

ASPECTS MOLÉCULAIRES DU CANCER DU SEIN TRIPLE NÉGATIF ET LES IMPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES

J. COLLIGNON (1), I. STRUMAN (2), S. TABRUYN (3), C. JOSSE (4), M. BOUKERROUCHA (5), G. JERUSALEM (6), V. BOURS (7)

RESUME : Les tumeurs «triple négatives» représentent une entité particulière, caractérisée par l'absence d'expression des récepteurs aux oestrogènes (ER), à la progestérone (PgR) et de l'Human Epidermal growth factor Receptor-2 (HER2). Ce sous-type de cancer du sein représente une population hétérogène et constitue un challenge vu l'absence actuelle de cible thérapeutique. De nombreuses études cherchent à mieux caractériser ces tumeurs sur le plan moléculaire pour développer des thérapies ciblées spécifiques. La recherche de biomarqueurs, comme l'étude des microARN tumoraux et circulants, est également une voie de développement. Nous présentons ici une revue des connaissances actuelles dans ce domaine et les voies de recherche potentielles.

MOTS-CLÉS : Tumeur du sein - Triple négative - Sous-type moléculaire - Thérapie ciblée - MicroARN

Les tumeurs «triple négatives» (TN) sont définies par l'absence de récepteurs aux oestrogènes (ER), à la progestérone (PgR) et de l'Human Epidermal growth factor Receptor-2 (HER2) et représentent 10 à 15 % des cancers du sein. La majorité de ces tumeurs sont des carcinomes canauxaires infiltrants de grade III, se développant le plus souvent chez les jeunes femmes et sont associées à un taux de rechute et de décès plus important et souvent précoce (3-5 ans de suivi) (1). Le plus souvent, les rechutes sont viscérales et cérébrales, avec moins de métastases osseuses. Ce groupe hétérogène constitue un challenge pour le développement de traitement spécifique vu l'absence de cible. La connaissance des altérations génétiques responsables de leur développement représente une étape primordiale activement étudiée dans l'espoir de trouver des cibles thérapeutiques potentielles. Une autre voie est la recherche de biomarqueurs spécifiques comme les microARN. Il est difficile de détailler toutes les données vu la multitude d'études moléculaires sur les tumeurs TN.

MOLECULAR AND GENETIC ASPECTS OF TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS

SUMMARY : Triple negative breast cancers are defined by the lack of expression of estrogen, progesterone and HER2 receptors. They represent an heterogeneous population with poor prognosis. The treatment of these tumors is a challenge because there is no known specific target. A huge number of studies try to better characterise these tumors at the molecular level with the aim to identify new therapeutic targets. The finding of new specific biomarkers like intracellular and extracellular microRNAs is also an important field of research. This article reviews some recent data in this field and the research on different pathways for the development of new therapies.

KEYWORDS : Triple negative breast cancer - Molecular subtype - Targeted therapy - MicroRNA

Cependant, afin de nous aider à mieux cerner les connaissances actuelles, une revue des grandes lignes est développée.

ASPECTS CLINIQUES ET HISTOLOGIQUES

Les tumeurs TN représentent un groupe hétérogène, avec certains sous-types histologiques de pronostic plus favorable comme les tumeurs kystiques adénoïdes, les carcinomes médullaires ainsi que les apocrines et les métaplasiques de bas grade. Toutefois, les plus fréquentes sont les carcinomes canauxaires ou lobulaires de haut grade histologique (Bloom 3 selon Bloom-Richardson), avec la présence de caractéristiques anatomopathologiques de cancer agressif telles qu'une architecture peu différenciée, des figures mitotiques nombreuses, un rapport nucléocytoplasmique important et des noyaux irréguliers et hyperchromatiques. La tumeur refoule les tissus voisins et présente des zones de nécroses géographiques souvent centrales. Ces tumeurs sont généralement diagnostiquées avec une taille supérieure à la moyenne (> 2 centimètres de diamètre au diagnostic dans 2/3 des cas) (2). Elles sont de croissance rapide et plus fréquentes chez la femme jeune, ce qui rend leur diagnostic radiologique parfois difficile. La survie est caractérisée par un taux de rechute précoce élevé, mais les rechutes tardives sont rares, voire inexistantes au-delà de 10 ans ce qui rend ce sous-type histologique potentiellement curable. La majorité des décès se situe dans les cinq premières années.

(1) Chef de Clinique, 6) Chef de Service, Service d'Onco-logie Médicale, CHU de Liège.

2) Chercheur qualifié FNRS, 3) Chargé de Recherche FNRS, 4) Chercheur post-Doctorant, Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génie Génétique, GIGA-R, Université de Liège.

5) Doctorant, 7) Chef de Service, Service de Génétique, CHU de Liège, GIGA-R, Université de Liège.

PROFILS MOLÉCULAIRES

Les études des profils d'expression génique des cancers du sein ont permis une classification moléculaire en sous-types prépondérants: luminal A, luminal B, HER2 positive, basal-like. Les tumeurs TN sont parfois considérées comme étant semblables à cette dernière catégorie. En fait, ce n'est pas vrai car une majorité de tumeurs «basal-like» sont des tumeurs TN et seulement 50 à 80 % des tumeurs TN sont de type «basal-like», mais ces catégories de tumeurs ne sont pas identiques (3). Il y a 20 à 30 % de discordance. Parmi les tumeurs TN, on peut distinguer différents sous-types moléculaires. Ainsi par exemple, on a récemment décrit le sous-type «claudin-low» (4) qui représente 5 % à 10 % des cancers du sein; il est retrouvé uniquement dans les tumeurs TN et pourrait représenter jusqu'à 30 % de celles-ci (5). L'étude de ce sous-type révèle des caractéristiques communes aux cellules souches ou cellules initiatrices de tumeur qui pourraient être à l'origine de la chimio-résistance et de la rechute de ces tumeurs et constitue une voie de recherche avec le développement de thérapies «anti-stem cell»; de plus, elles sont caractérisées par un taux élevé de mutations de la voie PI3K/AKT, ce qui est une autre voie thérapeutique potentielle.

Les tumeurs TN sont très hétérogènes et présentent au niveau moléculaire de nombreuses aberrations chromosomiques et une expression accrue de nombreux gènes : c-KIT, p53, HER1, basal-cytokératines 5, 14, 17, Cyclin-D1, ... (6). Une meilleure compréhension des conséquences de ces aberrations chromosomiques devrait permettre, non seulement de trouver de nouveaux biomarqueurs pour mieux caractériser ces tumeurs, mais également d'identifier des cibles thérapeutiques nouvelles.

MÉCANISMES DE RÉPARATION DE L'ADN ET BRCA1

Certaines patientes présentent une forme familiale héréditaire de cancer du sein où le gène BRCA1 est muté. Les cancers du sein qui se développent chez ces patientes porteuses d'une mutation familiale BRCA1 présentent des caractéristiques similaires aux cancers sporadiques TN ou basal-like. Ceci suggère que le «pathway» BRCA1 est probablement dysfonctionnel dans ces tumeurs non héréditaires. Ainsi, des aberrations cytogénétiques qui sont fréquemment observées dans les cancers du sein des patientes BRCA1 positives d'origine familiale sont aussi retrouvées dans les tumeurs TN sporadiques comme, par exemple, l'inactivation

du chromosome X. Généralement, BRCA1 n'est pas muté dans les tumeurs basal-like ou TN sporadiques, mais il y a une dysfonction du gène par méthylation du promoteur et / ou par inactivation des mécanismes de transcription de BRCA1 qui entraîne la perte de l'expression de BRCA1 (7). Ces mécanismes épigénétiques sont à la base de la perte de fonction du gène BRCA, non seulement dans certaines tumeurs du sein TN et/ ou basal-like, mais aussi dans certains cancers de l'ovaire sporadiques. Le gène BRCA est impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Il joue un rôle majeur dans la réparation des cassures des doubles brins de l'ADN par le mécanisme de recombinaison homologue (HR). Afin de maintenir l'intégrité génomique de la cellule, les mécanismes de réparation sont indispensables. Les anomalies d'un brin de l'ADN sont très fréquentes et nécessitent une réparation par le BER (Base Excision Repair) system; ce complexe enzymatique est activé par les cassures ADN «simple brin» et permet la réparation de cette cassure unique. Cette voie nécessite le système Poly Adenosine diphosphate Ribose Polymerase (PARP). S'il est déficient, les cellules doivent recourir à la recombinaison homologue (HR) qui est inhibée dans les cellules avec dysfonction BRCA. Si les deux voies de réparation PARP et HR sont inhibées, les cellules tumorales sont alors vouées à l'apoptose (8). Le développement d'inhibiteurs de la PARP permettrait d'obtenir cette double inhibition dans les tumeurs BRCA1 et est donc une voie thérapeutique très étudiée actuellement.

EPIGÉNÉTIQUE ET MÉTHYLATION

Toutes les cellules somatiques d'un organisme ont la même information génétique codée dans la séquence de l'ADN, mais elles peuvent se différencier fonctionnellement et morphologiquement grâce à l'expression différentielle des gènes. L'épigénétique définit l'étude de ces modifications phénotypiques liées à une variabilité d'expression des gènes sans modification de la séquence des nucléotides caractérisant le code génétique (9). Cette régulation épigénétique est possible grâce à de nombreux mécanismes moléculaires, comme la méthylation de l'ADN (10). Cette modification est fréquemment retrouvée sur la position 5 de l'anneau pyrimidine des cytosines dans des régions riches en séquence CpG. On a démontré qu'il existait une hypométhylation globale de l'ADN de ces cellules tumorales. Par la suite, on a montré que des gènes qui sont inactivés par hyperméthylation

pouvaient être des suppresseurs hyperméthylés et, plus récemment, des gènes microARN.

Dans les cancers du sein TN, le gène de réparation BRCA1 peut être inactivé par une anomalie génétique dans les familles porteuses de la mutation BRCA1, mais il peut aussi, dans les cas sporadiques, être inactivé par ce mécanisme épigénétique d'hyperméthylation du promoteur. Ce mécanisme d'inactivation du BRCA1 semble spécifique de certains cancers du sein et de l'ovaire puisqu'il n'a pas été actuellement retrouvé dans d'autres cancers. La mise en évidence de cette anomalie spécifique pourrait nous aider à cibler les patientes plus sensibles à certains agents de chimiothérapie ou à certains inhibiteurs de la réparation de l'ADN, comme les inhibiteurs de la PARP (11).

MICROARN TISSULAIRES ET CIRCULANTS

Les microARN (miARN) sont de petits ARN non codants de 21 à 24 nucléotides contrôlant la traduction via leur interaction avec des ARN messagers (ARNm). En s'appariant aux ARNm, ils contrôlent l'expression de nombreux gènes. En effet, environ 1/3 des gènes humains codant pour une protéine sont régulés par des miARN. Un seul miARN peut, en effet, bloquer plusieurs centaines de gènes cibles dont les gènes suppresseurs de tumeurs ou des oncogènes. Ils sont impliqués dans la régulation de différents processus cellulaires comme l'apoptose, la différenciation hématopoïétique, le métabolisme, le processus métastatique. La dérégulation des miARN au sein des cellules tumorales est fréquemment associée au phénotype prolifératif et invasif (12)... Il a été récemment découvert que des miARN sont également présents dans le sang, protégés de la dégradation au sein d'exosomes. Les exosomes sont de petites vésicules (40-100 nm) sécrétées de manière active par de nombreux types cellulaires normaux (plaquettes, macrophages, neutrophiles, endothélium) et tumoraux. En 2008, Mitchell et al. ont décrit que des miARN présents au sein des cellules épithéliales tumorales étaient rapidement sécrétés dans le sang (13). Ils constituent donc une nouvelle source de biomarqueurs peu invasifs.

Plus de 1.000 miARN humains sont, à ce jour, reconnus et étudiés dans différentes pathologies dont les cancers. Le but est, non seulement de trouver des biomarqueurs permettant de mieux caractériser les différents sous-types de tumeurs, mais également d'analyser la fonction de ces miARN dont l'expression varie dans les cancers. Cette voie de recherche s'avère très prometteuse pour l'identification de nouvelles

cibles thérapeutiques pour la cancer du sein (14). Quelques études récentes montrent, en effet, que certains miARN présentent une expression accrue (miR-21, miR-155) alors que d'autres voient leur expression diminuée dans les cancers mammaires (miR-10b et miR-145). Il apparaît donc que les miARN peuvent agir comme oncogènes ou comme gènes suppresseurs. Les profils d'expression de miARN varient également entre les divers sous-types moléculaires du cancer du sein. Dans les tumeurs TN, certains miARN sont significativement surexprimés comme miR-21, miR-210 et miR-221 alors que d'autres sont sous-exprimés comme miR-10b, miR-145, miR-205 et miR-122a. Une étude récente semble indiquer que la surexpression de miR-21, miR-210 et miR-221 soit corrélée avec un moins bon pronostic (15). Ces miARN devraient être étudiés de manière longitudinale pour les corréler au pronostic de certains sous-types de cancer du sein et permettre de trouver des biomarqueurs indispensables pour le clinicien.

POTENTIALITÉS THÉRAPEUTIQUES (Tableau I)

Actuellement, aucun traitement spécifique n'est recommandé pour les tumeurs TN et toutes les voies de recherche restent ouvertes (16) : sélection d'agents de chimiothérapie plus actifs sur ces tumeurs présentant un déficit de réparation de l'ADN comme les dérivés du platine (17), sélection de nouveaux schémas d'association, recherche de nouvelles drogues plus ciblées comme les inhibiteurs de la PARP, les inhibiteurs de l'angiogenèse, les inhibiteurs des récepteurs EGFR très souvent surexprimés dans les tumeurs TN, mais également, et surtout, la recherche de biomarqueurs prédictifs de réponse qui actuellement sont inexistantes dans ce sous-type de tumeur.

TABLEAU 1. STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES

Réparation de l'ADN	Chimiothérapie par platine Inhibiteur de la PARP Trabectidine
Inhibiteur de la voie SRC	Dasatinib
Anti-angiogenèse (VEGF)	Bévacizumab Sunitinib AMG 386, IMC-1121b ...
Inhibiteur de l'EGFR	Cétuximab Erlotinib, Géfitinib
Inhibiteur de la voie PI3K/AKT	Inhibiteurs AKT, PI3K et mTOR
Inhibiteur c-KIT	Imatinib

Actuellement, les inhibiteurs de la PARP et les inhibiteurs de l'angiogenèse sont particulièrement étudiés (18). Le bévacicumab a montré un bénéfice, mais qui reste modeste par rapport au coût du traitement et aux effets secondaires, notamment cardiovasculaires. Pour les inhibiteurs de la PARP, comme l'olaparid ou l'inarparid (19, 20), les études de phase II étaient très encourageantes tant pour le bénéfice que pour le profil de toxicité, mais les résultats de la phase III, en attente de publications, seraient moins probants. La sélection des patientes potentiellement sensibles à ces thérapeutiques reste un problème non résolu, mais indispensable pour progresser dans le traitement de ces tumeurs plus agressives et de mauvais pronostic.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Contrairement aux tumeurs du sein hormonosensibles et HER2 positives, la prise en charge des tumeurs «triple négatives» reste un challenge. L'idéal est de proposer aux patientes la participation aux études cliniques. Un autre développement est la recherche de cibles thérapeutiques et de biomarqueurs : en collaboration avec le service d'Oncologie médicale, le service de Génétique développe un programme de recherches sur le profil d'expression du gène et de la protéine BRCA1 dans les tumeurs «triple négatives» sporadiques; parallèlement, le laboratoire de Biologie moléculaire et de Génie génétique (LBMGG, GIGA-R) a acquis une solide expertise sur l'étude de l'angiogenèse et des microARN et développe un axe de recherche translationnelle pour l'étude des miARN circulants dans les tumeurs du sein, plus particulièrement les tumeurs «triple négatives».

BIBLIOGRAPHIE

1. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS.— Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 2010, **363**, 1938-1948.
2. Reis-Filho JS, Tutt AN.— Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*, 2008, **52**, 108-118.
3. Carey LA.— Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer. *Oncologist*, 2010, **15**, 49-56.
4. Perou CM.— Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*, 2010, **15**, 39-48.
5. Prat A, Perou CM.— Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*, 2011, **5**, 5-23.
6. Irvin WJ, Carey LA.— What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer*, 2008, **44**, 2799-2805.
7. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO.— Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*, 2008, **26**, 2568-2581.
8. Ashworth A.— A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol*, 2008, **26**, 3785-3790.
9. Esteller M.— Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 2008, **358**, 1148-1159.
10. Tost J.— DNA methylation : an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Methods Mol Biol*, 2009, **507**, 3-20.
11. Underhill C, Toulmonde M, Bonnefoi H.— A review of PARP inhibitors: from bench to bedside. *Ann Oncol*, 2011, **22**, 268-279.
12. Slack FJ, Weidhaas JB.— MicroRNA in cancer prognosis. *N Engl J Med*, 2008, **359**, 2720-2722.
13. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al.— Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**, 10513-10518.
14. O'Day E, Lal A.— MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2010, **12**, 201. Epub 2010, Mar 19.
15. Radojicic J, Zaravinos A, Vrekoussis T, et al.— MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer. *Cell Cycle*, 2011, **10**, 507-517.
16. Podo F, Buydens LM, Degani H, et al.— Triple-negative breast cancer : present challenges and new perspectives. *Mol Oncol*, 2010, **4**, 209-229.
17. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, et al.— Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 2010, **28**, 1145-1153.
18. Kornblith AB, Lan L, Archer L, et al.— Quality of life of older patients with early-stage breast cancer receiving adjuvant chemotherapy : a companion study to cancer and leukemia group B 49907. *J Clin Oncol*, 2011, **29**, 1022-1028.
19. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, et al.— Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 2011, **364**, 205-214.
20. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al.— Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*, 2009, **361**, 123-134.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Dr. J. Collignon, Service d'Oncologie Médicale, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.
E-mail : joelle.collignon@chu.ulg.ac.be