–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ahmad, M.M.; Kiani, I.A.; Ammar, K.A.; Ahmad, M.N.; Khandheria, B.K.; Paterick, T.E.; Jain, R.; Tajik, A.J. Ascending Aortic Aneurysm Is an Inherited Disease: A Contemporary Literature Review Based on Hill's Criteria of Specificity, Strength of Association, and Biological Coherence. *Cardiol. Rev.* **2017**, *25*, 268–278. [[CrossRef](#)]
48. Wang, Y.; Yu, S.J.; Li, Y.X.; Luo, H.S. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-17 and -25 in gastric cancer. *Oncol. Lett.* **2015**, *9*, 671–676. [[CrossRef](#)]
49. Gencer, S.; Cebeci, A.; Irmak-Yazicioglu, M.B. Matrix metalloproteinase gene expressions might be oxidative stress targets in gastric cancer cell lines. *Chin. J. Cancer Res.* **2013**, *25*, 322–333.
50. Chen, J.; Somanath, P.R.; Razorenova, O.; Chen, W.S.; Hay, N.; Bornstein, P.; Byzova, T.V. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 1188–1196. [[CrossRef](#)]
51. Hawighorst, T.; Velasco, P.; Streit, M.; Hong, Y.K.; Kyriakides, T.R.; Brown, L.F.; Bornstein, P.; Detmar, M. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: A novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J.* **2001**, *20*, 2631–2640. [[CrossRef](#)]
52. Fears, C.Y.; Grammer, J.R.; Stewart, J.E., Jr.; Annis, D.S.; Mosher, D.F.; Bornstein, P.; Gladson, C.L. Low-density lipoprotein receptor-related protein contributes to the antiangiogenic activity of thrombospondin-2 in a murine glioma model. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9338–9346. [[CrossRef](#)]
53. Salz, T.; Deng, C.; Pampo, C.; Siemann, D.; Qiu, Y.; Brown, K.; Huang, S. Histone Methyltransferase hSETD1A Is a Novel Regulator of Metastasis in Breast Cancer. *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 461–469. [[CrossRef](#)]

54. Yip, C.; Foidart, P.; Somja, J.; Truong, A.; Lienard, M.; Feyereisen, E.; Schroeder, H.; Gofflot, S.; Donneau, A.F.; Collignon, J.; et al. MT4-MMP and EGFR expression levels are key biomarkers for breast cancer patient response to chemotherapy and erlotinib. *Br. J. Cancer* **2017**, *116*, 742–751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Foidart, P.; Yip, C.; Radermacher, J.; Lienard, M.; Blacher, S.; Montero-Ruiz, L.; Maquoi, E.; Montaudon, E.; Chateau-Joubert, S.; Collignon, J.; et al. Expression of MT4-MMP, EGFR and RB in triple negative breast cancer strongly sensitizes tumors to erlotinib and palbociclib combination therapy. *Clin. Cancer Res.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Whittaker, M.; Floyd, C.D.; Brown, P.; Gearing, A.J. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2735–2776. [[CrossRef](#)]
57. Sun, J.; Stetler-Stevenson, W.G. Overexpression of tissue inhibitors of metalloproteinase 2 up-regulates NF-kappaB activity in melanoma cells. *J. Mol. Signal.* **2009**, *4*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Sounni, N.E.; Rozanov, D.V.; Remacle, A.G.; Golubkov, V.S.; Noel, A.; Strongin, A.Y. Timp-2 binding with cellular MT1-MMP stimulates invasion-promoting MEK/ERK signaling in cancer cells. *Int. J. Cancer* **2010**, *126*, 1067–1078. [[CrossRef](#)]
59. Emonard, H.; Duca, L.; Dedieu, S. Editorial: Matricellular Receptors As Potential Targets in Anti-Cancer Therapeutic Strategies. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 95. [[CrossRef](#)]
60. Falardeau, P.; Champagne, P.; Poyet, P.; Hariton, C.; Dupont, E. Neovastat, a naturally occurring multifunctional antiangiogenic drug, in phase III clinical trials. *Semin. Oncol.* **2001**, *28*, 620–625. [[CrossRef](#)]
61. Huang, X.; Chen, S.; Xu, L.; Liu, Y.; Deb, D.K.; Plataniias, L.C.; Bergan, R.C. Genistein inhibits p38 map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3470–3478. [[CrossRef](#)]
62. Kousidou, O.C.; Mitropoulou, T.N.; Roussidis, A.E.; Kletsas, D.; Theocharis, A.D.; Karamanos, N.K. Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Int. J. Oncol.* **2005**, *26*, 1101–1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Coussens, L.M.; Fingleton, B.; Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science* **2002**, *295*, 2387–2392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Cathcart, J.; Pulkoski-Gross, A.; Cao, J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. *Genes Dis.* **2015**, *2*, 26–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Amar, S.; Fields, G.B. Potential clinical implications of recent matrix metalloproteinase inhibitor design strategies. *Expert Rev. Proteomics* **2015**, *12*, 445–447. [[CrossRef](#)]
66. Zhou, N.; Paemen, L.; Opendakker, G.; Froyen, G. Cloning and expression in Escherichia coli of a human gelatinase B-inhibitory single-chain immunoglobulin variable fragment (scFv). *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 562–566. [[CrossRef](#)]
67. Devy, L.; Huang, L.; Naa, L.; Yanamandra, N.; Pieters, H.; Frans, N.; Chang, E.; Tao, Q.; Vanhove, M.; Lejeune, A.; et al. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 1517–1526. [[CrossRef](#)]
68. Naito, S.; Takahashi, T.; Onoda, J.; Yamauchi, A.; Kawai, T.; Kishino, J.; Yamane, S.; Fujii, I.; Fukui, N.; Numata, Y. Development of a neutralizing antibody specific for the active form of matrix metalloproteinase-13. *Biochemistry* **2012**, *51*, 8877–8884. [[CrossRef](#)]
69. Kessenbrock, K.; Plaks, V.; Werb, Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **2010**, *141*, 52–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Mason, S.D.; Joyce, J.A. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 228–237. [[CrossRef](#)]
71. Itoh, Y. MT1-MMP: A key regulator of cell migration in tissue. *IUBMB Life* **2006**, *58*, 589–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Pahwa, S.; Stawikowski, M.J.; Fields, G.B. Monitoring and Inhibiting MT1-MMP during Cancer Initiation and Progression. *Cancers* **2014**, *6*, 416–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Delatte, B.; Wang, F.; Ngoc, L.V.; Collignon, E.; Bonvin, E.; Deplus, R.; Calonne, E.; Hassabi, B.; Putmans, P.; Awe, S.; et al. RNA biochemistry. Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine. *Science* **2016**, *351*, 282–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Annexe 2 : Article issu de la collaboration avec l'équipe du Docteur Elisabetta Marangoni

Cancer Therapy: Preclinical

Clinical
Cancer
Research

Capecitabine Efficacy Is Correlated with TYMP and RB1 Expression in PDX Established from Triple-Negative Breast Cancers



Elisabetta Marangoni¹, Cécile Laurent¹, Florence Coussy^{1,2,3}, Rania El-Botty¹, Sophie Château-Joubert⁴, Jean-Luc Servely^{4,5}, Ludmilla de Plater¹, Franck Assayag¹, Ahmed Dahmani¹, Elodie Montaudon¹, Fariba Nemat¹, Justine Fleury¹, Sophie Vacher³, David Gentien¹, Audrey Rapinat¹, Pierre Foidart⁶, Nor Eddine Sounni⁶, Agnès Noel⁶, Anne Vincent-Salomon⁷, Marick Lae⁷, Didier Decaudin^{1,2}, Sergio Roman-Roman¹, Ivan Bièche³, Martine Piccart⁸, and Fabien Reyat^{1,9,10}

Abstract

Purpose: Triple-negative breast cancer (TNBC) patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy have a poor outcome. We developed patient-derived xenografts (PDX) from residual tumors to identify efficient chemotherapies and predictive biomarkers in a context of resistance to anthracyclines- and taxanes-based treatments.

Experimental Design: PDX were established from residual tumors of primary breast cancer patients treated in neoadjuvant setting. TNBC PDX were treated by anthracyclines, taxanes, platin, and capecitabine. Predictive biomarkers were identified by transcriptomic and immunohistologic analysis. Downregulation of *RB1* was performed by siRNA in a cell line established from a PDX.

Results: Residual TNBC PDX were characterized by a high tumor take, a short latency, and a poor prognosis of the corresponding patients. With the exception of *BRCA1/2*-mutated

models, residual PDX were resistant to anthracyclines, taxanes, and platin. Capecitabine, the oral prodrug of 5-FU, was highly efficient in 60% of PDX, with two models showing complete responses. Prior treatment of a responder PDX with 5-FU increased expression of thymidylate synthase and decreased efficacy of capecitabine. Transcriptomic and IHC analyses of 32 TNBC PDX, including both residual tumors and treatment-naïve derived tumors, identified *RB1* and *TYMP* proteins as predictive biomarkers for capecitabine response. Finally, *RB1* knockdown in a cell line established from a capecitabine-responder PDX decreased sensitivity to 5-FU treatment.

Conclusions: We identified capecitabine as efficient chemotherapy in TNBC PDX models established from residual disease and resistant to anthracyclines, taxanes, and platin. *RB1* positivity and high expression of *TYMP* were significantly associated with capecitabine response. *Clin Cancer Res*; 24(11); 2605–15. ©2018 AACR.

Introduction

Triple-negative breast carcinomas (TNBC), which are negative for estrogen/progesterone (ER/PR) receptor expression and

lack HER2 overexpression, account for 15% to 20% of breast cancers. TNBC differ from other subtypes of breast cancer in terms of axillary lymph node involvement, locoregional recurrence, time to metastasis (these patients have a high risk of early relapse and much lower survival in the first three to 5 years after treatment) and patterns of distant recurrence (1). TNBC is emerging as a highly heterogeneous disease in terms of histologic features, clinical behavior and sensitivity to systemic treatments (1). It constitutes a major clinical challenge, as there have been no major improvements in the treatment of this subgroup of tumors, apart from chemotherapy (anthracycline- and taxane-based chemotherapy regimens), which has reduced mortality by about 30% (2).

Cytotoxic chemotherapy is currently the only treatment option for TNBC. For TNBC patients, a pathologic complete response (pCR) to neoadjuvant chemotherapy (NAC) is associated with prolonged overall and event-free survival times (3–5). Although the rate of pCR following standard NAC is significantly higher for TNBC as than for the other breast cancer subtypes, more than 50% of TNBC patients treated in the neoadjuvant setting have residual disease and are associated with an increased risk of distant recurrence, particularly during the first 3 years after treatment, and a poor outcome. This paradox may be explained by the presence of residual disease in more than half the patients

¹Translational Research Department, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France. ²Medical Oncology Department, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France. ³Genetics Department, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France. ⁴BioPôle Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France. ⁵INRA, PHASE Department, Paris, France. ⁶Laboratory of Tumor and Developmental Biology, Groupe Interdisciplinaire de Génomique Appliquée-Cancer (GIGA-Cancer), University of Liège, Liège, Belgium. ⁷Department of Pathology, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France. ⁸Department of Medical Oncology, Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium. ⁹Surgery Department, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France. ¹⁰Translational Research Department, INSERM, U932, Immunity and Cancer, Institut Curie, PSL Research University, 26, rue d'Ulm, Paris, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Elisabetta Marangoni, Translational Research Department, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75005, France. Phone: 33-1-56-24-62-42; Fax: 33-1-56-24-63; E-mail: elisabetta.marangoni@curie.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3490

©2018 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Residual disease after neoadjuvant chemotherapy is associated with poor outcome in triple-negative breast cancer (TNBC) patients. There is no standard of care for adjuvant treatment for these patients, and chemotherapy in the metastatic setting is of limited efficacy. We established a panel of PDX from breast residual tumors after neoadjuvant chemotherapy. We identified capecitabine as effective chemotherapy in TNBC PDX with cross-resistance to anthracyclines, taxanes, and platin. Prior treatment of PDX by 5-FU resulted in increased thymidylate synthase expression and decreased capecitabine efficacy. Molecular analyses identified RB1 and TYMP proteins as predictive biomarkers of capecitabine response. In addition, a pharmacodynamic analysis of post-treatment tumors showed strong inhibition of RB1-dependent genes in capecitabine responder tumors. These results suggest that RB1 and TYMP expression in residual breast tumors may help to identify patients more likely to respond to capecitabine in adjuvant or metastatic setting.

(>60%). At present, there is no standard of care for adjuvant treatment in TNBC patients with residual disease after NAC, and chemotherapy in patients with metastatic disease is of limited efficacy.

Preclinical studies focusing on residual tumors after NAC could provide an important tool to identify efficient therapies and predictive biomarkers in tumors showing resistance to NAC (6). In this study, we established patient-derived xenografts (PDX) from residual breast tumors after NAC and found that capecitabine was an effective chemotherapy agent in 60% of TNBC models. We also identified the expression of thymidylate phosphorylase (TYMP) and RB1 as biomarkers predictive of the response to capecitabine.

Materials and Methods

Patient-derived xenografts

Female Swiss nude mice were purchased from Charles River Laboratories and maintained under specific pathogen-free conditions. Their care and housing were in accordance with institutional guidelines and the rules of the French Ethics Committee (project authorization no. 02163.02). PDX were established from primary breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy, with informed consent from the patient, in accordance with published protocols (7, 8). For 2 patients (#90 and #95), xenografts were established from a local breast cancer recurrence treated by NAC. These two patients were excluded from the disease-free survival analysis.

Histology and IHC status (ER, PR, and HER2) was determined for the PDX and compared with that of the patient tumors, as described elsewhere (7, 9). The PDX derived from primary tumors have been described elsewhere (7, 8, 10).

Adriamycin (DOX, doxorubicin, Teva Pharmaceuticals), docetaxel (Sanofi Aventis), cisplatin (CDDP, Teva), and cyclophosphamide (Endoxan, Baxter) were administered by the intraperitoneal (i.p.) route, at doses of 2, 20, 6, and 100 mg/kg, respectively, every 3 weeks. Capecitabine (Xeloda, Roche Laboratories) was administered per os at a dose of 540 mg/kg/day, q5d × 6

weeks. Paclitaxel (Fresenius Kabi) was administered weekly, at a dose of 20 mg/kg (i.p.), and bevacizumab (Roche) was administered at a dose of 10 mg/kg (i.p.) every 3 weeks. Trastuzumab (Roche) was administered weekly, at a dose of 10 mg/kg. Fluorouracil (5-FU; Fresenius Kabi) was administered at a dose of 50 mg/kg (i.p.) and navelbine (Pierre Fabre Laboratories) was administered at a dose of 3 mg/kg (i.v.) every 2 weeks. The doses for drug combinations were determined in tolerance studies, based on human equivalences (11) and clinical schedules.

Relative tumor volumes (RTV) and the percent tumor growth inhibition (TGI) were calculated as previously described (7). Kaplan–Meier survival analysis was performed on HBCx-95 xenografts treated with various chemotherapy regimens, with GraphPad Prism software. An event was defined as a quadrupling of tumor volume from the initial tumor volume (12).

Percent change in tumor volume was calculated for each tumor as $(V_f - V_0/V_0) \times 100$, where V_0 is the initial volume (at the beginning of treatment) and V_f is the final volume (at the end of treatment). Tumor regression (R) was defined as a decrease in tumor volume of at least 50% taking as reference the baseline tumor volume; at least a 35% increase in tumor volume identified progressive disease (PD) and responses that were between +35% and –50% were considered as stable disease (SD; ref. 13).

Categorical variables were analyzed with the Fisher exact test. The statistical significance of TGI was determined in Mann–Whitney *U* tests.

Statistical analysis of the patients' clinical data

We analyzed the clinical parameters of 12 patients in the residual disease group (2 patients receiving neoadjuvant chemotherapy for local breast cancer relapse were excluded) and 30 patients in the primary tumor group.

The clinical data for the patients are expressed as frequencies for qualitative variables or medians and associated range for quantitative variables. They were compared in χ^2 or Fisher exact tests, as appropriate. Disease-free probabilities were estimated by the Kaplan–Meier method, and survival curves were compared in log-rank tests. Analyses were performed with survival and ggplot2 R libraries.

Targeted next-generation sequencing

DNA extraction and targeted next-generation sequencing of TP53, BRCA1, and BRCA2 were performed by the ICGex NGS platform of Institut Curie, as previously described (14). Germline BRCA1 and BRCA2 mutations (BRCA1: p.E849X; BRCA2: p.T1282fs) were present in both the initial tumors and the PDX.

RNA extraction and RT-PCR analysis

RNA extraction and RT-qPCR were performed as previously described (10, 15). For gene normalization, we used the human TATA box-binding protein (TBP, GeBbank accession no. NM_003194). We used protocols for cDNA synthesis and PCR amplification described in detail elsewhere (16, 17). The results are expressed as N-fold differences in target gene expression relative to the TBP gene. In the pharmacodynamics analysis, these N-fold differences values for each xenograft were subsequently normalized to yield a median value of 1 for the control xenograft group.

Microarray data analysis

GeneChip Human 1.1 ST arrays were hybridized according to Affymetrix recommendations, using the Ambion WT Expression

Kit protocol (Life Technologies) and Affymetrix labeling and hybridization kits. All analyses were performed with R software (version 3.3; R Core Team 2017) and Bioconductor packages (version 3.4; ref. 18). Arrays were normalized according to the RMA normalization procedure from the oligo package (19). Differential expression between PDX responding and resistant to capecitabine was assessed by a linear model method, with the Limma package (20). We used the false discovery rate (FDR) procedure to adjust for multiple testing. We considered log fold changes in expression > 1.5 , and P values < 0.05 to be statistically significant.

RB1 silencing and cell proliferation assays

The HBCc-12A cell line was established from the residual TNBC PDX HBCc-12A by mechanical dissociation and removal of cellular debris and erythrocytes. The HBCc-12A cell line and the HBCc-12A PDX were genotyped with the GenePrint 10 System (#B9510, Promega) that allows coamplification and three-color detection of nine human loci. The cell line was grown at 37°C in DMEM Glutamax medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin–streptomycin, 1% Heps buffer, 1% sodium pyruvate, and 10 µg/mL insulin (Sigma).

HBCc-12A cells were transfected with 20 nmol/L siRNA against RB1 (SI00007091, QIAGEN) and AllStars siRNA as negative control (SI03650318, QIAGEN) using INTERFERin reagent (POL409-50, Ozyme) in Opti-MEM medium (Life Technologies), according to the manufacturers' instructions.

Cells were plated in duplicate into 96-well culture plates at a density of 7×10^3 cells per well and left overnight. siRNA and 5-FU were added 24 and 30 hours after seeding, and on day 5, cell proliferation was determined by the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT; M-2128, Sigma).

Western blot

For Western blot analyses, 115×10^3 HBCc-12A cells were plated into 6-well culture plates. siRNA and 5-FU were added at the same concentrations and timelines of MTT proliferation assays. Proteins were extracted as described previously (8). Lysates were resolved on 4% to 12% TGX gels (Bio-Rad), transferred into nitrocellulose membranes (Bio-Rad), and immunoblotted with rabbit antibodies against GAPDH (#2118, Cell Signaling Technology), RB1 (#9309, Cell Signaling Technology), p-RB1 (#9308, Cell Signaling Technology). After washes, membranes were incubated with the appropriate secondary antibodies horseradish peroxidase–conjugated affinity-purified goat anti-rabbit (111-035-045, The Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.).

IHC

Xenografted tumors were fixed in 10% neutral-buffered formalin, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. Immunostaining was performed on a Discovery XT Platform (Ventana Medical System, part of Roche Diagnostics; ref. 17). The slides were incubated with a polyclonal rabbit antibody against TYMP (#HPA001072, Sigma), a monoclonal mouse antibody against RB1 (#9309, clone 4H1, Cell Signaling Technology), and a monoclonal rabbit antibody against TYMS (#9045, Ozyme). Slides immunostained with mouse and rabbit IgG were used as negative controls. Slides were incubated with anti-rabbit/mouse secondary antibodies (horseradish peroxidase complex) and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) as the sub-

strate for color development (ChromoMap Kit with Anti-rabbit OmniMap, Ventana Medical System). TYMP immunostaining was assessed by determining the intensity and distribution of stained cancer cells, as previously described (21). Immunostaining intensity was scored as follows: 0, negative staining; 1, weak staining; 2, moderate staining; and 3, strong staining. Immunostaining intensity scores were grouped into three classes, as follows: (i) $\leq 33\%$ of the tumor cells stained; (ii) 33% to 66% of the tumor cells stained; and (iii) 66% to 100% of the tumor cells stained. Summed scores were also obtained by adding the scores for two parameters (21).

Results

Residual tumors are characterized by high take rates and poor survival of the corresponding patients

We established 22 PDX by transplanting 53 breast tumors from patients with residual disease after NAC. The take rates for the ER⁺, HER2⁺, and triple-negative subtypes were 23%, 22%, and 78%, respectively (Supplementary Table S1). When compared with PDX derived from treatment-naïve primary tumors, previously reported (7, 9), take rates of residual tumors were higher for ER⁺ and triple-negative subtypes (Fig. 1A; Supplementary Table S1). In the TNBC group, median PDX latency after engraftment was 67 days for residual tumors, versus 160 days for treatment-naïve primary tumors (Fig. 1B). With a high tumor take and a short latency, residual TNBC PDX may provide an opportunity for preclinical testing of anticancer agents prior to relapse in patients. We therefore retrospectively compared the metastasis-free survival (MFS) of the patients with the latency periods of the 14 PDX established from the residual tumors (Fig. 1C). Ten of these patients presented a recurrence of metastatic disease, 3 remain metastasis free and 1 died 5 months after mastectomy (HBC-12A, an 89-year-old patient). PDX latencies were considerably shorter than MFS for 8 patients ($P = 0.021$, paired t test).

The clinical characteristics of patients in the residual disease and primary tumors groups are summarized in Supplementary Table S2; Supplementary Fig. S1. Prognosis was worse in the residual disease group of patients, for whom survival was 28% at 25 months, versus 75% for the patients in the primary tumor group ($P = 0.048$, log-rank test; Fig. 1D).

These results highlight the aggressive phenotype of residual tumors, with high tumor take rates, a short tumor latency during PDX establishment, and low survival of the corresponding patients.

Residual tumor PDX are resistant to anthracyclines, docetaxel, and cisplatin, but respond to capecitabine

We determined the response to chemotherapy in 10 PDX derived from residual tumors and compared this response with that of PDX derived from primary tumors (7). The chemotherapy regimens used were AC (adriamycin plus cyclophosphamide), docetaxel, cisplatin, and capecitabine. Only 10%, 20%, and 0% of residual TNBC PDX responded to AC, cisplatin, and docetaxel, with a TGI of at least 90%, whereas 50%, 52%, and 10% of treatment-naïve TNBC PDX responded to these treatments (Fig. 1E). Conversely, residual TNBC PDX displayed a higher frequency of response to capecitabine (60%) as compared with treatment-naïve PDX (36%).

Table 1 summarizes the NAC administered to patients, tumor histology, status for BRCA1/2 and TP53 mutations, and response

Marangoni et al.

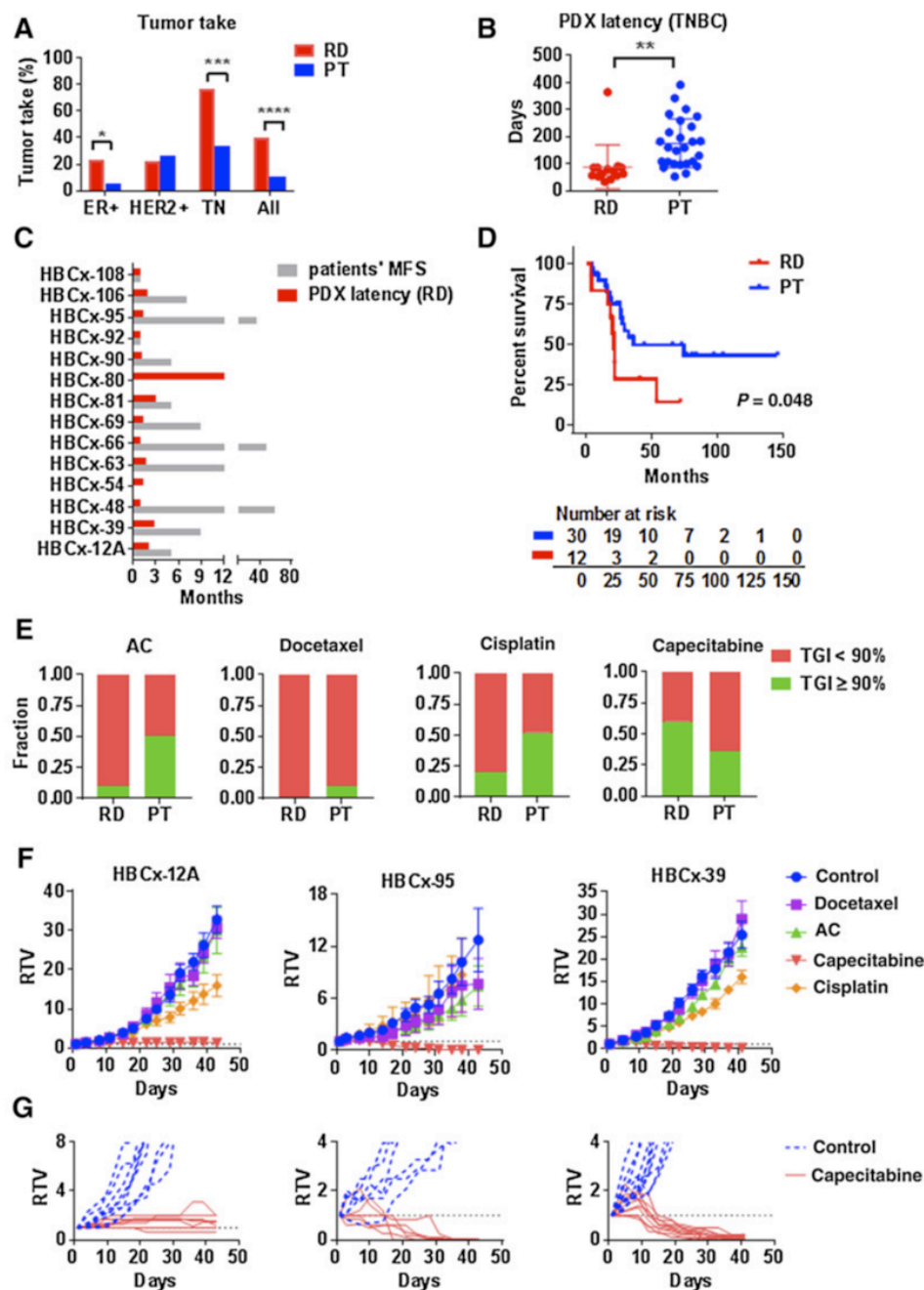


Figure 1.

Comparison between residual disease-derived PDX (RD) and primary tumor-derived PDX (PT). **A**, Percent tumor take in nude mice for residual tumors ($n = 53$) and primary tumors ($n = 919$), by breast cancer subtype. *, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$ (Fisher exact test). **B**, Latency of TNBC PDX defined as the number of days between transplantation of the tumor and first outgrowth. **, $P < 0.001$ (unpaired t test). **C**, MFS of patients compared with PDX latencies in the residual disease group. MFS was defined as the time from surgery to the diagnosis of metastasis. **D**, Kaplan-Meier disease-free survival curves for patients in residual disease (RD) and primary tumors (PT) groups. **E**, Drug response of residual TNBC PDX as compared with primary tumors derived PDX: fraction of PDX models with a TGI $\geq 90\%$ or $< 90\%$ after 2 cycles of chemotherapy (AC, docetaxel, cisplatin, and capecitabine, one cycle lasts 3 weeks). $n = 10$ PDX and $n = 22$ PDX in residual disease and primary tumors groups, respectively. **F**, Drug response curves of 3 residual TNBC PDX (HBCx-12A, HBCx-95, and HBCx-39) treated by AC, docetaxel, cisplatin, and capecitabine (two 3-week cycles). Mean of relative tumor volume (8–10 xenografts per group) \pm SD. **G**, Individual tumor growth curves in control- and capecitabine-treated xenografts.

Table 1. Histology, mutation, and response to chemotherapy in TNBC PDX derived from residual tumors after neoadjuvant chemotherapy

PDX	Neoadjuvant treatment of TNBC patients	Tumor histology	TP53 and BRCA1/2 mutations	PDX response: % TGI and RECIST criteria			
				AC	Docetaxel	Cisplatin	Capecitabine
HBCx-12A	Docetaxel	IDC	None	44 (PD)	28 (PD)	0 (PD)	96 (SD)
HBCx-39	EC + docetaxel	IDC	TP53	36 (PD)	0 (PD)	16 (PD)	98 (R)
HBCx-48	FEC docetaxel	IDC	TP53	30 (PD)	0 (PD)	40 (PD)	37 (PD)
HBCx-63	FEC docetaxel	IDC	TP53	74 (PD)	30 (PD)	86 (PD)	96 (SD)
HBCx-66	FEC docetaxel	MBC	BRCA1	94 (R)	0 (PD)	98 (R)	41.4 (PD)
HBCx-69	FEC docetaxel	MBC	TP53	31 (PD)	50 (PD)	64 (PD)	55 (PD)
HBCx-92	EC docetaxel	IDC	BRCA2	74 (PD)	30 (PD)	90 (PD)	93 (SD)
HBCx-90	Paclitaxel	MBC	TP53	81 (PD)	35 (PD)	89 (PD)	0 (PD)
HBCx-95	FEC docetaxel	IDC	None	0 (PD)	32 (PD)	50 (PD)	100 (R)
HBCx-106	FEC docetaxel	IDC	TP53	75 (PD)	43 (PD)	69 (PD)	90 (SD)

Abbreviations: AC, adriamycin + cyclophosphamide; CR, complete response; FEC, 5-FU, epirubicin, cyclophosphamide; IDC, invasive ductal carcinoma; MBC, metaplastic breast cancer; PD, progressive disease; R, regression; SD, stable disease; TGI, tumor growth inhibition.

to chemotherapy, as assessed by TGI and adapted RECIST criteria (13), for 10 residual TNBC PDX.

Only one residual PDX responded to AC with a TGI \geq 90%, none responded to docetaxel and two (one with a BRCA1 mutation and the other with a BRCA2 mutation) responded to cisplatin (with tumor regression observed in only one of these cases; Table 1 and Supplementary Fig. S2A).

Six of the 10 residual PDX responded to capecitabine with a TGI \geq 90: 4 (HBCx-12A, HBCx-63, HBCx-92, and HBCx106) with SD and 2 models with tumor regression (HBCx-39 and HBCx-95; Table 1). Three of the four capecitabine-resistant PDX corresponded to metaplastic breast cancer. The drug response profiles of 3 capecitabine-responder PDX are illustrated in Fig. 1F. Response to capecitabine was homogeneous in the different mice (Fig. 1G). HBCx-95 capecitabine-treated xenografts showed complete responses at day 40: the xenografts of this model were monitored for 10 months after the end of treatment. A Kaplan–Meier survival curve (Supplementary Fig. S2B) showed that event-free survival was greater for animals treated with capecitabine than for animals receiving other types of chemotherapy ($P = 0.0004$, log-rank test).

The efficacy of capecitabine in PDX is decreased by prior treatment

In the advanced setting, capecitabine is usually administered as a second-line or third-line treatment. We hypothesized that prior treatment of tumors with a different chemotherapy regimen might affect the response to capecitabine. We tested this hypothesis in one residual TNBC PDX, through the sequential administration of chemotherapies administered to the patient in the adjuvant and metastatic settings. Patient #63 received FEC and docetaxel as NAC, followed by 5-FU and navelbine as an adjuvant treatment, then paclitaxel + bevacizumab (first line) and capecitabine (second line) in the metastatic setting (Fig. 2A). We administered the same treatments sequentially to the HBCx-63 PDX, established from the residual tumor, and compared it with the efficacy of capecitabine in non pretreated tumor. Results are shown in Fig. 2B: capecitabine given in xenografts pretreated by 5-FU + navelbine or by paclitaxel + bevacizumab resulted in PD in 4 of 5 and 6 of 6 xenografts (mean of 144% and 130%, respectively). By contrast, 7 of 9 xenografts treated with capecitabine without prior treatment displayed SD, 1 PD and 1 tumor regression (mean = 14%). Thus, prior treatment by 5-FU and navelbine decreased capecitabine efficacy.

We next analyzed the expression of two enzymes whose expression may influence capecitabine response: thymidylate synthase (TYMS), the target enzyme for 5-FU, and TYMP, an enzyme involved in the metabolism of 5-FU and capecitabine (22). TYMS expression was increased after treatment by 5-FU and navelbine, and this increase was maintained in xenografts treated by paclitaxel and bevacizumab (Fig. 2C). By contrast, TYMP expression was unchanged by the different treatments (data not shown).

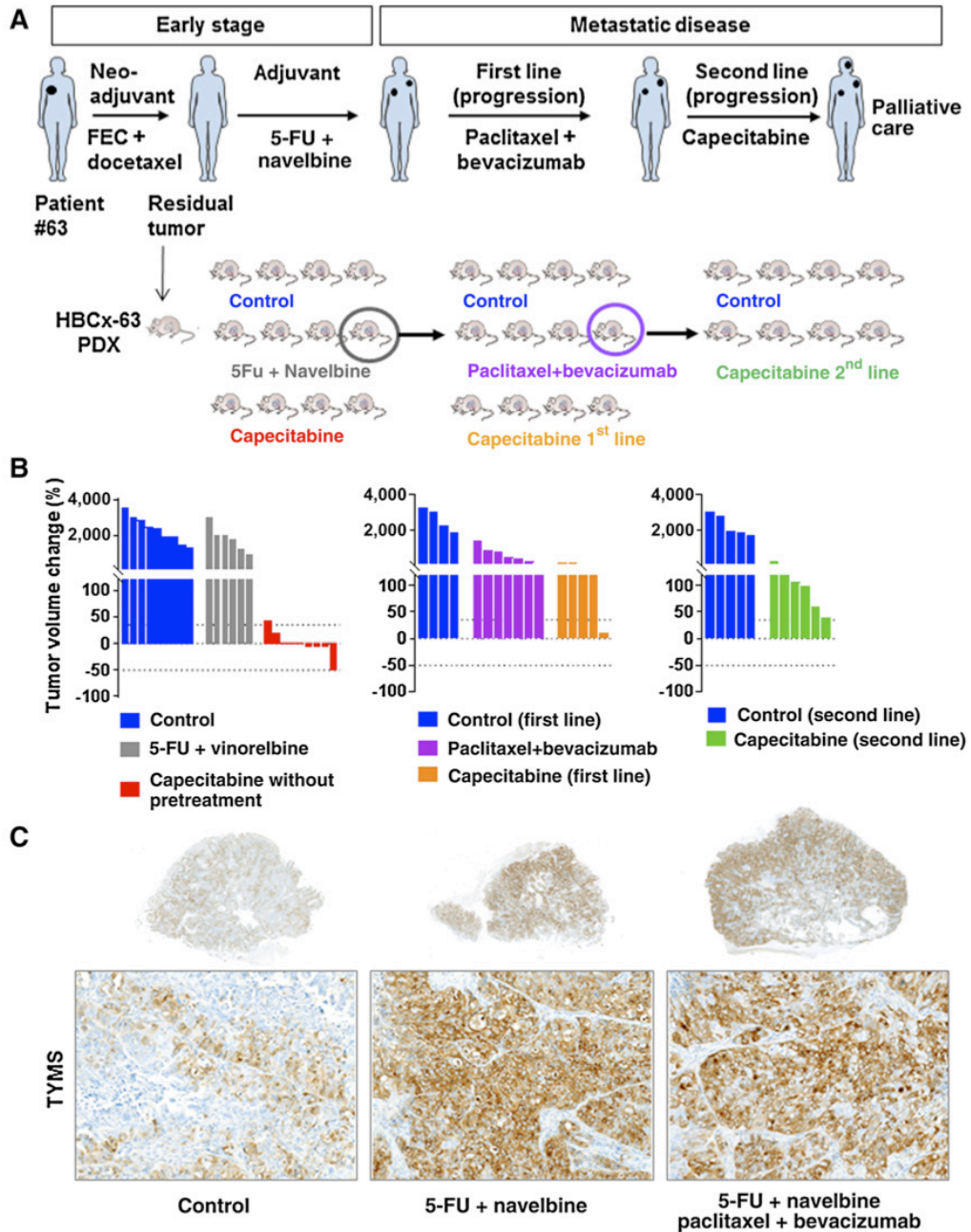
Antitumor activity of capecitabine is significantly correlated with expression of RB1 and TYMP proteins in a large panel of breast cancer PDX

For the identification of markers predictive of capecitabine response, we combined the capecitabine response data for 10 residual TNBC PDX with those obtained from 22 primary tumor-derived TNBC PDX previously determined (unpublished data). The responses to capecitabine treatment of the 32 TNBC PDX are represented as waterfall plots in Fig. 3A: in 15 PDX, capecitabine treatment resulted in SD or tumor regression, whereas in the other 17 PDX, it resulted in PD. To identify genes associated with the capecitabine response, we performed a differential analysis of gene expression microarray datasets available for 25 TNBC PDX (15 resistant and 10 sensitive). Hierarchical clustering based on 37 genes (17 upregulated and 20 downregulated in sensitive PDX) grouped 100% of sensitive PDX together (Fig. 3B). The 37 genes concerned are listed in Supplementary Table S3. Three of these genes encode proteins involved in cell-cycle regulation: *RB1* and *CCND1*, which were upregulated in responder models, and *CDKN2A*, which was upregulated in resistant models. Among genes implicated in capecitabine metabolism (*TYMP*, *TYMS*, *TK1*, and *DPYD*), only *TYMP* expression was higher in responder models, although the fold change did not pass the threshold for global differential analysis (Supplementary Fig. S3).

To validate *RB1* at the protein level, we analyzed its expression by IHC in the 32 TNBC PDX. *RB1* protein was detected in all 15 (100%) responder PDX and in 6 of 17 resistant (35%) PDX (Fig. 3C and D). Positive and negative predictive values were 71% and 100%, respectively ($P = 0.0001$, Fisher exact test).

We then quantified *TYMP* protein expression in the 32 TNBC PDX by determining the IHC H-score (21). Examples of negative and positive *TYMP* IHC results are shown in Fig. 3E. Thymidine phosphorylase IHC H-score was significantly higher

Marangoni et al.

**Figure 2.**

Patient #63 history and PDX response to chemotherapy. **A**, Treatment of the patient and preclinical experiments on the HBCx-63 PDX. Patient #63 (59 years old) received four cycles of FEC100, followed by four cycles of docetaxel 100. At surgery, the HBCx-63 PDX was established from residual tumor tissue (Chevallier classification: grade 4). Lung metastases were diagnosed 11 months after surgery: the patient was treated with three cycles of paclitaxel plus bevacizumab (first line). There was no response to treatment, and the patient was switched onto second-line treatment with capecitabine (4 cycles). Metastatic disease progressed on capecitabine, with the occurrence of brain metastasis. The patient received carboplatin (third line) and then palliative care. The HBCx-63 PDX received the same sequence of treatment: 5-FU + navelbine, paclitaxel + bevacizumab, and capecitabine. **B**, Waterfall plots representing the percent change in tumor volume for HBCx-63 PDX treated with 5-FU + navelbine (adjuvant treatment), paclitaxel plus bevacizumab (first line), and capecitabine (second line). Two additional groups were added: capecitabine treatment of xenografts without prior treatment (adjuvant) and capecitabine treatment in xenografts previously treated with 5-FU + navelbine (first line). **C**, IHC analysis of TYMS (2.5 \times and 10 \times) in one representative xenograft of the control group, one xenograft treated by 5FU + navelbine and one xenograft treated by 5FU + navelbine followed by paclitaxel + bevacizumab. The IHC analysis was performed on 3 different xenografts per group.

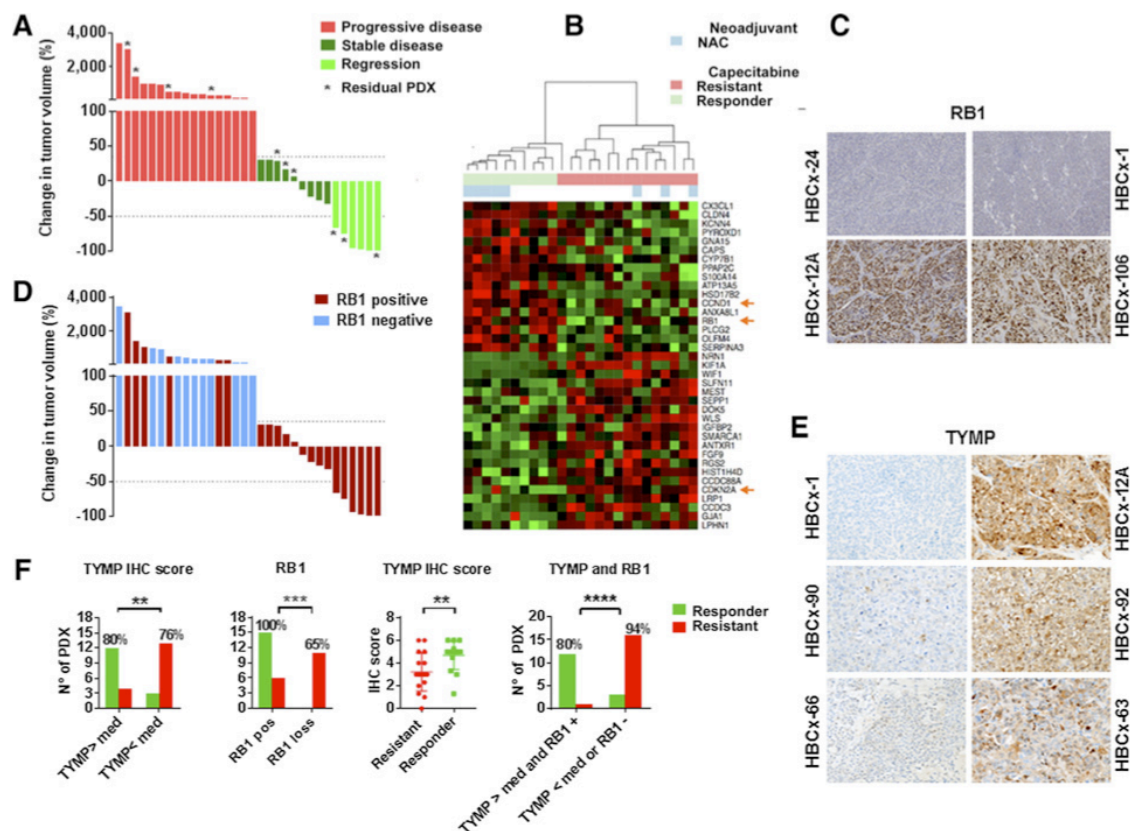


Figure 3.

Biomarker analysis of the capecitabine response in 32 TNBC PDX. **A**, Waterfall plot representing the capecitabine response in 32 TNBC PDX (10 derived from residual tumors and 22 from primary tumors). Each bar represents the median change in tumor volume from baseline in treated xenografts ($n = 8-10$) after two 3-week cycles of capecitabine treatment. Regression includes both partial responses and complete responses. **B**, Dendrogram (Ward linkage, Pearson distance) and heatmap based on genes differentially expressed between capecitabine-sensitive and capecitabine-resistant PDX. **C**, IHC analysis of RB1 expression in two resistant (HBCx-24 and HBCx-1) and two responding (HBCx-12A and HBCx-106) PDX (20X). **D**, Waterfall plot representing the capecitabine response in 32 TNBC PDX according to RB1 status. **E**, IHC analysis of TYMP expression in three resistant (HBCx-1, HBCx-90, and HBCx-66) and three responding (HBCx-92, HBCx-63, and HBCx-12A) PDX (20X). **F**, Association between TYMP H-score and the response to capecitabine in 32 TNBC PDX and combination of TYMP and RB1 biomarkers (Fisher exact test).

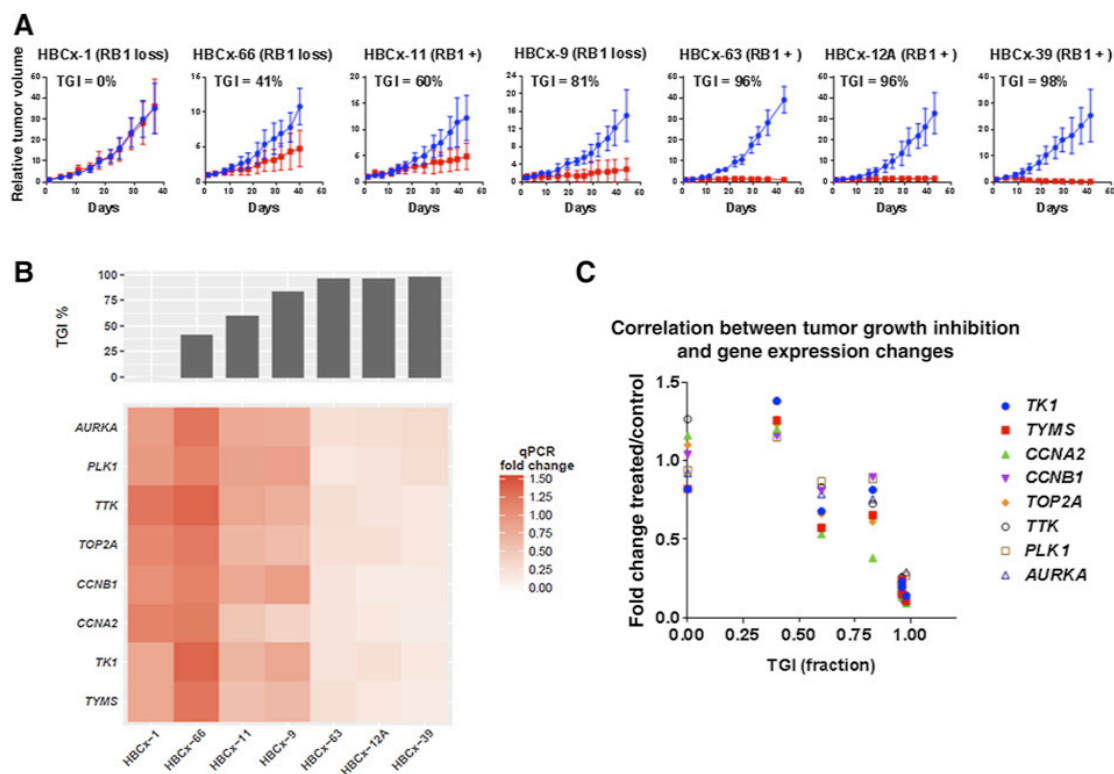
in responder tumors (Fig. 3F). Median TYMP IHC H-score was 4.25 (range, 0–6); 80% of the responding PDX had TYMP expression scores ≥ 4.25 and 76% of resistant PDX had scores < 4.25 . Positive and negative predictive values were 75% and 81%, respectively ($P = 0.0038$; Fisher exact test). Among the 6 RB1-positive PDX that did not respond to capecitabine, 5 showed no or low expression of TYMP (data not shown). The combination of RB1 positivity and a TYMP score > 4.25 had a positive predictive value of 92% and a negative predictive value of 100%, accurately predicting response in 12 of 15 xenografts and resistance in 8 of 17.

Finally, we assessed capecitabine efficacy in one PDX derived from a patient with HER2-positive breast cancer treated with trastuzumab in the preoperative setting (HBCx-73). The xenograft was RB1-positive and expressed high levels of TYMP (Supplementary Fig. S4A). Capecitabine had strong antitumor activity against this xenograft (TGI = 99%), whereas trastuzumab did not arrest tumor growth (Supplementary Fig. S4B).

TGI is correlated with a strong decrease in the expression of various RB1-dependent genes in capecitabine-treated xenografts

RB1 plays a critical role in coordinating the expression of genes required for cell-cycle progression through interaction with the transcription factor E2F. We therefore looked at the correlation between capecitabine's efficacy and the expression changes of 8 genes included in the "RB1 gene expression signature" and involved in cell proliferation (*CCNA2*, *CCNB1*, *TOP2A*, *TTK*, *PLK1*, and *AURKA*) and nucleotides metabolism (*TYMS* and *TK1*; ref. 23). We analyzed control and posttreatment xenografts of 7 PDX, including both capecitabine-resistant and capecitabine-sensitive PDX (Fig. 4A). The expression levels of the eight genes, determined by RT-PCR, are shown in Supplementary Fig. S5. A heatmap representing the fold-change difference between capecitabine-treated and control xenografts is shown in Fig. 4B. All genes were strongly downregulated in the three RB1-positive PDX with the highest levels of TGI (HBCx-63, HBCx-12A, and HBCx-

Marangoni et al.

**Figure 4.**

Analysis of the correlation between TGI and changes in the expression of RB1-dependent proliferation-associated genes. **A**, TGI curves for seven TNBC PDX. **B**, Percent TGI and heatmap representing fold changes in normalized expression gene expression between control and treated xenografts ($n = 4$) for eight RB1-dependent proliferation-associated genes: *AURKA*, *PLK1*, *TTK*, *TOP2A*, *CCNB1*, *CCNA2*, *TK1*, and *TYMS*. **C**, Plot of the correlation between fold changes in gene expression and TGI. The Spearman correlation P values obtained were as follows: 0.0056 (TK1), 0.0056 (TYMS), 0.0032 (CCNA2), 0.017 (CCNB1), 0.0032 (TOP2A), 0.0032 (TTK), 0.0349 (PLK1), and 0.0246 (AURKA).

39), whereas no change was found in the three PDX in which capecitabine had little or no effect. The correlation between fold-change differences in gene expression and TGI by capecitabine is shown in Fig. 4C and was statistically significant for all genes.

Inhibition of RB1 gene decreases response to 5-FU *in vitro*

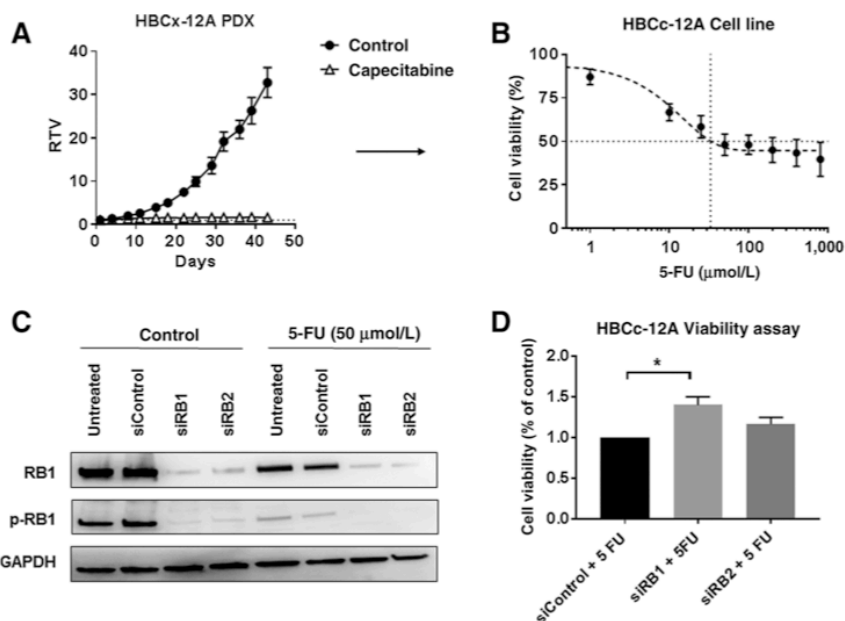
We tested whether RB1 inhibition could have an impact on capecitabine response in the HBCc-12A cell line, established from the RB1-positive HBCx-12A PDX (residual tumor-derived PDX). This PDX responds to capecitabine with a TGI of 96% (SD with RECIST criteria; Fig. 5A). We performed a cell viability assay to determine the *in vitro* response of the cell line to 5-FU: the cell line showed an IC_{50} of 33 $\mu\text{mol/L}$ (Fig. 5B). The cell line was then transfected with 2 different siRNA directed against *RB1* or control (scramble siRNA) and exposed to 40 $\mu\text{mol/L}$ of 5-FU for 120 hours. Western blot analysis demonstrated downregulation of RB1 protein in cell exposed to siRB1 and siRB2, with an increased inhibition for siRB1, in both untreated and 5-FU-treated cells (Fig. 5C). Phosphorylation of RB1 protein was inhibited by 5-FU. Inhibition of RB1 decreased sensitivity to 5-FU of 40% as assessed by the MTT viability assay (the increased viability was greater for siRB1 as compared with siRB2; Fig. 5D). In summary, these results show that RB1 has a role in determining the cellular response to 5-FU treatment.

Discussion

We established a cohort of breast cancer PDX models by engrafting residual tumors after NAC. Residual TNBC PDX had a higher tumor take rate and a shorter latency than TNBC PDX derived from treatment-naïve breast cancers. Both these characteristics are suggestive of an aggressive phenotype. These results are similar to those reported by McAuliffe and colleagues who showed that take rates were higher for breast cancers treated in the neoadjuvant setting (24). The aggressiveness of these tumors was confirmed by the poor outcomes of the corresponding patients. In more than half the TNBC patients, PDX latency was shorter than MFS. The residual tumor PDX therefore becomes available for *in vivo* drug testing over a time frame compatible with clinical decision-making concerning first-line chemotherapy. Furthermore, residual TNBC PDX were resistant to anthracyclines- and docetaxel-based chemotherapy. As these drugs were given to patients in the neoadjuvant setting, in which they were of limited efficacy, the resistance phenotype of the patients' tumors is maintained and reproduced in xenograft models. Residual tumor PDX were also resistant to cisplatin, with the exception of PDX established from BRCA1/2-mutated breast cancers. Despite the small size of this series of xenograft models, this finding indicates that residual tumors display a multidrug resistance phenotype

Figure 5.

siRNA-mediated inhibition of RB1 in a cell line established from the HBCx-12A PDX. **A**, *In vivo* response to capecitabine treatment of the residual HBCx-12A PDX. **B**, Cell viability assay of the HBCc-12A cell line treated by different concentration of 5-FU. The results are represented as the mean \pm SD from experiments replicated 3 times. **C**, Western blot analysis of HBCc-12A cells treated with siControl and two different siRNA against RB1 and 5-FU (40 μ mol/L). **D**, Cell viability assay of HBCc-12A cells treated by 5-FU and transfected with siControl, siRB1 and siRB2 siRNA. Results of 5-FU-treated cells are normalized on siControl, siRB1 and siRB2 untreated cells and represented as fold change from siControl. Experiments were replicated 3 times.



extending to different chemotherapy classes, including anthracyclines, cyclophosphamide, docetaxel, and cisplatin. It also suggests that patients with BRCA1- and BRCA2-mutated tumors may still respond to platin-based chemotherapies. The patient with the BRCA1-mutated tumor has not yet relapsed, and the patient carrying the BRCA2-mutated tumor displayed a partial response to six cycles of first-line treatment with paclitaxel and carboplatin. However, given the small number of cases, these results require confirmation in a larger cohort.

Responses to capecitabine were observed in 6 of the 10 residual tumor-derived PDX displaying cross-resistance to anthracyclines, docetaxel, and cisplatin. Three of the four capecitabine-resistant PDX were established from metaplastic breast cancers, a histologic subtype of TNBC known to be particularly aggressive and resistant to chemotherapy (25).

These findings are of particular interest for several reasons. First, they are consistent with the results of a recent clinical trial (CREATE-X) demonstrating the efficacy of adjuvant capecitabine treatment in TNBC patients with residual invasive disease after neoadjuvant chemotherapy (26). Second, capecitabine treatment is well tolerated and may be compatible with adjuvant treatment in patients with a high risk of tumor recurrence. The FinXX trial also reported beneficial effects on survival in TNBC patients treated with a capecitabine-containing regimen in the adjuvant setting (27).

In the CREATE-X trial, TNBC disease-free survival was 69.8% in the capecitabine group, versus 56.1% in the control group (26). Thus, a large proportion of patients remained that did not benefit from adjuvant capecitabine treatment. Predictive biomarkers are crucial for identifying the patients most likely to benefit from treatment.

Based on the analysis of transcriptomic data, we identified and validated RB1 as a biomarker predictive of the response to capecitabine in TNBC PDX. RB1 is a tumor suppressor protein that regulates cell-cycle progression by preventing entry into the mitotic phase (28). It may be inactivated by hyperphosphoryla-

tion or protein loss, both of which disrupt its association with the transcription factor E2F, facilitating the expression of a transcriptional program leading to progression through S-phase and mitosis (29). RB1 is also a key regulator of cell-cycle arrest upon DNA damage (30). The finding that capecitabine efficacy is correlated with RB1 expression may be explained by the role of this protein in cell-cycle control and the checkpoint response to chemotherapy. Consistent with this hypothesis, RB1 reconstitution in RB1-deficient lung cancer cell lines reestablishes the regulation of *RB1/E2F* target genes and restores the G₁ checkpoint response to chemotherapy regimens, including 5-FU (31). Similarly, inactivation of the *RB1* gene by siRNA in a cell line derived from a capecitabine-responder PDX decreased sensitivity to 5-FU, further supporting a role of RB1 in determining the response to 5-FU/capecitabine.

In addition to its role in canonical cell cycle-dependent regulation, RB1 also inhibits cell proliferation by regulating nucleotide metabolism by inhibiting enzymes involved in dNTP synthesis. The absence of functional RB1 leads to a deregulation of the expression of dNTP enzymes (such as TYMS) and antimetabolite resistance (32). Li and colleagues demonstrated that a lack of functional RB1 increases resistance to antimetabolite drugs in human sarcoma cells, by increasing the expression of the *DHFR* and *TYMS* genes, both of which are under the control of the E2F factor and targeted by antimetabolite chemotherapy (33). The expression of genes encoding proteins involved in nucleotide metabolism (TYMS) and the RB1-dependent S-phase DNA damage response (CCNA2; ref. 34) was strongly inhibited in RB1-positive models treated with capecitabine, suggesting that the canonical and metabolic regulation of cell proliferation may together account for the observed antitumor effects of capecitabine.

From the analysis of transcriptomic data, *RB1* and *CDKN2A* expression appeared inversely correlated, a finding that is in line with previous reports (35). *CDKN2A* gene encodes the p16 (INK4a) protein that plays an important role in cell cycle through

Marangoni et al.

the regulation of the cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 and cyclin D complexes. Loss of p16(INK4a) can occur by genetic or epigenetic mechanisms and results in RB1 protein activation, leading to unchecked cellular proliferation (36). Evaluation of p16(INK4a) expression by IHC analyses in TNBC PDX will be necessary in order to validate it as potential biomarker of capecitabine resistance.

Finally, an association has been found between the RB1 pathway and chemotherapy response in breast cancer patients (28). In metastatic breast cancer, mutations of the *RB1* gene are associated with a poor response to anthracyclines (37, 38). RB1 pathway inactivation is predictive of resistance to DNA damage-based treatments in locally advanced breast cancer (39).

Capecitabine is converted to 5-FU in cancer cells by the TYMP enzyme (40). Thymidine phosphorylase also activates 5-FU, by converting it to fluorodeoxyuridine (FdUMP), a precursor of FdUMP that inhibits the TYMS enzyme, responsible for *de novo* thymidylate synthesis (22). Accordingly, capecitabine-based chemotherapies have been reported to be more effective in tumors with high levels of TYMP (41–44). Expression of TYMP, as assessed by IHC, was significantly correlated with the response to capecitabine in the cohort of 32 TNBC PDX (including PDX derived from both residual and treatment-naïve tumors). These results are consistent with those of various different clinical studies showing a correlation between TYMP expression and response to capecitabine in metastatic breast cancer patients previously treated with anthracyclines and taxanes (42, 45).

The evaluation of TYMP and RB1 as predictive biomarkers could be translated into clinical practice. Immunohistochemical analyses of one of these two biomarkers on residual tumors at surgery could identify those patients likely to benefit from adjuvant capecitabine treatment. Retrospective validations of these biomarkers in clinical trials evaluating capecitabine against controls (like the CREATE-X study) could also be used to provide support for our results.

Our results may also have implications for the advanced cancer setting, as capecitabine is usually given as a second-line or third-line treatment in patients with recurrences after NAC (46, 47). The efficacy of capecitabine was decreased after pretreatment of tumors with 5-FU, and this was associated with increased expression of TYMS. The upregulation of TYMS in 5-FU-treated tumors is consistent with previous finding in cell lines and tumors and can be explained by the inhibition of a negative feedback mechanism in which TYMS protein inhibits the translation of TYMS mRNA (48). When bound to the active metabolite of 5-FU (FdUMP), TYMS is not able to bind to its mRNA, which results in increased protein expression (49). This constitutes a mechanism of acquired resistance to 5-FU (50, 51). This case suggests that capecitabine

might be more effective if introduced earlier, as adjuvant or first-line treatment, and raises the question of giving 5-FU prior to capecitabine.

In conclusion, we have developed a panel of PDX models from breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant treatment. These chemoresistant PDX provided us with an opportunity to identify effective treatment strategies that might improve the survival of patients with a high risk of relapse and poor prognosis. We showed that capecitabine was effective against 60% of TNBC PDX derived from tumors previously treated with anthracyclines and taxanes, and we identified TYMP and RB1 expression as putative biomarkers predictive of the response to capecitabine.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: E. Marangoni, S. Roman-Roman, F. Reyat
Development of methodology: S. Château-Joubert, J.-L. Servely, P. Foidart, N.E. Sounni, F. Reyat
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): F. Coussy, R. El-Botty, S. Château-Joubert, J.-L. Servely, F. Assayag, A. Dahmani, E. Montaudon, F. Nemati, J. Fleury, D. Gentien, A. Rapinat, P. Foidart, A. Noel, A. Vincent-Salomon, M. Lae, I. Bièche, F. Reyat
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): E. Marangoni, C. Laurent, F. Coussy, S. Château-Joubert, J.-L. Servely, S. Vacher, P. Foidart, S. Roman-Roman, I. Bièche, F. Reyat
Writing, review, and/or revision of the manuscript: E. Marangoni, F. Coussy, R. El-Botty, N.E. Sounni, A. Noel, M. Lae, S. Roman-Roman, M. Piccart, F. Reyat
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): R. El-Botty, L. de Plater, F. Assayag, A. Dahmani, E. Montaudon, D. Decaudin, I. Bièche, F. Reyat
Study supervision: E. Marangoni, F. Assayag, F. Nemati, F. Reyat

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche Contre le Cancer (ARC) and the Parisian Alliance of Cancer Research Institutes (PACRI). High-throughput sequencing was performed at the ICGex NGS platform of the Institut Curie, which is supported by the ANR-10-EQPX-03 (Equipx) and ANR-10-INBS-09-08 (France Génomique Consortium) grants from the Agence Nationale de la Recherche ("Investissements d'Avenir" program), Canceropole Ile-de-France and the SIRIC-Curie program—SIRIC Grant "INCa-DGOS-4654." We thank the animal platform of the Institut Curie (Isabelle Grandjean) and Julie Sappa of Alex Edelman and Associates for her help in correcting the English version of the article.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received November 21, 2017; revised January 25, 2018; accepted February 14, 2018; published first February 20, 2018.

References

- Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13:674–90.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;13:4429–34.
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 2007;13:2329–34.
- Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1275–81.
- Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014;384:164–72.
- Ademuyiwa FO, Ellis MJ, Ma CX. Neoadjuvant therapy in operable breast cancer: application to triple negative breast cancer. *J Oncol* 2013;2013:219869.
- Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, et al. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* 2007;13:3989–98.
- Hatem R, El Botty R, Chateau-Joubert S, Servely JL, Labiod D, de Plater L, et al. Targeting mTOR pathway inhibits tumor growth in different molecular subtypes of triple-negative breast cancers. *Oncotarget* 2016;7:48206–19.

9. Cottu P, Marangoni E, Assayag F, de Cremoux P, Vincent-Salomon A, Guyader C, et al. Modeling of response to endocrine therapy in a panel of human luminal breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:595–606.
10. Reyat F, Guyader C, Decraene C, Lucchesi C, Auger N, Assayag F, et al. Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res* 2012;14:R11.
11. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008;22:659–61.
12. Houghton PJ, Morton CL, Tucker C, Payne D, Favours E, Cole C, et al. The pediatric preclinical testing program: description of models and early testing results. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49:928–40.
13. Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C, et al. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov* 2011;1:508–23.
14. Euceda LR, Hill DK, Stokke E, Hatem R, El Botty R, Bieche I, et al. Metabolic response to everolimus in patient-derived triple-negative breast cancer xenografts. *J Proteome Res* 2017;16:1868–79.
15. Bieche I, Parfait B, Le Doussal V, Olivi M, Rio MC, Lidereau R, et al. Identification of CGA as a novel estrogen receptor-responsive gene in breast cancer: an outstanding candidate marker to predict the response to endocrine therapy. *Cancer Res* 2001;61:1652–8.
16. Tozlu S, Girault I, Vacher S, Vendrell J, Andrieu C, Spyrtos F, et al. Identification of novel genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in breast tumor biopsy specimens, using a large-scale real-time reverse transcription-PCR approach. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:1109–20.
17. Hatem R, Labiod D, Chateau-Joubert S, de Plater L, El Botty R, Vacher S, et al. Vandetanib as a potential new treatment for estrogen receptor-negative breast cancers. *Int J Cancer* 2016;138:2510–21.
18. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* 2015;12:115–21.
19. Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* 2010;26:2363–7.
20. Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005;21:2067–75.
21. Kim KW, Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee S, Lee JH, et al. Prognostic significance of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in biliary tract cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Mol Clin Oncol* 2013;1:987–94.
22. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330–8.
23. Ertel A, Dean JL, Rui H, Liu C, Witkiewicz AK, Knudsen KE, et al. RB-pathway disruption in breast cancer: differential association with disease subtypes, disease-specific prognosis and therapeutic response. *Cell Cycle* 2010;9:4153–63.
24. McAuliffe PF, Evans KW, Akcakanat A, Chen K, Zheng X, Zhao H, et al. Ability to generate patient-derived breast cancer xenografts is enhanced in chemoresistant disease and predicts poor patient outcomes. *PLoS One* 2015;10:e0136851.
25. Shah DR, Tseng WH, Martinez SR. Treatment options for metaplastic breast cancer. *ISRN Oncol* 2012;2012:706162.
26. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, Im YH, Lee ES, Yokota I, et al. Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy. *N Engl J Med* 2017;376:2147–59.
27. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Huovinen R, Jukkola-Vuorinen A, Tanner M, Kokko R, et al. Adjuvant capecitabine in combination with docetaxel, epirubicin, and cyclophosphamide for early breast cancer: the randomized clinical FinXX trial. *JAMA Oncol* 2017.
28. Knudsen ES, Knudsen KE. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. *Nat Rev Cancer* 2008;8:714–24.
29. Witkiewicz AK, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor pathway in breast cancer: prognosis, precision medicine, and therapeutic interventions. *Breast Cancer Res* 2014;16:207.
30. Harrington EA, Bruce JL, Harlow E, Dyson N. pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11945–50.
31. Reed MF, Zagorski WA, Knudsen ES. RB activity alters checkpoint response and chemosensitivity in lung cancer lines. *J Surg Res* 2007;142:364–72.
32. Angus SP, Wheeler LJ, Ranmal SA, Zhang X, Markey MP, Mathews CK, et al. Retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication. *J Biol Chem* 2002;277:44376–84.
33. Li W, Fan J, Hochhauser D, Banerjee D, Zielinski Z, Almasan A, et al. Lack of functional retinoblastoma protein mediates increased resistance to anti-metabolites in human sarcoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10436–40.
34. Knudsen KE, Booth D, Naderi S, Sever-Chroneos Z, Fribourg AF, Hunton IC, et al. RB-dependent S-phase response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 2000;20:7751–63.
35. Aagaard L, Lukas J, Bartkova J, Kjerulff AA, Strauss M, Bartek J. Aberrations of p16Ink4 and retinoblastoma tumour-suppressor genes occur in distinct sub-sets of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 1995;61:115–20.
36. Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16 (ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle* 2011;10:2497–503.
37. Berge EO, Knappskog S, Lillehaug JR, Lonning PE. Alterations of the retinoblastoma gene in metastatic breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 2011;28:319–26.
38. Berge EO, Knappskog S, Geisler S, Staalesen V, Pacal M, Borresen-Dale AL, et al. Identification and characterization of retinoblastoma gene mutations disturbing apoptosis in human breast cancers. *Mol Cancer* 2010;9:173.
39. Knappskog S, Berge EO, Chrisanthar R, Geisler S, Staalesen V, Leirvaag B, et al. Concomitant inactivation of the p53- and pRB- functional pathways predicts resistance to DNA damaging drugs in breast cancer in vivo. *Mol Oncol* 2015;9:1553–64.
40. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 1998;34:1274–81.
41. Schuller J, Cassidy J, Dumont E, Roos B, Durston S, Banken L, et al. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;45:291–7.
42. Lee SJ, Choi YL, Park YH, Kim ST, Cho EY, Ahn JS, et al. Thymidylate synthase and thymidine phosphorylase as predictive markers of capecitabine monotherapy in patients with anthracycline- and taxane-pre-treated metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68:743–51.
43. Koizumi Wokayasu I, Hyodo I, Sakamoto J, Kojima H, Clinical Study Group of C. Prediction of the effect of capecitabine in gastric cancer by immunohistochemical staining of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase. *Anticancer Drugs* 2008;19:819–24.
44. Kobashi N, Matsumoto H, Zhao S, Meike S, Okumura Y, Abe T, et al. The thymidine phosphorylase imaging agent 123I-IIMU predicts the efficacy of capecitabine. *J Nucl Med* 2016;57:1276–81.
45. Andreetta C, Puppini C, Minisini A, Valent F, Pegolo E, Damante G, et al. Thymidine phosphorylase expression and benefit from capecitabine in patients with advanced breast cancer. *Ann Oncol* 2009;20:265–71.
46. Gavilá J, Lopez-Tarruella S, Saura C, Muñoz M, Oliveira M, De la Cruz-Merino L, et al. SEOM clinical guidelines in metastatic breast cancer 2015. *Clin Translat Oncol* 2015;17:946–55.
47. Cardoso F, Costa A, Senkus E, Aapro M, André F, Barrios CH, et al. 3rd ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 3). *Ann Oncol* 2016;mdw544.
48. Chu E, Koeller DM, Johnston PG, Zinn S, Allegra CJ. Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma. *Mol Pharmacol* 1993;43:527–33.
49. Chu E, Koeller DM, Casey JL, Drake JC, Chabner BA, Elwood PC, et al. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88: 8977–81.
50. Ahn JY, Lee JS, Min HY, Lee HY. Acquired resistance to 5-fluorouracil via HSP90/Src-mediated increase in thymidylate synthase expression in colon cancer. *Oncotarget* 2015;6:32622–33.
51. Peters GJ, Backus HH, Freemantle S, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, van der Wilt CL, et al. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2002;1587:194–205.