HAL
open science

Caractérisation moléculaire de la résistance à l'hormonothérapie et au ciblage de la voie PI3K/mTOR dans des modèles murins de cancers du sein luminaux

Paul-Henri Cottu

To cite this version:

Paul-Henri Cottu. Caractérisation moléculaire de la résistance à l'hormonothérapie et au ciblage de la voie PI3K/mTOR dans des modèles murins de cancers du sein luminaux. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS114 . tel-01262137

HAL Id: tel-01262137

https://theses.hal.science/tel-01262137v1

Submitted on 26 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2015SACL114

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY

Préparée à l'Université PARIS SUD

ÉCOLE DOCTORALE N° 582
CBMS | Cancérologie : biologie - médecine – santé
Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Par

Paul-Henri COTTU

Laboratoire d'Investigations Précliniques
Département de Recherche Translationnelle
Institut Curie, Paris

Caractérisation moléculaire de la résistance à l'hormonothérapie et ciblage de la voie PI3K/mTOR dans des modèles murins de cancers du sein luminaux

Thèse présentée et soutenue publiquement à Paris, le 16/12/2015

Composition du Jury :

Président : **Philippe JUIN** – UMR 892 - INSERM - Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes - Université de Nantes

Directeur de thèse : **Sergio ROMAN-ROMAN** - Département de Recherche Translationnelle, Institut Curie, Paris
Co-directeur de thèse : **Jean-Yves PIERGA** – Département d'Oncologie Médicale, Institut Curie, Paris
Rapporteurs : **Philippe JUIN** – UMR 892 - INSERM - Université de Nantes
Thomas BACHELOT – Département d'Oncologie Médicale, Centre Léon Bérard, Lyon
Examinateurs : **Marie-Christine MULTON**, Sanofi-Aventis, Paris
Marc ESPIE, Centre des Maladies du Sein, CHU Saint-Louis, Paris

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Cancérologie, biologie, médecine, santé (CBMS)

UNIVERSITÉ PARIS SUD
Comprendre le monde, construire l'avenir®

NNT : 2015SACL114

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY

Préparée à l'Université PARIS SUD

ÉCOLE DOCTORALE N° 582
CBMS | Cancérologie : biologie - médecine – santé
Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Par

Paul-Henri COTTU

Laboratoire d'Investigations Précliniques
Département de Recherche Translationnelle
Institut Curie, Paris

Caractérisation moléculaire de la résistance à l'hormonothérapie et ciblage de la voie PI3K/mTOR dans des modèles murins de cancers du sein luminaux

Thèse présentée et soutenue publiquement à Paris, le 16/12/2015

Composition du Jury :

Président : **Philippe JUIN** – UMR 892 - INSERM - Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes - Université de Nantes

Directeur de thèse : **Sergio ROMAN-ROMAN** - Département de Recherche Translationnelle, Institut Curie, Paris
Co-directeur de thèse : **Jean-Yves PIERGA** – Département d'Oncologie Médicale, Institut Curie, Paris
Rapporteurs : **Philippe JUIN** – UMR 892 - INSERM - Université de Nantes
Thomas BACHELOT – Département d'Oncologie Médicale, Centre Léon Bérard, Lyon
Examinateurs : **Marie-Christine MULTON**, Sanofi-Aventis, Paris
Marc ESPIE, Centre des Maladies du Sein, CHU Saint-Louis, Paris

« Le plus sage des sages ne fera jamais qu'un crabe marche droit »

Aristophane

« La liberté commence où l'ignorance finit »

Victor Hugo

Dédicaces

Je dédie cette thèse du fond de mon cœur à tous les miens, ma si chère moitié Anne-Sophie, mes enfants chéris Adrien, Iris et Alexandre, dont la lumière et la force de vie m'entraîne chaque jour, mes parents et mes beaux-parents, mes frères et mes beaux-frères et tous les leurs, qui tous et depuis tant d'années ont su me porter et me supporter par leur amour exigeant et toujours si présent.

Je dédie tout autant ce travail à tous mes compagnons de route, Joël et Nathalie, Marc et Catherine, Stéphane, Jacques et Hélène, Isabelle et Laurent, Nathalie et François, Sylvie, Valérie, Caroline, Karim et Karine, Suzette, Nicolas et Elise, Patricia, Florence, Marie-Claire, Edwige, Bertrand, Francine, André, Jennifer, Florence, Charlotte, Hervé, Diane, Florence, Patricia, Sandrine, Stéphane et Chrystel, Eric et Isabelle, Laurence et tant d'autres, ils se reconnaîtront.

Enfin, et peut-être surtout, je dédie ces années d'effort à toutes « mes » patientes, chacune m'a donné une leçon de vie et la motivation infinie de continuer.

Remerciements

Je remercie avec une infinie reconnaissance le Pr Jean-Yves Pierga et le Dr Sergio Roman-Roman d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse, et pour leur aide si précieuse dans sa présente réalisation. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon amitié aussi sincère que respectueuse.

Je remercie également très chaleureusement les Drs Thomas Bachelot et Philippe Juin d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Espérons de futures collaborations !

Mme le Dr Marie-Christine Multon m'a fait l'honneur de m'accompagner au long de ce travail. Qu'elle soit très vivement remerciée de ses conseils éclairants.

Rien n'aurait pu se faire sans la « Dream Team » du Laboratoire d'Investigations Précliniques : Franck Assayag, Ludmila De Plater, Rania El Botty, Thomas Bagarre, Aurélie Thuleau, Ahmed Dahmani et toute la bande. Ce travail est avant tout le leur et je me fais leur porte-parole. Que Didier Decaudin, chef du LIP, soit également remercié pour avoir su m'accueillir et créer ma place au sein du Laboratoire.

L'ensemble des résultats présentés ici est le fruit d'intenses collaborations et séances de réflexion collective ayant mobilisé les ressources de l'Institut et au-delà. Toute mon affectueuse reconnaissance va à :

Anne Vincent-Salomon, du Département de Biologie des Tumeurs, pour son enthousiasme et son soutien sans faille ;

Patricia de Cremoux, qui m'a tellement aidé au lancement de cette entreprise, pour sa connaissance de la biologie hormonale et sa rigueur ;

Ivan Bièche, fin scientifique et esprit toujours positif, incroyablement présent tout au long de ce parcours et j'espère au-delà !

Sophie Richon avec qui nous avons tenté et j'espère retenterons des approches 3D originales ;

David Gentien et son équipe (Audrey, Benoît, Cécile, Caroline…) pour leur aide si précieuse dans la génération et l'analyse des données génomiques, en collaboration avec Pierre de la Grange et Genosplice, ainsi qu'avec Vonick Sibut de l'équipe d'Emmanuel Barillot ;

Jean-Jacques Fontaine et l'équipe de l'ENVA (Jean-Luc, Sophie) qui ont réalisé une grande partie des analyses immunohistochimiques.

Je remercie également très chaleureusement les Directeurs de l'Institut Curie, le Pr Pierre Bey et le Dr Marc Estève, qui successivement ont su m'accueillir puis me soutenir au sein de cette superbe Institution.

Mes collègues du Département d'Oncologie Médicale ont supporté et pallié mes absences ! Qu'en particulier Marie-Françoise Le Taillandier, Solenne Leman-Detours, Anne Donnadieu, Valérie Laurence, Manuel Rodrigues, François-Clément Bidard et Véronique Diéras soient remerciés.

Rien n'aurait pu se faire sans nos amis chirurgiens : Virginie Fourchotte, Fabien Reyal, Séverine Alran, Jean-Guillaume Feron et les autres. Merci à eux !

Je dois une mention toute particulière à la fabuleuse phalange de mes Maîtres et Amis en cancérologie : François Morvan qui m'initia, Marc Espié qui me forma et me fait l'honneur et le plaisir de participer à ce Jury, Jean-Marc Extra qui éveilla mon esprit, Michel Marty qui m'accueillit sans me connaître, m'apprit le médicament et à… voir plus loin, et tout particulièrement Laurent Mignot, pour tout. Leurs qualités humaines, médicales et scientifiques, et leur enthousiasme, m'ont porté depuis plus de 20 ans. Je ne leur dirai jamais assez merci.

Enfin, *last but not least*, ce manuscrit représente le fruit de 5 années de travail commun avec Elisabetta Marangoni, qui avec une extraordinaire efficacité, bienveillance et exigence, m'a encadré tout au long de ce parcours. Souhaitons que cette base permette de beaux développements !

Financement

Fondation Curie

Institut Curie-Carnot

TABLE DES MATIERES

Résumé 13

Introduction 15

I. Les cancers du sein luminaux 20
1. Définition et Epidémiologie 20
2. Traitements endocriniens : modalités 23
Femme non ménopausée 25
Femme ménopausée 26
3. Traitements endocriniens : résultats et inférence biologique 27
Phase précoce 27
Phase avancée 31

II. Résistance à l'hormonothérapie 34
1. Le récepteur aux œstrogènes 35
Biologie du récepteur aux oestrogenes 35
Formes variantes du REα 37
Co-régulateurs des récepteurs aux œstrogènes. 39
2. Pharmacogénétique 40
3. Intervenants moléculaires indirects 41
Interaction avec les réseaux de signalisation (« *Cross talk* ») 41
ERRα 42
Article 1 45
4. Voie PI3K/Akt/mTOR dans les cancers du sein luminaux 59
La voie PI3K / Akt / mTOR 59
Activation de la voie PI3K / mTOR dans les cancers du sein luminaux 61
Mutations de PIK3CA dans les cancers du sein luminaux 62

III. Objectifs du travail de doctorat 64

IV. Développement et validation des PDX luminales 65
1. Le Laboratoire d'accueil et les PDX 65
2. Matériels et méthodes 66
Etablissement des xénogreffes*[note] 66
Validation anatomopathologique 67
Validation biologique 67
Validation thérapeutique* 69
Statistiques* 70
3. Résultats 71
Prise de greffe 71

Stabilité tumorale 72
Profilage thérapeutique 74
Article 2 78

V. Développement et caractérisation des modèles hormonorésistants 91
1. Contexte 91
2. Matériels et méthodes 91
Développement des modèles résistants* et traitements* 91
Analyses supervisées 92
Génération et analyse des profils génomiques 93
3. Résultats 94
Etablissement et caractérisation des modèles hormonorésistants 94
Analyses génomiques 98

VI. Ciblage de la voie PI3K/mTOR 104
1. Evaluation de l'évérolimus 104
2. Analyses pharmacodynamiques 108
3. Evaluation d'inhibiteurs de PIK3CA, AKT et mTOR 109
Article 3 112

VII. Discussion générale 125

VIII. Travaux en cours et perspectives 135

Annexes 139
1. Classification TNM 139
2. Transcriptome 141
3. Présentations et posters 142
Présentation orale en congrès 142
Conférences invitées 142
Présentations affichées 142
4. Articles publiés en collaboration 144
5. Suivi à long terme des patientes 148

Bibliographie 149

Liste des abréviations

4E-BP1	*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*
AIB1	*Amplified In Breast 1* (aussi dénommé *NCOA3, SRC3)*
Akt	*Ak mouse bred and thymoma*
AP2γ	*Activating Enhancer Binding Protein 2 Gamma*
BAC	*Bacterial artificial chromosome*
BCL2	*B-Cell Lymphoma 2*
BP	*Biological Process*
CGH	*Comparative Genomic Hybridization*
CS	Cancer du sein
DBD	*DNA Binding domain*
E2	Oestradiol
EBCTCG	*Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group*
EGFR	*Epidermal Growth Factor Receptor*
ERE	*Estrogen Responsive Elements*
ERRα	*Estrogen Related Receptor alpha*
ESR1	*Estrogen Receptor 1*
FGFR	*Fibroblast Growth Factor Receptor*
FOXA1	*Forkhead box protein A1*
GATA3	facteurs de transcription GATA, reconnaissant un consensus W**GATA**R
GO	*Gene Ontology*
HER2	*Human Epidermal growth factor Receptor 2*
HT	HormonoThérapie
IA	Inhibiteur de l'Aromatase
IGF1R	*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*
IHC	ImmunoHistoChimie
INCa	Institut National du Cancer
INPP4B	*Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II*
LBD	*Ligand binding domain*
LKB1 (STK11)	*liver kinase B1 (Serine/threonine kinase 11)*
LTED	*long term estrogen deprivation*
MAPK	*Mitogen-activated Protein Kinases*
MISS	*membrane-initiated estradiol signalling*
mTOR	*Mammalian target of rapamycin*
NFκB	*Nuclear Factor-kappa B*
NGS	*Next Generation Sequencing*
P70S6K	*p70 S6 kinase*
PAX2	*Paired Box gene 2*
PBX1	*Pre-B-Cell Leukemia Homeobox 1*
PDX	*Patient Derived Xenograft*
PEPI	*preoperative endocrine prognostic index*
PI3K	*phosphatidylinositol-3-kinase*
pS2/TFF1	*TreFoil Factor 1*
PTEN	*Phosphatase and tensin homolog*
RAPTOR	*Regulatory-associated protein of mTOR*
RE	Récepteur aux œstrogènes (par défaut, récepteur alpha)
RICTOR	*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*
RP	Récepteur à la progesterone
RPS6	*Ribosomal Protein S6*
SFO	Suppression de la Fonction Ovarienne

SNP	*Single Nucleotide polymorphism*
TSC	*Tuberous Sclerosis gene*

Liste des tables et figures

Figures

1. Variations d'incidence et de mortalité par cancer du sein en France en fonction de l'âge
2. Exemple de proposition thérapeutique dans le référentiel commun Institut Curie – Gustave Roussy (2014) pour les tumeurs RE+/HER2- au stade précoce
3. Survie sans rechute à 10 ans après traitement hormonal
4. Survie sans progression du cancer en première rechute métastatique
5. Glande mammaire normale
6. Clustering hiérarchique permettant de mettre en évidence les différents sous-types moléculaires de carcinome mammaire
7. Extrait de la publication de 1899 de George Beatson
8. Voie de synthèse des œstrogènes
9. Mortalité par cancer du sein à long terme, en fonction de l'âge au diagnostic et de la prise de tamoxifène
10. Mortalité comparée par cancer du sein : tamoxifène vs IA pendant 5 ans
11. Schéma d'utilisation du modèle néoadjuvant
12. Survie sans progression et survie globale (mois / probabilité) dans l'étude FACT
13. Survie sans progression (jours / probabilité) dans l'étude EFECT
14. Domaines structurels et fonctionnels de REα et REβ
15. Voies génomique et non-génomique de l'action du RE
16. Principaux points chauds de mutation et de modification post-traductionnelles d'*ESR1*
17. « Crosstalks » entre voie du RE et voies des facteurs de croissance dans le cancer du sein luminal
18. Mécanismes associés à l'hormonorésistance
19. La voie PI3K/Akt/mTOR
20. Voie PI3K/mTOR et maladies associées aux anomalies de la voie
21. Actions de mTORC1 sur la traduction
22. Etablissement des PDX
23. Tumeur au moment du sacrifice et fragments tumoraux avant réimplantation*
24. Point d'injection du fulvestrant dans la cuisse
25. Tumeur dans le coussinet interscapulaire et mesure au pied à coulisse
26. Stabilité architecturale des PDX
27. Maintien de l'expression de RE et RP en IHC et en RT-PCR à différents passages
28. Analyse comparée des profils génomiques d'une tumeur donneuse et de la PDX HBCx-22
29. RTV comparés dans le bras contrôle (sans E2 dans l'eau de boisson) et le bras contrôle positif (apport contrôlé d'E2 oral)
30. Profil d'hormonosensibilité de 4 PDX luminales

30 bis. Exemples de courbes individuelles

31. Analyse comparée morphologique (H&E) et en IHC des deux PDX de référence et leurs dérivés résistants
32. Expression génique et protéique comparée d'IGF1R et de RP dans les PDX sensibles et les dérivées résistantes.
33. Expression (qRT-PCR) comparée des facteurs pionniers du RE dans les PDX et les modèles résistants dérivés
34. Activation de la voie PI3K dans les PDX parentales

35. Profil SNP6.0 comparé des PDX parentales sensibles et des variants TamR et OvaR pour HBCx-22 et HBCx34.
36. Clustering non supervisé de HBCx-22 et ses deux dérivés TamR et OvaR
37. Diagramme de Venn
38. Evaluation de l'évérolimus seul et en combinaison (HBCx-22)
39. Evaluation de l'évérolimus seul et en combinaison (HBCx-34)
40. Vue détaillée des traitements de la PDX HBCx-34 TamR
41. Localisation anatomique des glandes mammaires murines
42. Variations individuelles du Ki67 à 2 et 12 semaines de traitement par anastrozole
43. Pronostic (survie sans rechute) des cancers du sein luminaux en fonction de l'expression de HIST1H3C
44. Développement des PDX luminales
45. Résistance et perspectives thérapeutiques

Tables

1. Taux de survie sans progression et de survie globale dans les différents sous-types de cancer du sein au stade précoce
2. Correspondance entre sous-type moléculaire et caractérisation immunohistochimique
3. Score d'Allred
4. Définition clinique de la résistance à l'hormonothérapie
5. Mécanismes associés à l'hormonorésistance
6. Fréquence des mutations non silencieuses dans les cancers du sein primitifs, par sous-type. Données du TCGA 2012
7. Caractéristiques des 8 premières xénogreffes RE+
8. Définition du phospho-score pour P-p70S6K
9. Inhibition de croissance
10. Liste des 20 gènes communs aux 4 signatures
11. Liste des principaux processus biologiques associés à l'hormonorésistance
12. Inhibition de croissance sous évérolimus
13. Analyse pharmacodynamique par IHC de l'effet du fulvestrant et de la combinaison évérolimus-fulvestrant
14. Phospho-score pour P-S6 dans les différents bras de traitement
15. Premiers résultats de l'évaluation de l'effet des inhibiteurs de la voie PI3K sur les PDX sensibles et résistantes à l'hormonothérapie
16. Avantages et limites des PDX
17. Générations de PDX résistantes

RESUME

Mots clés : cancer du sein luminal – hormonorésistance – récepteur aux œstrogènes – PI3K - évérolimus

Les cancers du sein luminaux, exprimant le récepteur aux œstrogènes (RE), représentent 65-75% des cancers du sein soit environ 35 000 nouvelles patientes par an en France. Les référentiels thérapeutiques en vigueur recommandent une prescription systématique d'hormonothérapie au stade précoce, et quasiment constante au stade avancé. Néanmoins, il est admis que plus de 20% des patientes au stade précoce, et la quasi-totalité au stade avancé, vont échapper au traitement endocrinien, justifiant le développement de modèles précliniques permettant d'étudier les mécanismes d'hormonorésistance. Dans un contexte de modèles de lignées cellulaires anciens et très imparfaits (MCF7, T47D), et de quasi absence de modèles murins pertinents, nous avons choisi de développer des modèles murins dérivés de tumeurs fraîches, dits PDX (*patient derived xenografts*). Nous avons montré que ces modèles, difficiles à obtenir, récapitulaient avec une grande fidélité les caractéristiques morphologiques et biologiques des tumeurs d'origine. Les PDX se distinguent également par une grande stabilité de leurs caractéristiques lors des passages successifs, les rendant utilisables au long cours. Nous avons également évalué les modèles obtenus pour leur profil de sensibilité à diverses modalités de traitement hormonal. Dans une seconde étape, nous avons développé des modèles résistants à l'hormonothérapie à partir des PDX précédemment créées. Quatre modèles ont pu être obtenus, nous permettant de rendre compte de situations cliniques variées. Ces 4 modèles ont fait l'objet d'analyses biologiques extensives visant à identifier les caractéristiques moléculaires potentiellement associées à telle modalité de résistance : nos données suggèrent fortement qu'il y a autant de mécanismes de résistance que de situations, rendant illusoire une définition biologique unifiée de l'hormonorésistance. La reprogrammation fonctionnelle du RE semble être au centre de ces mécanismes. La voie de transduction du signal PI3K/mTOR est une des plus fréquemment associée à l'hormonorésistance. De manière originale, nous avons mis en évidence que cette voie était activée aussi bien dans les modèles sensibles que dans les modèles résistants. La troisième étape a consisté à évaluer l'efficacité de l'évérolimus, agent ciblant mTORC1. Nous avons pu montrer que l'évérolimus était hautement actif dans toutes les situations considérées, sans argument pour une synergie entre évérolimus et tamoxifène ou exemestane. En revanche, il existe une nette tendance à la synergie avec le fulvestrant, inhibiteur hautement spécifique du RE entraînant sa

dégradation, et faisant suggérer des interactions avec la voie cytoplasmique (extra-génomique) du RE. Nous testons actuellement des inhibiteurs spécifiques de la PIK3CA et d'autres effecteurs de la voie grâce à diverses collaborations industrielles qui permettront également de mener des analyses génomiques approfondies. De multiples projets académiques sont aussi en cours.

Summary

***Key words**: luminal breast cancer – endocrine resistance – estrogen receptor – PI3K - everolimus*

Luminal breast cancer (ER+, HER2 negative) accounts for 65-75% of all breast carcinomas. Current guidelines strongly recommend endocrine treatment at both the early and advanced stages. However, more than 20% of early stage patients, and all advanced patients, will eventually develop endocrine resistance. As most preclinical models (MCF7, T47D cell lines) do not recapitulate tumor biology, we have chosen to develop murine models derived from fresh tumors, hence called patient derived xenografts (PDX). We have shown that these models, although difficult to generate, faithfully exhibit the morphological and biological features of their parental counterpart, with high long term stability. These models have also been evaluated for their sensitivity to various endocrine treatments. In the next step, we developed from these initially endocrine sensitive models new tumors rendered resistant to endocrine therapies. We show that there is no unique biological pattern associated with endocrine resistance, although ER functional reprogramming appears to be critical. We also show that PI3K/mTOR pathway activation may not be always related to endocrine resistance, and we suggest that fulvestrant, an ER down regulator, may be highly synergistic with everolimus in specific cases. Several PIK3CA inhibitors are currently being evaluated in this setting.

INTRODUCTION

Le cancer du sein (CS)[note 1] est le cancer le plus fréquent chez la femme occidentale, et le plus fréquemment la première cause de mortalité par cancer chez la femme. L'incidence a cru de manière rapide et régulière depuis plus de 20 ans, pour arriver actuellement à un plateau d'environ 50 000 nouveaux cas chaque année en France pour une mortalité d'environ 10-11 000 cas par an (source : INCa 2015). Ces données sont proportionnellement tout à fait similaires à ce qui peut être observé par exemple aux Etats-Unis[1]. La survenue d'un CS est étroitement liée à l'âge, qui représente le facteur de risque majeur (figure 1).

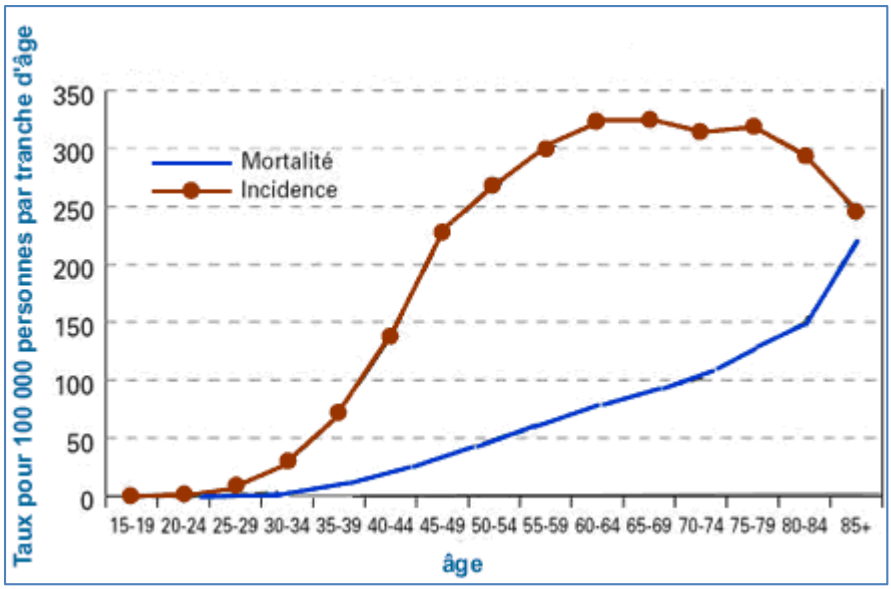


Figure 1. Variations d'incidence et de mortalité par cancer du sein en France en fonction de l'âge.

(Source : Institut National de Veille Sanitaire)

Au-delà de l'âge, les facteurs de risque de CS peuvent se considérer sous trois angles[2] non mutuellement exclusifs, associant : l'exposition oestrogénique endogène et exogène ; les facteurs héréditaires : mutation germinale des gènes *BRCA1, BRCA2, TP53*, etc ; et les facteurs liés au mode de vie : surpoids, sédentarité, alcoolisme, alimentation, etc. Parallèlement à cette identification progressive des facteurs de risque de CS, un effort majeur a été fait depuis des dizaines d'années pour en définir le cadre nosologique. L'attention a été portée sur un certain nombre de paramètres

[1] Nous n'envisagerons dans ce travail que les adénocarcinomes mammaires – et non les formes rares de cancer du sein (angiosarcome, tumeur neuroendocrine, mélanome, lymphome, etc).

biologiques clés, qui ont été isolés puis utilisés en pratique quotidienne dans la description diagnostique initiale, devenant ainsi de véritables biomarqueurs : la variété histologique, la prolifération cellulaire (index mitotique, expression du Ki67) et le grade histologique, l'expression des récepteurs aux hormones sexuelles œstrogènes (RE) et progestérone (RP), l'amplification de l'oncogène *HER2/neu/c-erbB2* (HER2). D'autres paramètres d'utilisation moins constante ont également été décrits : présence/absence d'emboles tumoraux vasculo-lymphatiques, infiltrat inflammatoire/lymphocytaire, ratio UPA/PAI1, expression de la cathepsine D, etc. La reconnaissance de ces facteurs anatomo-biologiques a permis des avancées majeures dans la compréhension des CS tant sur le plan étiopathogénique (ex : lien entre exposition aux œstrogènes et RE) que thérapeutique : les référentiels thérapeutiques actuellement en vigueur considèrent ces paramètres diagnostiques et pronostiques, au côté des considérations anatomiques rendant compte de l'extension tumorale, en particulier la taille tumorale et l'extension ganglionnaire (classification TNM, voir annexe 1), pour construire les arbres de décision thérapeutique (figure 2).

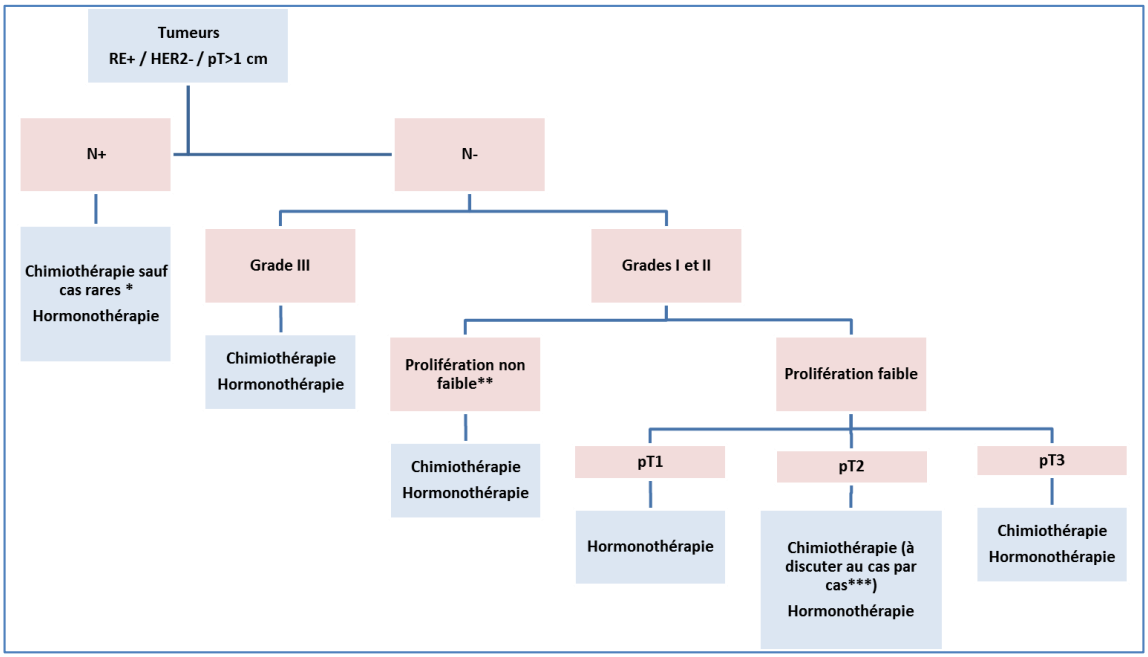


Figure 2. Exemple de proposition thérapeutique dans le référentiel commun Institut Curie – Gustave Roussy (2014) pour les tumeurs RE+/HER2- au stade précoce.

Ces propositions thérapeutiques sont élaborées lors de réunions de consensus, menées aux échelons régional (exemples des réseaux de cancérologie d'Alsace (CAROL), de Bourgogne (ONCOBOURGOGNE), de Champagne-Ardenne (ONCOCHA), de Franche-Comté (ONCOLIE) et de Lorraine (ONCOLOR) : http://www.oncologik.fr/index.php/Interregion:Sein_%28_principes_de_prise_en_charge%29; Réseau Oncora de la région Rhône-Alpes : http://espacecancer.sante-ra.fr/Pages/referentiel-

sein.aspx), national (Revue Oncologie, Numéro Spécial de décembre 2013) et international[3, 4]. Elles résultent de l'appréciation faite par les membres de ces réunions de consensus de la qualité des biomarqueurs utilisés en routine, et des résultats des principaux essais thérapeutiques. Il existe également depuis peu des recommandations thérapeutiques pour les cancers à la phase avancée[5].

Malheureusement, ces recommandations de permettent pas de garantir des taux de guérison totalement satisfaisants, y compris à la phase précoce, non métastatique, du CS. Indépendamment du statut ganglionnaire qui reste un facteur pronostique puissant, il est admis actuellement qu'un taux de survie sans rechute de 80% est atteint à 8-10 ans pour les CS exprimant le RE (RE+, HER2-) et sans qu'un plateau puisse être obtenu (figure 3).

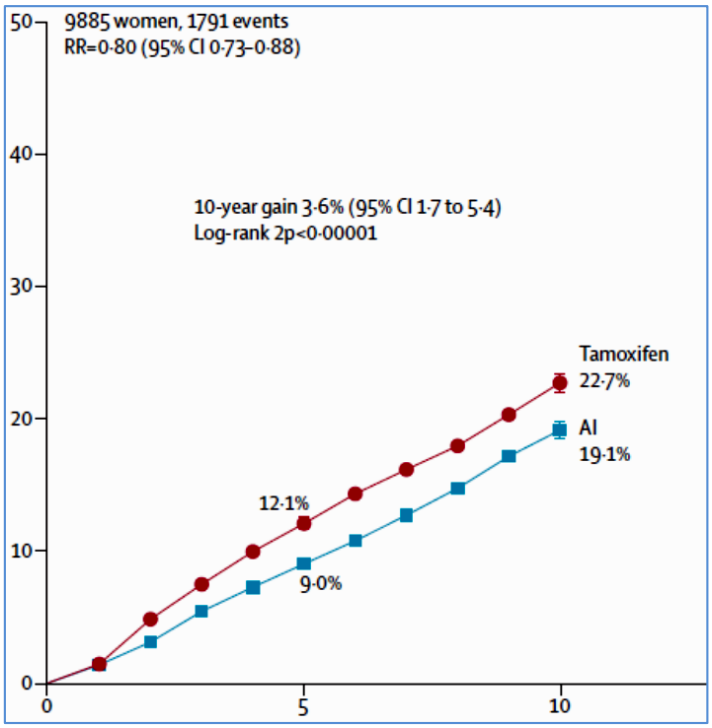


Figure 3. Survie sans rechute à 10 ans après traitement hormonal (tamoxifène : courbe rouge ; inhibiteur de l'aromatase : courbe bleue). Figure issue de la méta-analyse 2015 de l'EBCTCG[6].

La table 1 indique les taux de survie sans rechute et de survie globale à 5 ans selon les caractéristiques histo-pronostiques initiales, dans les essais ou méta-analyses les plus récents[6–8].

	RE+ HER2-	HER2+	RE- RP- HER2-
Survie sans progression à 5 ans	≈ 90%	≈ 81%	≈ 70%*
Survie globale à 5 ans	≈ 95%	≈ 92%	≈ 80%*

Table 1 : taux de survie sans progression et de survie globale dans les différents sous-types de cancer du sein au stade précoce. A. Cancers du sein RE+ ; métaanalyse de l'EBCTCG 2015[6]. B. Cancers du sein HER2+ ; essai HERA[8]. C. Cancers du sein triple négatifs ; essai BEATRICE[7]. *chiffres extrapolés des courbes à 3 ans.

Les raisons de cet échec relatif peuvent très schématiquement s'envisager selon deux aspects :

- La classification pronostique et donc les décisions thérapeutiques sont inadaptées, ou au moins imprécises.
- Les traitements sont adaptés mais des résistances se développent au fil du temps.

Ces limites peuvent naturellement se combiner, et trouvent leur pleine expression à la phase avancée du CS, où l'espoir d'une curabilité est quasi inexistant, et où les médianes de survie sans progression dès la première évolution métastatique n'excèdent pas 1 an, quelle que soit l'approche thérapeutique[9–13] (figure 4).

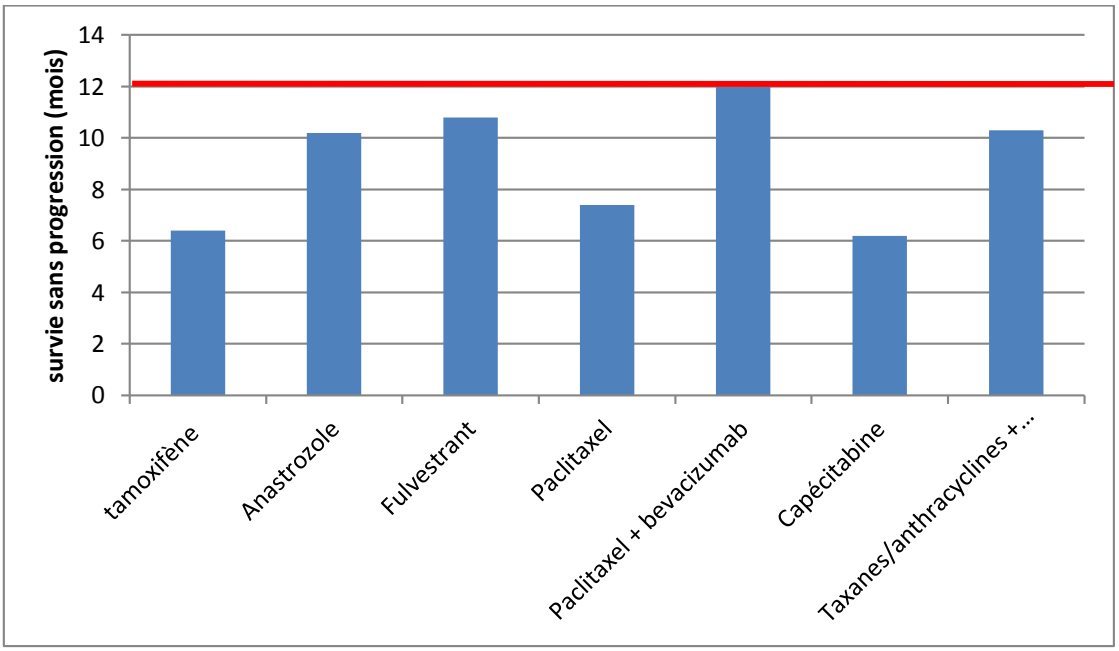


Figure 4. Survie sans progression du cancer en première rechute métastatique. Hormonothérapies : tamoxifène, anastrozole et fulvestrant. L'ordonnée indique la médiane de survie sans progression.

La résistance aux traitements, quotidiennement constatée en clinique dans toutes les situations de CS, est ainsi une des principales sources d'échec en oncologie, avec des conséquences majeures en termes de coût physique, psychique et social. La description et la compréhension des mécanismes de résistance sont devenues un des enjeux majeurs de la prise en charge des cancers. ***Compte tenu de la fréquence des cancers du sein RE+, et de l'absence de solution thérapeutique réellement satisfaisante après échec des traitements hormonaux, nous avons choisi de nous intéresser à cette forme de CS, et à la résistance aux hormonothérapies couramment utilisées***. Les parties I et II du présent manuscrit rendent compte de l'état de la question : cancers du sein luminaux, résistance aux hormonothérapies, la voie PI3K/mTOR comme exemple de voie de résistance. Les parties IV à VII rapportent le travail expérimental effectué ainsi que les publications qui en ont résulté. La partie VIII définit les perspectives actuelles.

I. LES CANCERS DU SEIN LUMINAUX

1. DEFINITION ET EPIDEMIOLOGIE

La classification nosologique conventionnelle basée sur l'anatomie pathologique complétée par l'immunohistochimie (IHC) a délimité trois grandes catégories biologiques de CS, définies par le niveau d'expression des récepteurs RE et RP, et par la surexpression éventuelle de l'oncogène HER2. On distingue ainsi classiquement :

- Les CS RE+, c'est-à-dire présentant une expression du RE (et éventuellement du RP) suffisamment élevée pour justifier la prescription d'une hormonothérapie (voir infra).
- Les CS HER2+ selon les définitions en vigueur[14]. Ces formes justifient un blocage de la voie HER2, en général associé à une chimiothérapie cytotoxique conventionnelle.
- Les CS « triple négatifs », qui n'expriment aucun des 3 récepteurs considérés. La chimiothérapie est le traitement médical de référence.

Cette classification historique et prescriptrice a été bouleversée et considérablement étoffée au début des années 2000 avec l'apparition des techniques d'analyse génomique à haut débit, permettant d'évaluer simultanément le niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes. Le groupe de Charles PEROU a ainsi réévalué l'histoire naturelle des cancers du sein au stade précoce à partir d'une série de 42 tumeurs annotées, la plupart n'ayant pas reçu de traitement systémique ce qui a permis de définir une histoire naturelle fonction de la seule génomique[15]. Brièvement, plusieurs sous-groupes différenciés par leur pronostic à long terme et leur profil d'expression, qualifiés de « sous-types moléculaires » ont été mis en évidence. On distingue ainsi quatre grandes catégories de sous-type de CS infiltrant, dites « normal », « luminal/ER+ », « enrichi en expression de HER2 » et « basal ». Ces dénominations ont été proposées en raison de la proximité du profil d'expression de ces sous-types avec les catégories cellulaires normales et identifiées du tissu mammaire (figure 5). A titre d'exemple, le profil « normal » est caractérisé par l'expression élevée de gènes des cellules épithéliales basales et adipeuses, et une faible expression des gènes associés aux cellules luminales. Le groupe dit basal est ainsi associé à l'expression de gènes exprimés dans les cellules basales, et les tumeurs du groupe RE+ sont caractérisées par l'expression élevée de nombreux gènes exprimés dans les cellules luminales.

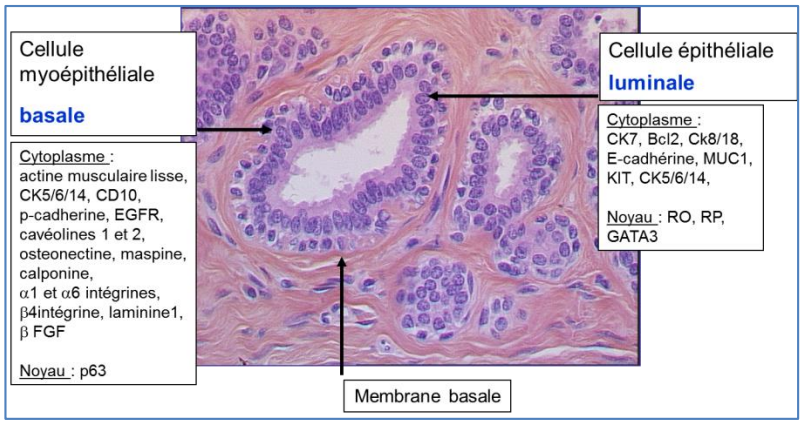


Figure 5. Glande mammaire normale. Unité ductulo-lobulaire terminale. (© Dr Anne Vincent-Salomon, Institut Curie, Paris)

Ces données préliminaires ont été confirmées à plusieurs reprises, et des précisions ont pu être apportées, permettant notamment de distinguer 3 sous classes dans le type luminal dites A, B et C de pronostic différent[16] (figure 6). La sous classe luminale C a été ensuite progressivement abandonnée, se rapprochant plus des sous types HER2 ou basal selon les tumeurs.

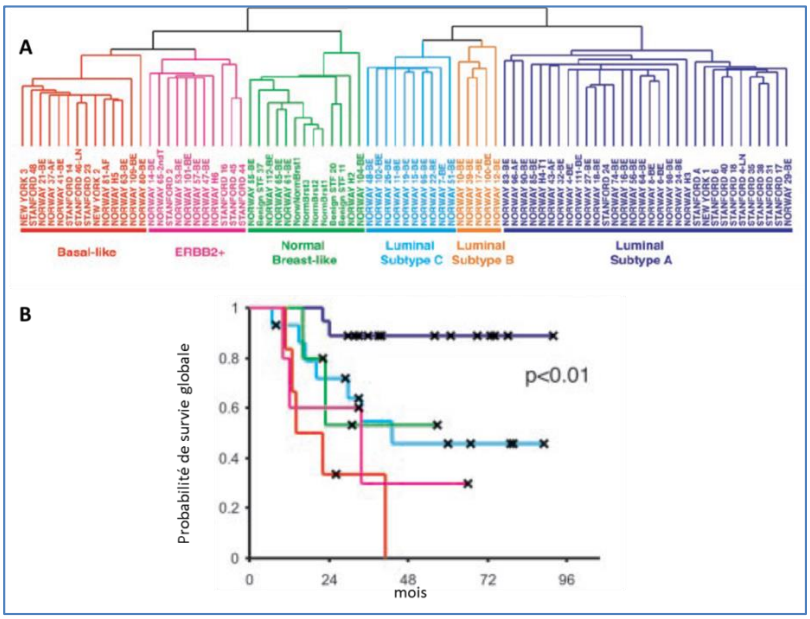


Figure 6. *D'après Réf 16*. A. Clustering hiérarchique permettant de mettre en évidence les différents sous-types moléculaires de carcinome mammaire. B. Survie globale des différents sous-types.

Les travaux ultérieurs ont mené la réconciliation des approches immunohistochimiques conventionnelles et par signatures d'expression génique de manière à proposer une vision aussi réunifiée que possible. L'expression de RE, RP et HER2 permet de classer grossièrement les tumeurs en type luminal (RE+), HER2 (HER2+) et basal (absence d'expression de RE, RP et HER2). On entend par

« RE+ » ou « RP+ » un minimum de 1% de cellules avec un marquage nucléaire positif, en reconnaissant qu'un marquage < 10% reste de signification équivoque[4]. Ces trois marqueurs IHC sont cependant insuffisants et doivent être complétés par plusieurs autres marqueurs qui peuvent être utilisés en routine[17]. L'antigène Ki67 est un marqueur nucléaire de prolifération cellulaire, aidant à la distinction luminal A et luminal B, le seuil étant fixé à environ 14%[4, 18, 19]. L'expression des cytokératines basales (CK 5/6/14) ou luminales (CK 8/18) contribue aussi à une meilleure orientation vers un sous-type moléculaire, ainsi que certains marqueurs membranaires (EGFR, ckit)[19]. La correspondance entre sous-type moléculaire et caractérisation immunohistochimique peut être résumée dans la Table 2.

Sous-type moléculaire	Marqueurs immunohistochimiques
Luminal A	RE+, RP+, Ki67<14%, expression de CK 8/18
Luminal B	RE+, RP + ou -, Ki67≥14%, expression de CK 8/18
HER2 enrichi	RE et RP + ou -, expression/amplification de HER2
Basal	RE-/faible, RP-/faible, HER2-, expression de CK 5/6/14, EGFR, ckit, p53

Table 2. Correspondance entre sous-type moléculaire et caractérisation immunohistochimique

Même s'il est communément admis que cette correspondance est imparfaite[17] et que les signatures d'expression rendent mieux compte des sous-types[20], les outils immunohistochimiques complétés par l'analyse morphologique conventionnelle sont ceux utilisés quotidiennement pour l'attribution diagnostique et la décision thérapeutique[3–5, 21] (voir figure 2). Pour la facilité de lecture, nous nommerons ultérieurement cancers « luminaux » les cancers exprimant au moins le RE, et n'exprimant pas HER2. Nous ne discuterons pas le cas particulier des CS HER2+ qui co-expriment le RE et/ou le RP, que certains dénomment « luminal HER2 » compte tenu de leur histoire naturelle un peu différente de celle des CS HER2+ RE/RP négatifs[22].

Les cancers luminaux représentent plus des deux tiers des carcinomes mammaires infiltrants. Nous avons pu récemment établir lors d'une enquête nationale portant sur 1433 patientes dont 1284 avec une information anatomopathologique complète que 76.2% présentaient un cancer luminal selon la définition retenue pour le présent travail, soit RE+ HER2- [23]. Extrapolés à la population française, ces chiffres permettent d'évaluer à 35-40 000 le nombre de nouveaux cas de CS luminal chaque année en France. La revue de 38 études évaluant les facteurs de risque spécifiques de chaque sous-type a permis de mettre en évidence que la plupart des facteurs de risque connus de CS étaient en fait des facteurs de risque de CS luminal A, c'est-à-dire typiquement RE+ RP+ et faiblement proliférant, et à un moindre degré de CS triple négatif[24]. Plus spécifiquement, les facteurs conduisant à une exposition

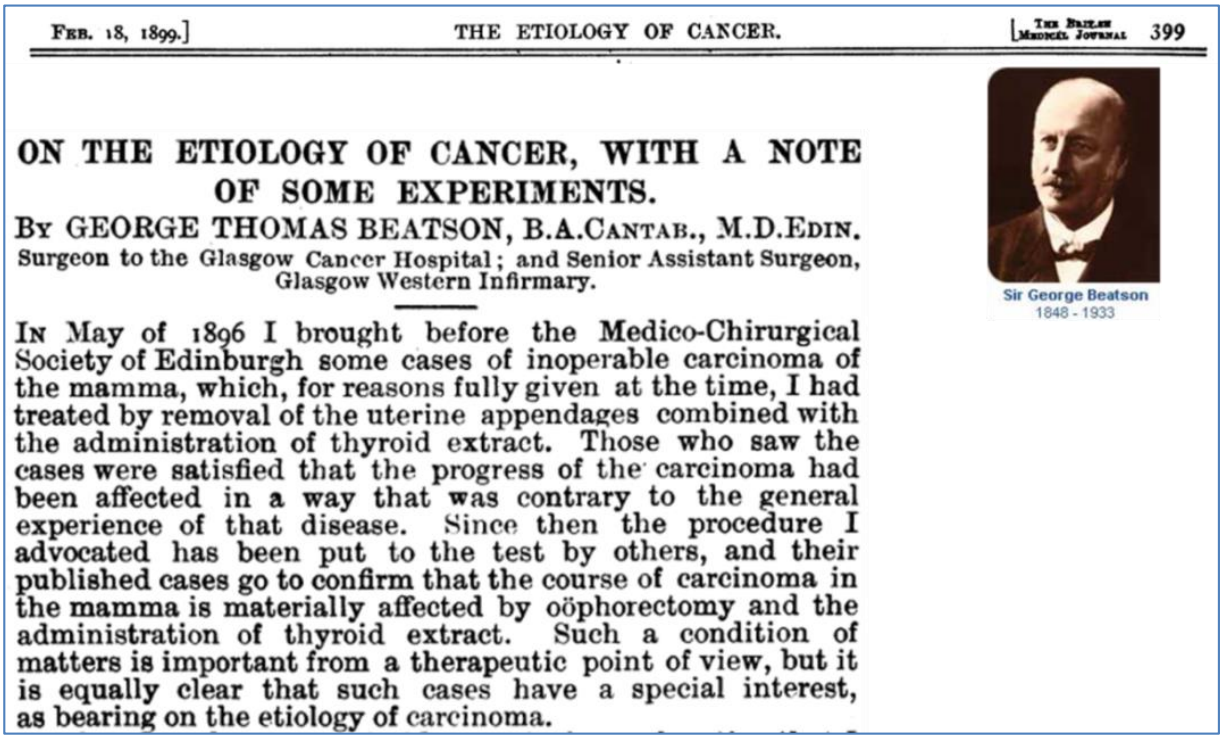
oestrogénique endogène prolongée semblent associés au risque de cancer luminal A : ménarche précoce, parité nulle ou tardive, ménopause tardive. L'approche épidémiologique, combinée à la description moléculaire et anatomopathologique précédemment exposée, permet de rendre compte du comportement différent des cancers luminaux A et B. Il est admis que les tumeurs luminales B ont une moins bonne sensibilité aux traitements hormonaux, et une plus grande chimiosensibilité[25].

La description moléculaire des cancers du sein RE+ a été récemment complétée. La comparaison des profils CGH a permis de montrer que les cancers RE+ RP+ et RE+ RP- présentaient des profils différents pouvant contribuer à expliquer la différence d'hormonosensibilité[26]. Les analyses par séquençage haut débit et l'établissement de profils génomiques haute densité ont précisé le profil moléculaire des CS luminaux A et B. Selon les données de l'International Cancer Genome Consortium, les CS présentent en moyenne une mutation somatique par mégabase, ce qui est dix fois moins fréquent que ce qui est observé par exemple dans les mélanomes, les cancers de vessie ou du poumon[27]. Le profil de mutation observé dans les CS permet d'identifier au moins trois grandes catégories : profil lié à l'âge (donc préférentiellement les CS luminaux), profil lié à une suractivité des cytidine désaminases de la famille APOBEC, et profil BRCA. Ces profils sont préférentiellement associés à certains sous-types intrinsèques[28]. Ces données ont été confirmées par les analyses du TCGA (The Cancer Genome Atlas) qui retrouvent également une fréquence de mutation à une mutation somatique par mégabase[29]. Les CS ont pu être arrangés en 5 « clusters » majeurs selon le gène majeur du profil mutationnel : *CDH1*, *GATA3*, *MAP3K1*, *PIK3CA*, *TP53*, soient les gènes classiquement associés aux cancers luminaux (voir infra) ou de type basal (*TP53*). Les analyses du TCGA ont permis également d'ordonner les cancers en deux grandes classes, dites M (mutation) ou C (copie)[30]. Les CS luminaux même s'ils présentent des altérations du nombre de copie des gènes, appartiennent plus fréquemment que les cancers HER2+ ou de type basal à la classe M, avec des altérations plus fréquentes des voies FGFR, PIK3CA, CCND1. Ainsi, les CS luminaux semblent présenter un profil de mutations plus fréquentes et plus spécifiques que les autres formes de CS, avec un impact thérapeutique potentiel.

2. TRAITEMENTS ENDOCRINIENS : MODALITES

En 1896 puis en 1899, Sir George Beatson, chirurgien écossais de l'Armée Britannique, publie les premiers cas de CS traités par l'ablation des ovaires (figure 7). Son intuition du rôle des ovaires dans la carcinogenèse mammaire sera confirmée par la découverte du RE alpha en 1958 par Jensen, puis par

les données épidémiologiques résumées plus haut. L'influence des hormones sexuelles sur la progression tumorale a été depuis amplement documentée[31].



FEB. 18, 1899.] THE ETIOLOGY OF CANCER. [THE BRITISH MEDICAL JOURNAL 399

ON THE ETIOLOGY OF CANCER, WITH A NOTE OF SOME EXPERIMENTS.

BY GEORGE THOMAS BEATSON, B.A.CANTAB., M.D.EDIN.

Surgeon to the Glasgow Cancer Hospital; and Senior Assistant Surgeon, Glasgow Western Infirmary.

IN May of 1896 I brought before the Medico-Chirurgical Society of Edinburgh some cases of inoperable carcinoma of the mamma, which, for reasons fully given at the time, I had treated by removal of the uterine appendages combined with the administration of thyroid extract. Those who saw the cases were satisfied that the progress of the carcinoma had been affected in a way that was contrary to the general experience of that disease. Since then the procedure I advocated has been put to the test by others, and their published cases go to confirm that the course of carcinoma in the mamma is materially affected by oöphorectomy and the administration of thyroid extract. Such a condition of matters is important from a therapeutic point of view, but it is equally clear that such cases have a special interest, as bearing on the etiology of carcinoma.

Sir George Beatson
1848 - 1933

Figure 7. Extrait de la publication de 1899 de George Beatson (The British Medical Journal).

Le rôle fondamental du RE sous son isoforme α dans la carcinogenèse mammaire est démontré, et sera redétaillé plus bas. Son action principale est de stimuler la prolifération par l'induction de MYC et de la cycline D1 (action canonique), et par l'activation de la voie MAPK-ERK (voie extra-génomique)[32, 33]. Le principe fondamental des traitements endocriniens, encore dénommés hormonothérapie (HT) est de bloquer le fonctionnement du REα. Cette action peut schématiquement s'envisager selon deux voies : soit blocage direct du récepteur lui-même grâce à des agents ayant des propriétés antagonistes, soit blocage de la synthèse des œstrogènes (figure 8).

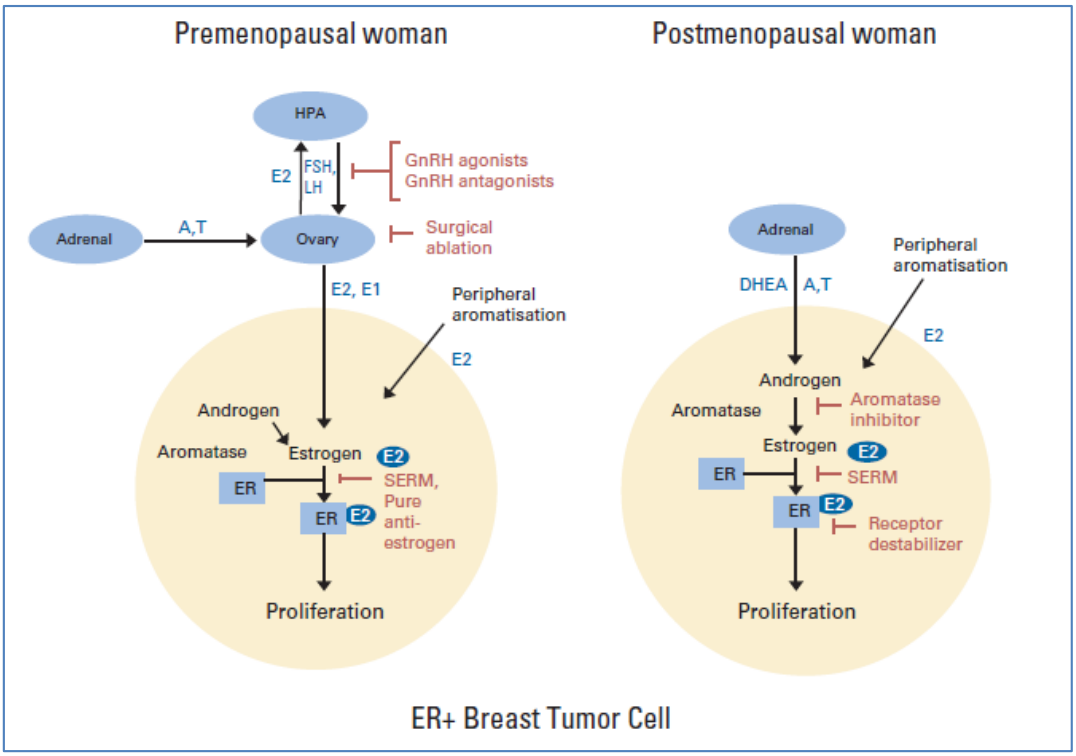


Figure 8. Voie de synthèse des œstrogènes. Les diverses modalités de traitement endocrinien sont indiquées. *D'après la Réf 25*.

Dans les années 1970, le tamoxifène, initialement molécule à visée contraceptive post-coïtale, a été introduit chez les patientes présentant un CS RE+ sur la base de données précliniques. L'efficacité de son métabolite le 4-OH tamoxifène, a été démontrée, et le tamoxifène a bouleversé la prise en charge de ces patientes et *a posteriori* représenté le premier exemple de succès majeur d'une thérapie ciblée[34]. La structuration concomitante des groupes de recherche et des essais cliniques prospectifs a permis dans les décennies suivantes de formaliser les recommandations thérapeutiques actuellement en vigueur et synthétisées ci-dessous.

FEMME NON MENOPAUSEE

Le niveau d'activité des ovaires avant la ménopause rend illusoire l'utilisation des inhibiteurs de l'aromatase en monothérapie. Deux modalités peuvent être utilisées :

- le sevrage oestrogénique (suppression de la fonction ovarienne, SFO)
    - par suppression des ovaires, de manière chirurgicale ou radique
    - par inhibition centrale de la stimulation ovarienne par des agonistes de la LH-RH

- le blocage du RE
    - la seule molécule validée dans cette indication est le tamoxifène, antagoniste partiel du RE

Ces modalités peuvent se combiner selon les indications.

FEMME MENOPAUSEE

Les principes pharmacodynamiques sont identiques à ceux utilisés chez la patiente non ménopausée, mais les modalités varient :

- le sevrage oestrogénique
    - se fait grâce aux inhibiteurs de l'aromatase (IA), qui permettent d'effondrer le taux d'œstradiol (E2) circulant.
- Le blocage du RE
    - Le tamoxifène reste une option thérapeutique valide
    - Le fulvestrant est un composé stéroïdien qui possède des propriétés antagonistes pures, notamment en entraînant la dégradation du REα après s'y être lié.

3. TRAITEMENTS ENDOCRINIENS : RESULTATS ET INFERENCE BIOLOGIQUE

Les traitements endocriniens peuvent être indiqués à toutes les phases du CS. On distingue schématiquement les indications à la phase précoce des indications à la phase avancée. Ces indications sont en partie précisées au sein des référentiels thérapeutiques et des recommandations internationales.

PHASE PRECOCE

On considère deux indications cliniques distinctes.

EN SITUATION ADJUVANTE, APRES LES TRAITEMENTS LOCOREGIONAUX

La situation adjuvante a été étudiée depuis plus de 40 ans sur des dizaines de milliers de patientes, et des recommandations solides ont pu être établies[3, 4, 21] qui peuvent se résumer comme suit, pour les tumeurs RE+ et de taille > 1 cm :

- Patiente non ménopausée : tamoxifène pendant 5 ans. Se discute au cas par cas en fonction de l'âge, de la gravité et de la tolérance l'ajout d'une SFO.
- Patiente ménopausée : IA pendant 5 ans. Une permutation vers le tamoxifène est possible au-delà de 2-3 ans en fonction de la tolérance.
- La prolongation au-delà de 5 ans est admise voire recommandée selon des modalités à discuter au cas par cas.

Le long recul des études d'HT adjuvante a généré deux enseignements majeurs :

- Il n'y a pas de plateau de survie spécifique (mortalité par CS) à long terme, que ce soit avant ou après la ménopause (figure 9).
- Le bénéfice apporté par les IA reste mineur à long terme[6] (figure 10)
- La combinaison blocage oestrogénique (tamoxifène) et déprivation oestrogénique (anastrozole) n'apporte pas de bénéfice[35]

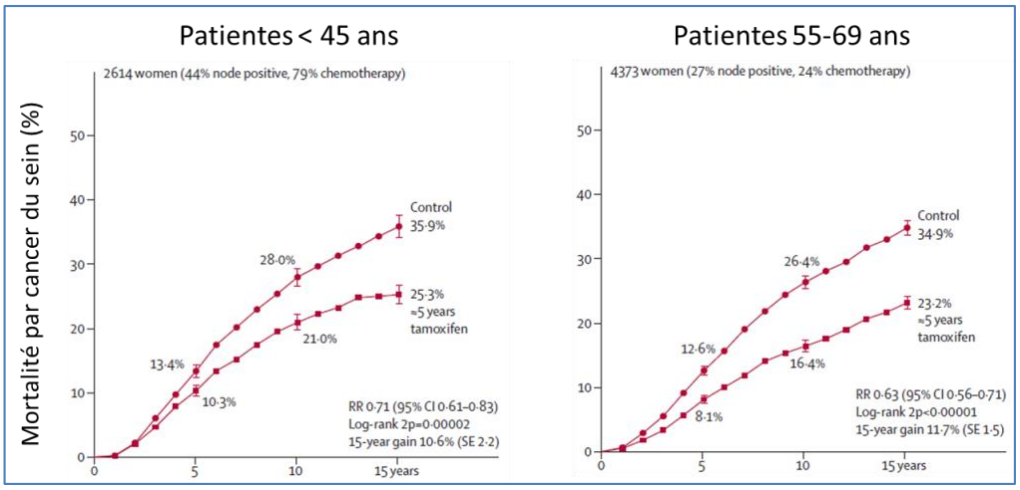


Figure 9. Mortalité par cancer du sein à long terme, en fonction de l'âge au diagnostic et de la prise de tamoxifène[36].

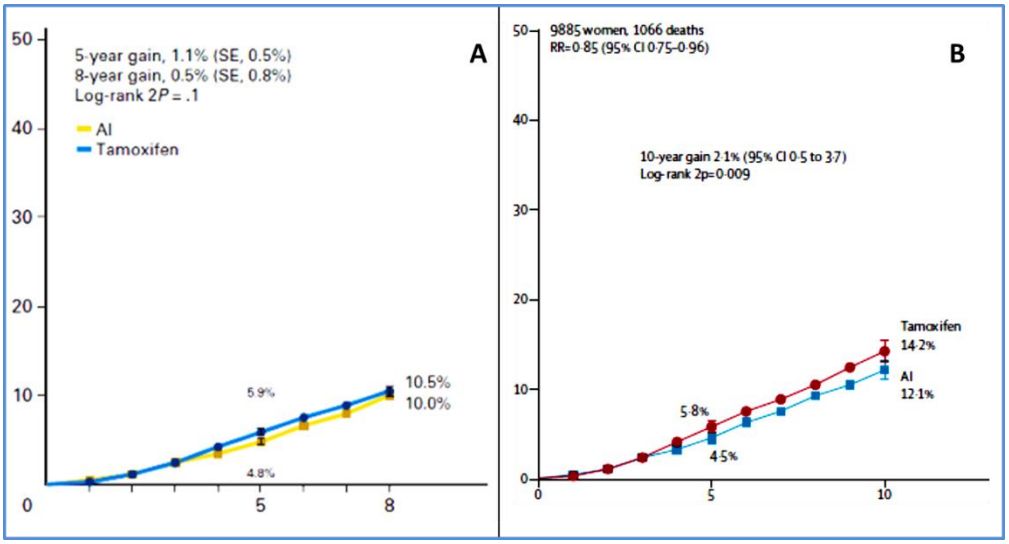


Figure 10. Mortalité comparée par cancer du sein : tamoxifène *vs* IA pendant 5 ans. **A** : à 8 ans[37]. **B** : à 10 ans[6].

Ces observations cliniques, confirmées à de multiples reprises[38–41] et renforcées par les observations de la phase pré-opératoire/néoadjuvante (voir infra), ont permis de conceptualiser l'idée de dormance métastatique[42, 43] (qui ne sera pas discutée ici), ainsi que la notion de résistance aux traitements endocriniens et de s'interroger sur l'existence de mécanismes de résistance potentiellement globaux[44] dont l'étude est le sujet du présent travail. Les études translationnelles menées à partir des grands

essais d'HT adjuvante ont tenté d'isoler les caractéristiques biologiques associées au bénéfice du traitement, et ont permis de mettre en évidence quatre grandes tendances :

- Le niveau d'expression du RE est le facteur prédictif clé. Le dosage quantitatif du RE obtenu dans les essais historiques ayant permis les méta-analyses de l'EBCTCG ont clairement défini un seuil à 10 fmol/mg de protéines, traduit en un score immunohistochimique d'Allred à 2 (table 3), comme nécessaire à un bénéfice de l'HT adjuvante[45]. Il n'a pas été possible de différencier le bénéfice du tamoxifène ou des IA selon le niveau d'expression du RE[46]. Il persiste néanmoins une incertitude pour les patientes avec expression du RE entre 1 et 10% des cellules. Ces tumeurs ont un comportement clinique de tumeurs RE négatives[47], et le profil d'expression se rapproche pour la plupart d'un profil RE négatif voire de type basal[48]. De manière intéressante, il a été montré à la phase avancée que le niveau d'expression du RE (sur la tumeur primitive) était corrélée à l'efficacité du létrozole[49].
- L'expression du RP n'a pas de valeur prédictive mais uniquement pronostique[36].
- Le Ki67 est un facteur pronostique fort, mais non prédictif[50].
- Les signatures génomiques apportent une précision pronostique mais non prédictive[51].

Proportion de cellules marquées	Score de marquage		Intensité moyenne du marquage	Score d'intensité	
Aucune	0		Absence	0	
< 1/100	1		Faible	1	
1/100 – 1/10	2		Intermédiaire	2	
1/10 – 1/3	3		Forte	3	
1/3 – 2/3	4				
> 2/3	5				

Table 3. Score d'Allred. Le score additionne un score de marquage (proportion de cellules marquées) et un score d'intensité d'immunofixation.

La mise en évidence du risque de rechute tardive a entraîné la réalisation d'essais cliniques évaluant l'adjonction de 5 années supplémentaires de traitement à 5 années de tamoxifène. Ces essais sont unanimement positifs avec un gain en survie globale modeste et tardif mais réel[52, 53]. Aucun facteur prédictif de bénéfice à long terme n'a pu être mis en évidence. Les signatures génomiques de deuxième

génération apportent là aussi uniquement une information supplémentaire sur le risque de rechute à long terme[51]. Il est frappant d'observer que malgré ce bénéfice, aucun plateau n'est obtenu.

EN SITUATION NEOADJUVANTE, TUMEUR EN PLACE.

Cette indication a été correctement évaluée uniquement chez la patiente ménopausée, et les molécules utilisables sont soit le tamoxifène, soit maintenant et de manière consensuelle les inhibiteurs de l'aromatase. La littérature reste assez modeste néanmoins, et on peut retenir les points clés suivants[54]:

- Durée de 4 mois au moins, dans un but d'améliorer la conservation mammaire.
- Efficacité clinique modérément supérieure des IA sur le tamoxifène.
- Efficacité biologique des IA mesurée par la baisse de la prolifération (Ki67) supérieure à celle du tamoxifène.
- Réponse histologique identique à celle de la chimiothérapie cytotoxique conventionnelle, mais avec un taux de réponse histologique complète toujours inférieur à 10%.

Outre le faible gain en taux de conservation mammaire, l'intérêt principal de l'approche néoadjuvante est d'utiliser cette opportunité clinique, tumeur en place et non prétraitée, pour évaluer l'action pharmacodynamique des agents anticancéreux, en utilisant des marqueurs intermédiaires biologiques tels le Ki67[55]. Compte tenu du faible taux de réponse histologique conventionnelle, plusieurs groupes ont tenté de déterminer les biomarqueurs d'hormonosensibilité[56, 57]. Le niveau d'expression du RE, la co-expression du RP, la prolifération évaluée par le Ki67 et surtout leurs variations sous traitement semblent être les facteurs conventionnels les plus pertinents[56, 58, 59]. Il a ainsi été défini un score dit « PEPI », *post endocrine treatment preoperative index*, fortement associé à la survie sous traitement hormonal[57]. Ce modèle a secondairement été utilisé pour évaluer les profils d'expression variant sous traitement néoadjuvant par létrozole, et la corrélation de ces variations avec la réponse au traitement[60] (figure 11).

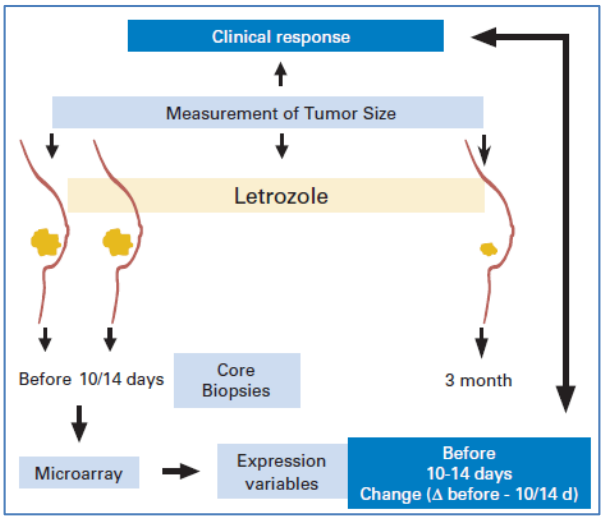


Figure 11. Schéma d'utilisation du modèle néoadjuvant (d'après Réf 60).

Les données issues de ces études soulignent la complexité des mécanismes mis en œuvre dans la réponse au traitement endocrinien avec plus de 200 gènes présentant des variations d'expression très significatives entre répondeurs et non répondeurs. L'analyse ontologique (GO) de ces gènes renforce cette impression de complexité en montrant la diversité des processus biologiques impliqués : biosynthèse ; communication cellulaire ; transduction du signal ; traduction ; etc, ainsi que des fonctions moléculaires : liaison aux acides nucléiques ; transduction ; constituants des ribosomes, etc[60]. Ce concept de fenêtre néoadjuvante, étendue à la période pré-chirurgicale, a été utilisé notamment par les groupes britanniques pour compléter la description des profils d'expression associés à la réponse ou l'absence de réponse à un traitement premier par IA. Il est ainsi fortement suggéré que l'expression initiale, avant traitement, de modules immuns, confirmée par l'observation de l'infiltration tumorale lymphocytaire, est prédictive d'une mauvaise réponse aux IA[61]. Ces données ont été confirmées et étendues, montrant que la dérégulation initiale de la réponse immune et de l'apoptose, ainsi que l'absence de réduction de la prolifération cellulaire après 2 semaines de traitement, étaient fortement associées à une mauvaise réponse aux IA[62].

PHASE AVANCEE

La survie des cancers du sein avancés reste limitée, quel que soit le sous-type considéré, avec une médiane entre 2 et 3 ans n'ayant pratiquement pas évolué depuis plus de 20 ans[63, 64]. Ces résultats décevants démontrent avec force la capacité d'un CS avancé à *résister* aux traitements médicaux

proposés, et ceci s'applique parfaitement aux cancers du sein de type luminal. Un grand nombre d'essais thérapeutiques a été mené dans les cancers du sein luminaux avancés, mais nous focaliserons l'analyse sur deux études récentes qui finiront de poser le cadre clinique dans lequel s'inscrit le présent travail.

L'étude FACT a comparé chez plus de 500 patientes initialement sensibles aux IA la réintroduction d'un IA, l'anastrozole, à la combinaison anastrozole-fulvestrant[12]. On n'observe aucune différence en survie sans progression avec une médiane de 10 mois, ni en survie globale avec une médiane de 37-38 mois (figure 12). Ces données viennent conforter les résultats précédemment obtenus dans ce type de population[11, 13].

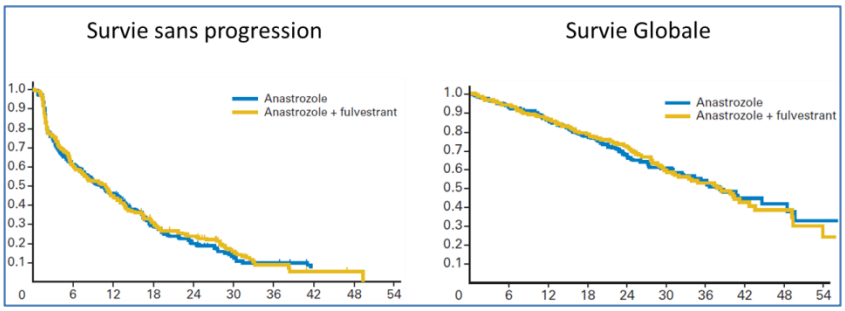


Figure 12. Survie sans progression et survie globale (mois / probabilité) dans l'étude FACT[12].

Dans la population de patientes ayant développé une résistance à l'HT à la phase avancée, l'ensemble des études menées a mis en évidence une survie sans progression médiane de 3-4 mois, quelle que soit la modalité d'HT utilisée. L'étude EFECT a comparé fulvestrant et exemestane (IA stéroïdien) chez plus de 600 patientes ayant développé une résistance aux IA non stéroïdiens. La survie sans progression est de 3,7 mois, sans aucune différence entre les deux molécules, soulignant ainsi la gravité et la fréquence du caractère résistant à l'HT[11].

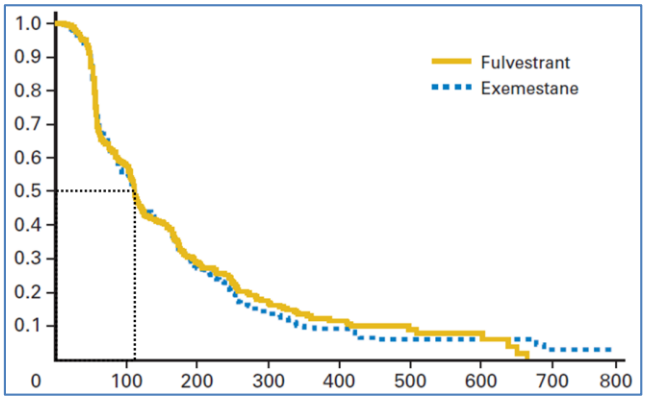


Figure 13. Survie sans progression (jours / probabilité) dans l'étude EFECT[11].

Partie I : résumé

- Les cancers du sein luminaux sont les plus fréquents et leur épidémiologie évoque le rôle de l'exposition oestrogénique
- Les traitements endocriniens induisent un bénéfice clinique majeur à tous les stades mais les rechutes sont fréquentes à la phase précoce et les progressions sous traitement sont constantes à la phase avancée
- L'expression du REα est le seul paramètre biologique conventionnel prédictif validé
- La prolifération et les signatures génomiques n'ont qu'une valeur pronostique
- Il n'est pas possible de mettre en évidence des profils différents de résistance en fonction des classes médicamenteuses
- Le modèle néoadjuvant/préopératoire est potentiellement source d'informations sur l'hormonosensibilité

II. RESISTANCE A L'HORMONOTHERAPIE

L'expérience clinique acquise avec les traitements endocriniens à la phase précoce comme à la phase avancée du CS luminal a mis en évidence le caractère très fréquent de la résistance à ces traitements. Il n'existe aucune définition précise de la « résistance » à l'hormonothérapie. La table 4 illustre les concepts de résistance « primaire » (ou de novo) et de résistance « secondaire » (ou acquise).

	Résistance primaire (de novo)	Résistance secondaire (acquise)
1ère ligne	Rechute dans les 2 premières années du traitement adjuvant	Rechute - après au moins 2 ans de traitement adjuvant - ou à moins de 12 mois après la fin de l'hormonothérapie adjuvante
2ème ligne	Progression sous HT et dans les 6 premiers mois de traitement de 1ère ligne pour maladie avancée	Progression sous HT et après les 6 premiers mois de traitement de 1ère ligne pour maladie avancée

Table 4. Définition clinique de la résistance à l'hormonothérapie.

Ces définitions font l'objet d'accord d'experts[5] et n'ont pas réellement été étayées par des études prospectives. Il convient néanmoins d'observer qu'elles ont une valeur opérationnelle et que les résultats des essais cliniques récents d'HT à la phase avancée sont en ligne avec ces définitions[11, 12].

Nous avons vu en partie I la pauvreté des données biologiques associées à l'hormonorésistance issues des principales études cliniques. La place du RE apparaît néanmoins centrale. De multiples travaux précliniques *in vivo* et *in vitro* ont exploré l'hormonorésistance. Nous avons synthétisé l'état des connaissances à l'initiation de ce travail dans un article de revue paru dans le Bulletin du Cancer (article 1), et dont nous complétons et résumons ici les grandes lignes.

1. LE RECEPTEUR AUX ŒSTROGENES

BIOLOGIE DU RECEPTEUR AUX OESTROGENES

Au-delà du niveau d'expression du RE qui a été discuté plus haut, sa fonctionnalité est un élément critique de la sensibilité à l'action des HT.

Le RE existe sous deux isoformes, REα et REβ. Le REα est la forme majoritairement exprimée dans les cellules mammaires et couramment analysée en routine. Le REβ a été mis en évidence plus récemment[32]. Il s'agit de deux protéines distinctes correspondant à la traduction de deux gènes distincts portés respectivement par les chromosomes 6 et 14. Les deux formes possèdent 6 régions structurelles et contiennent des domaines fonctionnels très homologues[33] (figure 14).

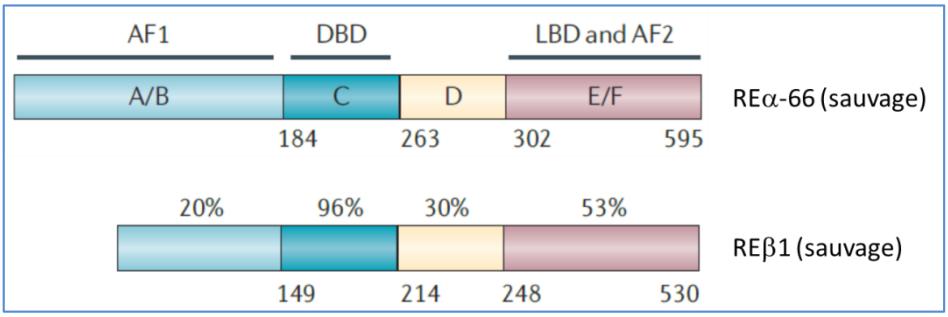


Figure 14. Domaines structurels et fonctionnels de REα et REβ. Les régions A/B contiennent un domaine de transactivation AF1 indépendant du ligand, et un domaine de liaison des co-régulateurs (voir infra). La région C contient le domaine de liaison à l'ADN (*DNA binding domain*, DBD), requis pour la liaison aux sites spécifiques du RE sur l'ADN (*estrogen responsive elements*, ERE). La région D contient le domaine charnière (*hinge*), le signal de localisation nucléaire et une partie du domaine d'activation dépendant du ligand. Les régions E/F contiennent le domaine de liaison du ligand (*ligand binding domain*, LBD) et un domaine de transactivation AF2 dépendant du ligand. Les pourcentages d'homologie entre REα et REβ sont indiqués.

Deux types de mécanismes d'action sont actuellement reconnus pour les RE (figure 15).

1. Le mécanisme classique implique la ligation des œstrogènes, entraînant changement conformationnel spécifique du ligand, homo-dimérisation et liaison aux ERE (*estrogen responsive elements*, sites de liaison du RE à l'ADN). Cette liaison s'accompagne du recrutement de corégulateurs positifs ou négatifs permettant le remodelage de la chromatine et la transcription. Le RE peut également interagir avec d'autres facteurs de transcription tels AP1, RUNX1, NFkB, etc, et se lier à des ERE incomplets.

2. En l'absence de ligand, le RE peut interagir avec plusieurs voies de transduction du signal, par le biais soit de sous-types du récepteur, soit de modifications post traductionnelles (voir infra).

L'analyse des variations du profil d'expression génique observées sous influence de l'exposition à l'E2 dans la lignée MCF-7 souligne l'effet positif sur la prolifération et la progression du cycle cellulaire, et l'effet régulateur négatif sur les répresseurs transcriptionnels et les gènes anti-prolifératifs et pro-apoptotiques[65]. Il est admis que ces différents mécanismes, ainsi que les différentes formes de REα et REβ entraînent des réponses transcriptomiques différentes. Certains gènes représentent des cibles canoniques. La synthèse du RP est sous le contrôle des estrogènes, et son expression est habituellement considérée comme un indicateur de la fonctionnalité du récepteur des estrogènes. Les résultats cliniques obtenus en situation métastatique montrent que les patientes avec une tumeur RE+/RP- répondent moins bien à un traitement hormonal que les patientes dont la tumeur est RE+/RP+[66, 67]. Ces résultats ont été confirmés à la phase adjuvante[36]. Il a de plus été récemment suggéré que le RP agirait comme une véritable « rhéostat » de la fonctionnalité du REα, en contrôlant sa liaison à la chromatine et son activité transcriptionnelle[68]. Cette notion sera développée plus bas. L'absence ou la faible expression du RP contribuerait à une moins bonne efficacité des HT en rendant le RE moins fonctionnel.

La surexpression de pS2/TFF1 (« *Trefoil factor 1* ») dans les cancers du sein a été mise en évidence de longue date[69]. Cette expression est très corrélée à l'expression des RE, et est un facteur de bon pronostic et de bonne réponse au traitement hormonal dans les cancers mammaires primitifs et les métastases[70]. Il avait été montré que la transfection de TFF1 dans des modèles de xénogreffes de cellules mammaires humaines augmentait la prolifération cellulaire et qu'à l'inverse son blocage par des siRNA bloquait la prolifération cellulaire[71]. Le niveau d'expression de pS2/TFF1 peut ainsi être utilisé comme marqueur de la fonctionnalité du REα.

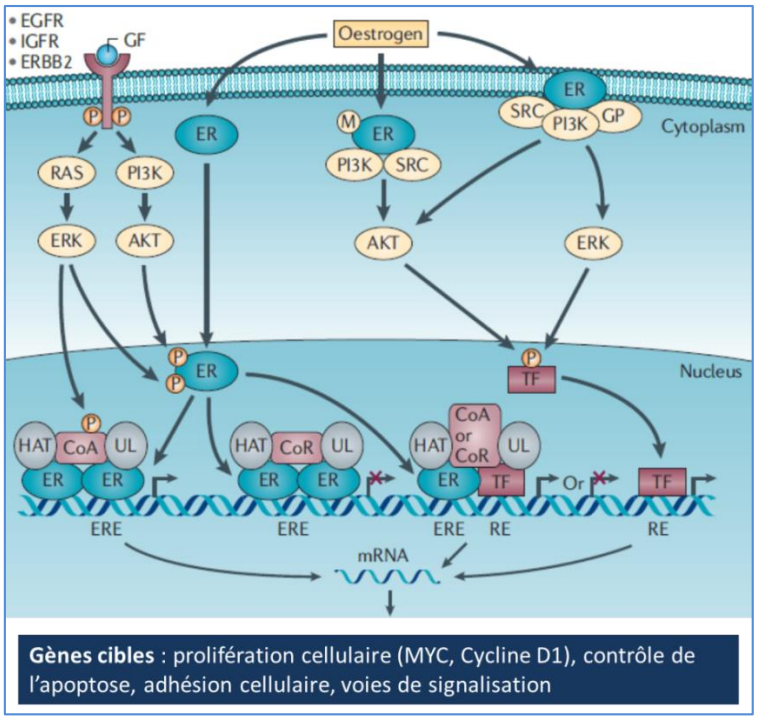


Figure 15. Voies génomique et non-génomique de l'action du RE. CoA : coactivateur. CoR : corépresseur. HAT : histone acétyl transférase. UL : ubiquitine ligase. TF : facteur de transcription

Le REα est la forme très majoritairement exprimée dans les cancers du sein, dans les cellules canalaires, lobulaires et stromales[32]. Le REα promeut la tumorigenèse et la croissance tumorale. Sa forme variante REα36 fréquemment exprimée est associée à la carcinogenèse et l'agressivité tumorale (voir infra). L'expression de REβ est faible voire nulle dans les cancers du sein. L'expression de la protéine par immunohistochimie et quantification des ARN messagers du REβ a été largement étudiée ; cependant, aucune corrélation claire n'a été observée entre l'expression de la protéine et des ARNs[72] et aucun consensus n'a été prospectivement établi permettant de proposer en routine la détermination du statut du REβ dans la prédiction de la réponse à l'hormonothérapie[73].

FORMES VARIANTES DU REα

Il existe plusieurs types de formes variantes du REα. Des mutations d'*ESR1* (gène codant pour le REα), des variants d'épissage, ainsi que de multiples modifications post traductionnelles, ont été décrites.

Les **mutations du REα** peuvent conduire à la synthèse d'un récepteur non fonctionnel qui pourrait rendre la tumeur résistante aux manipulations hormonales. De manière synthétique, les points chauds de mutations se concentrent principalement dans deux domaines clés de la protéine, le domaine *hinge*

(charnière) qui est responsable de la modification conformationnelle du RE après ligation des agents agonistes[74], et le domaine de liaison des ligands (LBD, *ligand binding domain*)[75]. Ces mutations sont extrêmement rares au sein des tumeurs primitives touchant moins de 1 % des cas[76, 77]. Elles ont récemment été réévaluées dans les mécanismes de résistance possible aux HT : il a été montré que la fréquence de mutations activatrices de *ESR1* augmentait jusqu'à 15-20% dans les maladies avancées[75], ce qui en fait un mécanisme de résistance potentielle et pourrait justifier des biopsies systématiques de la maladie RE+ avancée. Des translocations impliquant *ESR1* ont également été récemment identifiées[78].

Un **variant d'épissage** conduisant à une forme tronquée, dite REα36, a été décrit[79]. Ce transcrit est initié par un promoteur contenu dans le premier intron, ce qui entraîne la perte des domaines d'activation de la transcription (AF1 et AF2), et surtout une localisation préférentielle sous la membrane plasmique et dans le cytoplasme avec comme conséquence l'activation de voies de signalisation à initiation sous-membranaire comme la voie MAPK/ERK, ce qui stimule la croissance tumorale. D'une manière plus générale, il a été montré que l'activation oestrogénique peut se faire directement par interaction avec le REα en position membranaire, en activant la voie des MAPKinases et sans interaction avec les domaines spécifiques de reconnaissance des ERE. On évoque le rôle de ces récepteurs membranaires, appelés aussi MISS « *membrane-initiated estradiol signalling* », dans la résistance au tamoxifène[80].

Enfin, de multiples **modifications post-traductionnelles** du REα peuvent aussi influer sur sa fonctionnalité. Ces modifications peuvent combiner phosphorylation, sumoylation, méthylation, acétylation, palmitoylation, et ubiquitination[77, 81]. Ces événements modifient l'expression et la stabilité du RE, ainsi que sa stabilité, sa localisation subcellulaire, et sa sensibilité aux traitements hormonaux.

La figure 16 résume ces principales modifications. Il est à noter que nombre de sites de mutations concernent également des sites de modifications post-traductionnelles ou d'interaction avec les voies de transduction du signal.

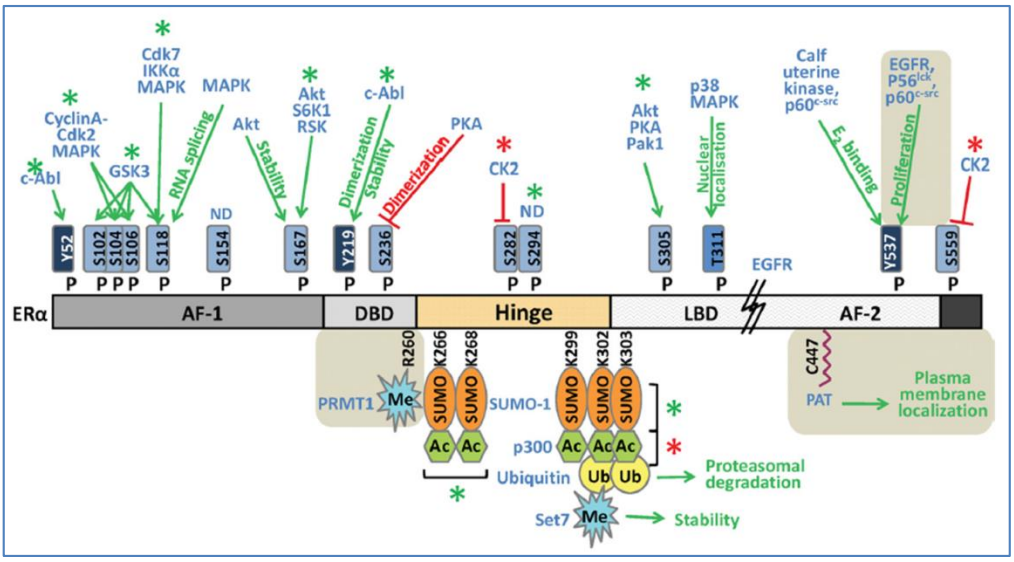


Figure 16. Principaux points chauds de mutation et de modification post-traductionnelles d'*ESR1* (d'après Réf 81). AF : *activation function* ; DBD : *DNA binding domain* ; LBD : *ligand binding domain*.

CO-REGULATEURS DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES.

Le REα remplit sa fonction de facteur de transcription en se dimérisant et en interagissant avec un ensemble de protéines corégulatrices et d'autres facteurs de transcription. Ces interactions protéine-protéine sont influencées par les modifications post-traductionnelles évoquées supra, aussi bien celles du RE que celles des protéines partenaires. Plusieurs études ont montré que ces interactions pouvaient être associées à l'hormonorésistance[82]. Le coactivateur le plus étudié est certainement AIB1 (aussi dénommé NCOA3 ou SCR3). Sa surexpression et son hyperphosphorylation conduisent à une transcription REα dépendante constitutionnelle, qui confère une hormonorésistance *in vitro* et dans des modèles de xénogreffes[83]. Plusieurs revues cliniques rétrospectives sont venues confirmer cette vraisemblable hormonorésistance attribuée à la surexpression d'AIB1[82]. Ces corégulateurs sont nombreux et ont une expression ubiquitaire ; ils régulent des récepteurs et facteurs de transcription autres que le RE ou le RP, ce qui rend leur analyse en clinique difficile du fait de cette absence de spécificité.

Cette notion de corégulateurs s'est récemment enrichie de celle, plus large, de « facteurs pionniers » (*pioneer factors*). Ces facteurs sont des protéines ayant des fonctions transcriptionnelles majeures dans le développement, et en biologie tumorale. Leur rôle principal est de s'associer à la chromatine condensée et de moduler directement son accessibilité[84]. Dans le CS, trois facteurs sont principalement

impliqués dans la fonctionnalité transcriptionnelle normale du REα en garantissant son accès à la chromatine : FOXA1, AP2γ et PBX1. FOXA1 est requis pour pratiquement tous les événements de liaison du RE à la chromatine au niveau des ERE et pour l'expression des gènes sous contrôle du RE. Les facteurs AP2γ et PBX1 sont requis pour 50-60% des sites ERE. D'autres familles comme les facteurs TLE ou GATA semblent également jouer un rôle. En particulier GATA3 est impliqué dans la différenciation dans des modèles de CS luminal[85]. L'expression de FOXA1 ou de GATA3 est associée à un meilleur pronostic et une meilleure sensibilité à l'HT[86, 87].

2. PHARMACOGENETIQUE

La notion que l'hôte peut influencer la réponse à l'hormonothérapie a été particulièrement étudiée ces dernières années grâce à l'identification des polymorphismes du cytochrome 2D6, qui peuvent interférer avec l'efficacité et la tolérance du tamoxifène. Pendant longtemps, le 4-OH-tamoxifène a été considéré comme le principal métabolite actif du tamoxifène, ayant une affinité pour le RE plus de 100 fois supérieure à celle du tamoxifène et inhibant la prolifération de cellules estrogéno-sensibles (MCF-7) 30 à 100 fois plus que le tamoxifène[88]. Cela a été changé par la description récente de l'endoxifène (N-desmethyl 4-OH tamoxifène) dont l'affinité pour le RE est similaire à celle du 4-OH tamoxifène, mais dont la concentration plasmatique est supérieure à celle du tamoxifène (en moyenne 10 fois). Cette concentration est particulièrement variable d'une patiente à l'autre en fonction de polymorphismes du gène codant pour l'enzyme qui métabolise le tamoxifène en endoxifène (CYP2D6) et peut aller jusqu'à des concentrations 100 fois supérieures chez les patientes dites « métaboliseurs ultrarapides» ayant plusieurs copies du gène CYP2D6[89]. A l'inverse, les patientes ayant le génotype CYP2D6*4 et CYP2D6*5 sont des « métaboliseurs lents» ayant des niveaux d'endoxifène circulants très bas, l'activité enzymatique étant nulle. Une grande variation est observée en fonction de l'origine ethnique des patientes[90]. A ce jour, 71 variants du gène ont été décrits correspondant à des activités fonctionnelles différentes de l'enzyme. De nombreuses études rétrospectives ont confirmé l'importance du génotype CYP2D6 dans la réponse au tamoxifène[91–95] alors que 2 études ne confirment pas ces résultats[96, 97]. Il faut noter dans les études positives une plus large analyse des différents variants du gène CYP2D6, incluant en particulier ceux entraînant une diminution de la fonction de l'enzyme[91, 93–95]. Aux USA, la FDA en 2006 a ajouté une recommandation optionnelle pour la prescription du tamoxifène (génotypage CYP2D6). En France, cela n'est pas encore utilisé en pratique clinique et des études prospectives sont en cours évaluant la procédure la plus adaptée pour une

meilleure identification des patientes susceptibles de bénéficier du tamoxifène (NCT01220076). Ainsi il faut tenir compte des interactions médicamenteuses (par exemple, la paroxétine, antidépresseur fréquemment prescrit pour diminuer les bouffées de chaleur et inhibiteur puissant du CYP2D6). Il convient toutefois de noter que les polymorphismes du CYP2D6 n'ont en général pas été associés à une perte de bénéfice du tamoxifène dans les principales études randomisées. Ces analyses sont limitées par leur réalisation sur de petits sous-ensembles des patientes incluses[98, 99]. De plus il existe des données contradictoires sur l'impact des polymorphismes du CYP2D6 sur la survie à long terme sous hormonothérapie à la phase précoce[100]. L'ensemble de ces données ne permet pas actuellement de délivrer une recommandation de routine quant à la caractérisation systématique des polymorphismes.

Une analyse exploratoire rétrospective réalisée dans l'étude ATAC suggère également une interaction pharmacogénétique dans l'activité des inhibiteurs de l'aromatase. Comme pour le tamoxifène, la survenue de bouffées de chaleur ou d'une symptomatologie articulaire est associée à une réduction du risque de rechute de 15 et 35% respectivement, tandis que les patientes présentant des deux types de symptômes ont une réduction du risque de 44% ($p = 0.01$) par apport aux patientes n'ayant pas de retentissement systémique du traitement[101]. Des polymorphismes génétiques du gène CYP19 codant pour l'aromatase pourraient expliquer ces résultats[102].

3. INTERVENANTS MOLECULAIRES INDIRECTS

INTERACTION AVEC LES RESEAUX DE SIGNALISATION (« *CROSS TALK* »)

Le dialogue entre RE et voies de signalisation des facteurs de croissance (*cross talk*) a été établi comme mode de résistance possible aux traitements endocriniens, à partir de données cliniques suggérant que la surexpression en particulier de la famille HER2/EGFR était associée à la résistance[103,104]. Il avait été montré que l'expression d'HER2 est régulée négativement par les estrogènes[105] et que l'expression d'HER2 induit la phosphorylation des RE entraînant une prolifération cellulaire indépendante des estrogènes[106]. En effet, la signalisation par différents récepteurs de facteurs de croissance dont HER2, induit une phosphorylation (donc une activation) de différents facteurs de la voie de signalisation de RE dont le RE lui-même. A titre d'exemple, la phosphorylation de la serine 305 du RE nucléaire augmente la transcription de la cycline D1 dans les cancers du sein, et augmente la prolifération

cellulaire[107]. Ce lien entre RE, HER2 et hormonosensibilité a également été validé au niveau transcriptionnel et l'expression des corégulateurs PAX2 et AIB1 joue un rôle clé : PAX2 stabilise le RE en présence de tamoxifène, ce qui permet de garder une hormonosensibilité ; en présence de AIB1 (voir supra), l'effet régulateur négatif du RE sur HER2 disparaît et libère l'expression de HER2, alors associée à l'hormonorésistance[108]. Ces données ont aussi été confirmées par des résultats cliniques prospectifs. Le blocage combiné de la voie HER2 et voie des estrogènes a été testé dans deux études randomisées. L'étude TAnDEM a comparé chez 207 patientes HER2+/ER+ anastrozole et anastrozole-trastuzumab[109]. Même si cette étude est dite « positive », au sens où la survie sans progression (SSP) est significativement allongée, elle est surtout spectaculaire par le très médiocre résultat obtenu sous anastrozole seul, avec une SSP limitée à 2,4 mois. Ces données ont été confirmées de manière quasi jumelle par l'étude EGF 30008 testant le létrozole contre l'association létrozole et lapatinib, ciblant les voies EGFR et HER2[110], et par l'étude CALGB 40302 ayant évalué l'association fulvestrant-lapatinib[111]. De manière plus générale, il a maintenant été amplement montré que l'E2 pouvait exercer des effets rapides via la signalisation cytoplasmique. Ce dialogue est bidirectionnel, les facteurs de croissance pouvant aussi activer le RE par phosphorylation et entrainer une transcription RE dépendante mais anormale et associée à la résistance[80, 112]. Les principales voies de signalisation sont ainsi potentiellement impliquées, telles la voie Ras/Raf/MAPK, la voie PIK3CA/AKT/mTOR (voir infra) et la machinerie du cycle cellulaire (figure 17).

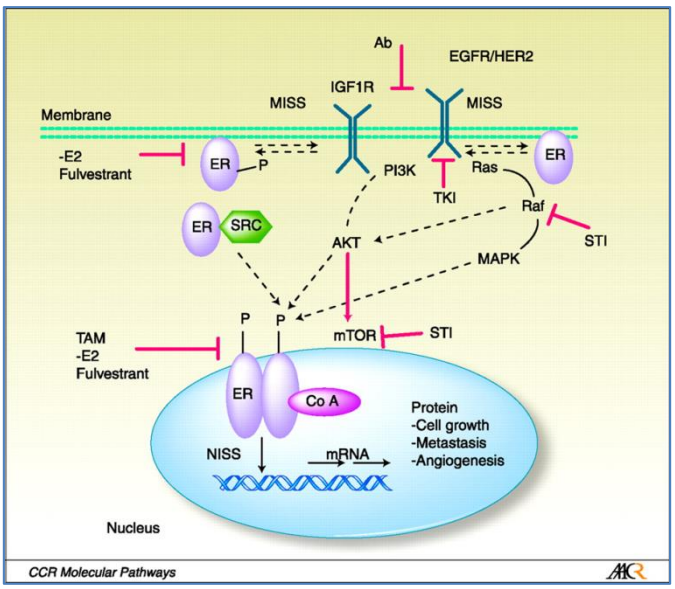


Figure 17. « Crosstalks » entre voie du RE et voies des facteurs de croissance dans le CS luminal (d'après Réf 80)

ERRα

Le ERRα (*estrogen-related receptor* α) est un récepteur nucléaire orphelin, et un marqueur de mauvais pronostic[113]. Il transactive les gènes hormono-dépendants indépendamment de REα. Cependant, REα et ERRα ont en commun certains gènes cibles dont des gènes dont le rôle dans la biologie des cancers du sein est important tels que des gènes localisés sur l'amplicon HER2 ou GATA3[113]. AIB1, co-activateur du REα, stimule directement l'activité transcriptionnelle d'ERRα dans les tumeurs RE négatives. Les complexes ERRα/AIB1 peuvent contrôler les gènes œstradiol-dépendants, indépendamment de l'exposition hormonale[114]. Dans des modèles *in vitro*, il a pu être montré que le blocage pharmacologique d'EERα pouvait restaurer une sensibilité partielle au tamoxifène, et EERα apparaît ainsi comme une cible potentielle pour traiter les maladies devenues résistantes[115].

La figure 18 et la table 5 issues de l'article 1 résument les principales voies de résistance à l'hormonothérapie.

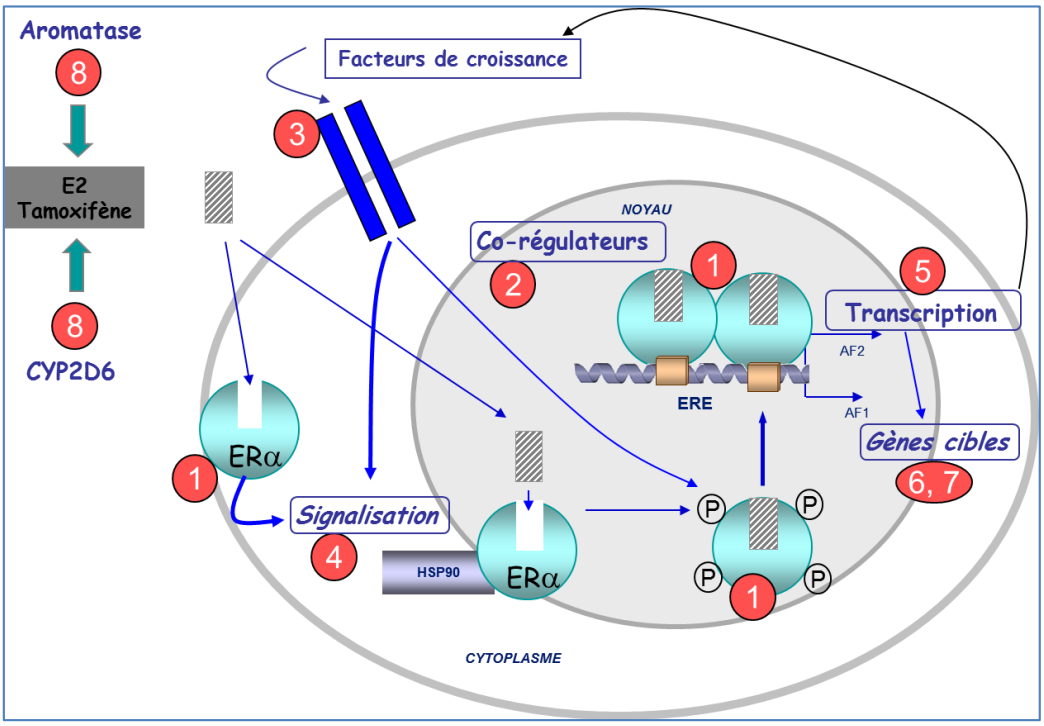


Figure 18 : Mécanismes associés à l'hormonorésistance

Référence figure 18	Catégorie	Mécanismes et voies moléculaires impliqués
1	RE alpha	Faible expression
		Variants mutés et/ou tronqués translocation
		Méthylation, acétylation, phosphorylation, sumoylation, ubiquitination
		Localisation sous membranaire
2	Co-régulateurs et facteurs pionniers	AIB1, NCOA1, etc FOXA1, PBX1, GATA3, etc
3	Récepteurs des Facteurs de croissance	HER2 (PAX2), EGFR
		IGF1R
		FGFR
4	Signalisation cytoplasmique	MAPK/MEK/ERK
		PI3K/ PTEN/ Akt / mTOR
		SRC, BCAR1, BCAR3
5	Facteurs de transcription	NFκB, AP1, myc
6	Cycle cellulaire	CycD1, CycE1
		P21, p27, RB
7	Apoptose et survie	Bcl2, BIK, BAD
		XBP1
8	Pharmacogénétique	CYP2D6, CYP19

Table 5. Mécanismes associés à l'hormonorésistance. Les chiffres font référence à la figure 18.

ARTICLE 1

P. de Cremoux, M. Debled, H. Bonnefoi, **P. Cottu**

Marqueurs biologiques de résistance à l'hormonothérapie dans les cancers du sein

Bulletin du Cancer, 2010 ; 97 (8) : 951-963

Synthèse
General review

Bulletin du Cancer
Société Française du Cancer
Volume 97 • N° 8 • août 2010
©John Libbey Eurotext

Marqueurs biologiques de résistance à l'hormonothérapie dans les cancers du sein

Biomarkers of endocrine therapy-resistance in breast cancers

P. de Cremoux[1], M. Debled[2], H. Bonnefoi[2], P. Cottu[1]
[1]Institut Curie, Département d'oncologie médicale, 26, rue d'Ulm, 75005 Paris, France
<patricia.de-cremoux@curie.net>
[2]Centre Bergonié, Département d'oncologie médicale, Bordeaux, France

Article reçu le 17 mars 2010, accepté le 26 avril 2010
Tirés à part : P. de Cremoux

Résumé. La classification des cancers du sein s'est considérablement précisée ces dernières années grâce, en particulier, aux travaux réalisés à l'aide des outils moléculaires de haut débit. Cela a permis en particulier de mieux affiner des groupes de patients et tumeurs présentant des pronostics distincts. Cependant, la prise en charge des patientes devrait être réellement améliorée en développant nos capacités de prédiction à l'échelon individuel de la réponse ou non-réponse aux thérapeutiques. C'est particulièrement vrai pour la prédiction de la réponse à l'hormonothérapie pour laquelle, pendant des décennies, la quantification des récepteurs hormonaux a été le seul critère de prédiction de la réponse au traitement. Actuellement, il est admis que leur présence est nécessaire, mais non suffisante pour prédire la réponse à un traitement hormonal. De nombreuses voies de résistance potentielle sont actuellement décryptées, ce qui permet de mieux mesurer l'hétérogénéité et la complexité des voies qui vont être activées en réponse à une pression de sélection induite par un traitement continu. Il reste à identifier à l'échelon individuel quelles voies de résistance vont être, en priorité, activées en réponse au traitement donné chez une patiente. ▲

Mots clés : cancers du sein, récepteur hormonal, RE, RP, HER2, prolifération, signature moléculaire

Abstract. During the past decade, molecular signatures allowed a better classification of breast carcinoma and a better evaluation of their prognosis. However, we still need predictive factors of treatment and /or prognosis factors specific of each patient. Regarding hormonal therapy, expression of hormone receptors is essential, but not sufficient to accurately predict response to treatment for all patients. To date, numerous data have identified different pathways of resistance to hormonal treatment, associated with heterogeneity in response to long term treatment. The challenge remains to identify and to anticipate these changes for each patient. ▲

Key words: breast cancer, hormone receptor, ER, PR, HER2, proliferation, molecular signature

Introduction

La progression des cancers du sein est très influencée par l'activation de la signalisation intracellulaire dépendant des récepteurs hormonaux, ainsi que des récepteurs de facteurs de croissance. Les traitements hormonaux ont été les premières thérapeutiques ciblées des cancers du sein, ciblant essentiellement le récepteur aux œstrogènes (RE).

Plus de deux tiers des cancers du sein sont dits hormonodépendants, ce qui signifie qu'ils présentent une expression nucléaire significative des RE et/ou des récepteurs à la progestérone (RP), associée à une probabilité plus ou moins élevée de répondre à un traitement hormonal bloquant la signalisation estrogénique. Ces traitements ont pour objectif soit de bloquer de façon compétitive la fonction des RE (SERMs, *selective*

doi: 10.1684/bdc.2010.1137

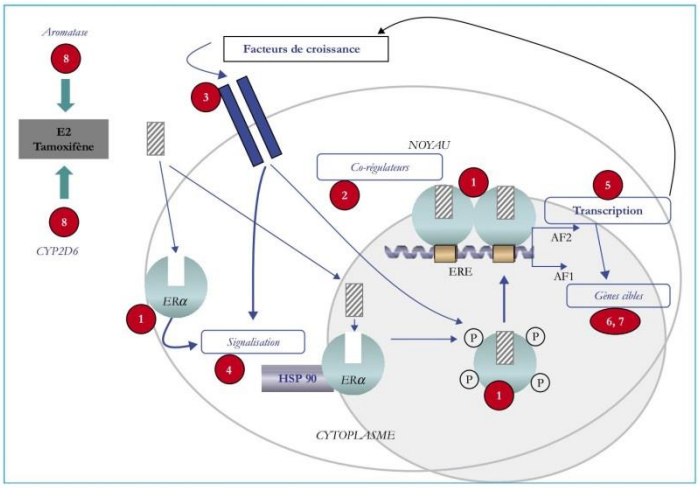


Figure 1. Mécanismes associés à l'hormonorésistance *(cf. tableau 2)*.

estrogen receptor modulators tels que le tamoxifène ou SERDs, *selective estrogen receptor downregulators* tel que le fulvestrant), soit de réduire le niveau des œstrogènes circulants (inhibiteurs d'aromatase (IA) ou suppression de la fonction ovarienne (SFO) chez la femme non ménopausée).

Ces traitements ont, de longue date, montré leur efficacité à la fois en termes de survie sans rechute et de survie globale. Jusque très récemment, toutes les thérapeutiques à visée endocrine étaient considérées comme d'efficacité équivalente et le choix des traitements étaient basés sur des critères de tolérance. Cette situation s'est trouvée modifiée dans les années 1990, avec l'arrivée des IA qui se seront révélés chez les patientes ménopausées légèrement plus efficaces que les traitements antérieurs, en situation métastatique d'abord, puis depuis les années 2000, en phase adjuvante [1-4]. Il apparaît clairement dans la pratique clinique qu'un traitement hormonal « de rattrapage » peut être actif en cas d'échec à une hormonothérapie précédente, montrant une absence, au moins relative, de résistance croisée entre ces différents traitements de mécanisme d'action bien différent au niveau moléculaire. Une question essentielle reste la définition de la stratégie de traitement à un échelon individuel en tenant compte à la fois de l'efficacité probable, mais aussi des effets secondaires indésirables des médicaments, qui seront différents d'une patiente à l'autre. Les paramètres biologiques associés à la sensibilité ou à la résistance aux traitements hormonaux commencent à être bien décryptés, et les études cliniques prospectives tentant de valider ces paramètres en vue d'une utilisation clinique se mettent en place *(figure 1* et *tableau 2)*.

Un marqueur prédictif de réponse est un facteur qui est associé à la réponse au traitement. Ces marqueurs sont en règle analysés sur la tumeur primitive, avant tout traitement. Ils le sont rarement sur la maladie avancée, alors qu'une discordance avec la tumeur primitive peut parfois être observée [5-8]. Nous passons ici en revue ces différents éléments.

RE

À ce jour, les seuls facteurs prédictifs de réponse à l'hormonothérapie ayant fait la preuve de niveau 1[1] dans les cancers du sein sont les récepteurs hormonaux, RE et/ou RP. Plusieurs paramètres directement liés aux récepteurs vont moduler cette réponse.

[1] Une preuve de niveau 1 est une validation non seulement dans des études rétrospectives mais dans de méta-analyses et/ou des études prospectives.

Expression

L'expression du REα (classiquement dosé lors du diagnostic) et du RP est prédictive d'une probable réponse à une hormonothérapie, quelle que soit la méthode d'analyse utilisée. Cette expression a été le premier paramètre prédictif recommandé dans un cadre diagnostique et thérapeutique [9]. La méthode de référence pour l'analyse de cette expression est, depuis les années 2000, l'analyse par immunohistochimie [10]. Il a par ailleurs été montré une très bonne corrélation entre l'expression des ARNs messagers par QRT-PCR et celle de la protéine à partir de tissu congelé [11]. Selon les conclusions de la conférence de consensus du NCI [12], la positivité des récepteurs hormonaux (RE et RP) est définie par une expression nucléaire dans au moins 10 % du contingent invasif des cellules tumorales. La tumeur est alors définie comme hormonodépendante. Les patientes, dont les tumeurs du sein expriment REα et/ou RP, ont une probabilité d'environ 70 % de répondre à une hormonothérapie alors que les patientes dont la tumeur n'exprime ni RE ni RP ont une probabilité de moins de 10 %. La probabilité de réponse est plus élevée quand le profil phénotypique de la tumeur est RE+/RP+ puis RE+/RP– [13, 14]. L'expression d'un ou des récepteurs est nécessaire, mais non suffisante pour prédire une réponse à l'hormonothérapie, car environ 30 % des tumeurs RE+ sont hormonorésistantes d'emblée. Par rapport à la publication initiale, le seuil optimal de positivité des RE continue à être discuté au niveau international par rapport à la prédiction de la réponse à l'hormonothérapie [15, 16]. L'évaluation des récepteurs hormonaux par immunohistochimie est actuellement souvent quantifiée en utilisant le score d'Allred qui combine le pourcentage de cellules marquées ainsi que l'intensité du marquage [10] *(tableau 1)*.

Tableau 1. Score d'Allred : somme des deux scores (marquage + intensité).

Proportion de cellules marquées	Score de marquage	Intensité moyenne du marquage	Score d'intensité
Aucune	0	Absence	0
< 1/100	1	Faible	1
1/100-1/10	2	Intermédiaire	2
1/10-1/3	3	Forte	3
1/3-2/3	4		
> 2/3	5		

Tableau 2. Mécanismes associés à l'hormonorésistance.

Référence figure	Catégorie	Mécanismes/voies moléculaires
1	RE alpha	Faible expression
		Variants mutés et/ou tronqués
		Méthylation, phosphorylation, sumoylation
		Localisation sous-membranaire
2	Corégulateurs	AIB1, NCOA1, PELP1, CBP
3	Récepteurs des facteurs de croissance	HER2 (PAX2), EGFR
		IGF1R
		FGFR
4	Signalisation cytoplasmique	MEK/ERK
		Akt / PTEN
		SRC, BCAR1, BCAR3
5	Facteurs de transcription	NFκB, AP1, myc
6	Cycle cellulaire	CycD1, CycE1
		P21, p27, RB
7	Apoptose et survie	Bcl2, BIK, BAD
		XBP1
8	Pharmacogénétique	CYP2D6, CYP19

Fonctionnalité

La synthèse du RP est sous le contrôle des œstrogènes, et son expression est habituellement considérée comme un indicateur de la fonctionnalité du récepteur RE, même si elle reste discutée par certains auteurs. Les résultats cliniques montrent que les patientes avec une tumeur RE+/RP– répondent moins bien à un traitement hormonal que les patientes dont la tumeur est RE+/RP+ [17-19]. Cette vision évolue actuellement. Les mécanismes d'activation du RP sont similaires à ceux du RE [20]. Comme le RE, il est un facteur de transcription nucléaire, et peut réguler l'expression de différents gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire et la progression tumorale tels que la cycline D1, Bcl2, le VEGF. De façon intéressante, certaines études ont suggéré que la négativité du RP dans les tumeurs RE+ pourrait être un marqueur d'hyperactivité de la voie de signalisation des récepteurs de facteurs de croissance, et non un marqueur de non-fonctionnalité des REs [21, 22]. Cet aspect est développé plus loin.

La surexpression de pS2/TFF1 (*trefoil factor 1*) dans les cancers du sein a été mise en évidence de longue date [23]. Il est très corrélé à l'expression des RE ainsi qu'un facteur de bon pronostic et de bonne réponse au traitement hormonal dans les cancers mammaires primitifs et les métastases [24]. Plus récemment, il a été montré que la transfection de TFF1 dans des modèles de xénogreffes de cellules mammaires humaines augmentait la prolifération cellulaire et qu'à l'inverse son blocage par des siRNA bloquait la prolifération cellulaire [25]. Cependant, son application en clinique est limitée par sa spécificité non limitée aux cancers mammaires mais aussi gastriques, coliques, prostatiques, bronchiques et cancers médullaires de la thyroïde.

Plusieurs auteurs ont mis en évidence des gènes préférentiellement régulés par le tamoxifène ou les œstrogènes dans des modèles de lignées humaines de cellules mammaires tumorales RE+ (GEMs pour *gene expression metasignatures*) [26, 27]. Ils trouvent une corrélation entre l'élévation de l'expression de certains de ces gènes et la rechute de la maladie suggérant un intérêt dans la prédiction de la rechute ainsi que la résistance au tamoxifène, ce qui reste à démontrer en clinique.

RE : REα et REβ

Le RE existe sous deux formes : le REα qui est couramment analysé en routine et le REβ plus récemment mis en évidence [28]. Il s'agit de deux protéines distinctes correspondant à la traduction de deux gènes distincts portés par les chromosomes 6 et 14. L'expression de la protéine par immunohistochimie et quantification des ARN messagers du REβ a été largement étudiée ; cependant, aucune corrélation claire n'a été observée entre l'expression de la protéine et des ARNs [29] et aucun consensus n'a été prospectivement établi permettant de proposer en routine la détermination du statut du REβ dans la prédiction de la réponse à l'hormonothérapie [30]. L'analyse de l'expression du REβ est difficile en raison de sa faible expression dans le tissu mammaire tumoral alors que son expression est plus élevée dans le tissu normal. Il existe cinq différentes isoformes du REβ et de nombreux anticorps différents ont été rapportés dans la littérature, mais les résultats des analyses comparatives ne sont pas superposables [31-36]. Dans une série de 440 patientes, le rôle de REβ1, analysé en immunohistochimie, dans la prédiction de réponse au tamoxifène a été montré [30] alors qu'utilisant le même anticorps, une autre équipe a montré sur une série de 880 patientes l'absence de capacité prédictive de REβ1 [34]. Il faut noter que l'analyse des ARNs du REβ est plus reproductible comme cela a été démontré, mais cette analyse nécessite du matériel tumoral congelé [37, 38]. Ce marqueur a une utilité potentielle dans les cancers du sein, mais sa place reste encore à confirmer.

Récemment, dans une étude clinique incluant 239 patientes préménopausées ayant un cancer du sein hormonodépendant, a été suggéré le rôle de la phosphorylation de la serine 118 du domaine A/B du REα dans la résistance au tamoxifène [39].

Formes variantes du REα

Des mutations du REα ont été décrites ces dernières années, pouvant conduire à la synthèse d'un récepteur non fonctionnel qui pourrait rendre la tumeur résistante aux manipulations hormonales. À titre d'exemple, une substitution lysine-arginine en 303 (K303R) du REα est reconnue comme associée à la résistance au tamoxifène et à une hypersensibilité aux œstrogènes [40]. La même équipe a montré, dans un modèle de lignée humaine de cancer du sein hormonodépendante (MCF-7), que cette mutation était également associée à une résistance aux inhibiteurs de l'aromatase [41]. De plus, dans ce modèle, il est possible d'établir un lien direct entre cette résistance et l'activation de la voie PI3K/Akt, puis d'inhiber cette voie, ce qui restaure la sensibilité aux IA. Ces mutations sont cependant considérées comme très rares dans les tumeurs RE+, touchant moins de 1 % des cas [42].

Plus récemment, le rôle pronostique (prédictif ?) de polymorphismes de *ESR1* (gène codant pour le REα) a été étudié dans une cohorte de 1 001 patientes faisant partie de l'étude POSH [43], ainsi que 29 autres gènes d'intérêt [44]. En analyse univariée, deux polymorphismes de ESR1 (rs3020410 et rs889312) sont significativement associés à un moins bon pronostic chez les patientes traitées par hormonothérapie adjuvante. Cet impact pronostique n'est cependant pas retrouvé en analyse multivariée.

Un variant d'épissage conduisant à une forme tronquée dite REα36 a été décrit [45]. Ce transcrit est initié par un promoteur contenu dans le premier intron, et diffère de la forme complète du RE (REα66) par la perte des domaines d'activation de la transcription

(AF1 et AF2), tout en gardant les domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation des récepteurs. Surtout, REα36 se localise préférentiellement sous la membrane plasmique et dans le cytoplasme, et entraîne l'activation de voies de signalisation à départ membranaire comme la voie MAPK/ERK ce qui stimule la croissance tumorale. Dans deux cohortes de patientes traitées par tamoxifène avec ou sans chimiothérapie, l'expression de REα36 est significativement, et de manière indépendante en analyse multivariée, corrélée à une réduction de la survie sans rechute et de la survie spécifique [46]. D'une manière plus générale, il a été montré que l'activation estrogénique peut se faire directement par interaction avec le REα en position membranaire, en activant la voie des MAP-kinases et sans interaction avec les domaines spécifiques de reconnaissance des éléments de réponses des œstrogènes (ERE). On évoque le rôle de ces récepteurs membranaires, appelés aussi MISS *membrane-initiated estradiol signalling*, dans la résistance au tamoxifène.

Enfin, les modifications posttraductionnelles du REα peuvent aussi influer sur la fonctionnalité du RE. Ces modifications peuvent combiner phosphorylation, sumoylation, méthylation [42]. La méthylation en ARG260 par la PRMT1 (*protein arginine methyltransferase 1*) [47] est aussi associée à la fonction extranucléaire du RE, en induisant son interaction avec la PI3KCA et SRC et activant la voie Akt. Une hyperméthylation du RE a été décrite dans certains cancers du sein, sans que sa signification pronostique/prédictive soit encore établie [48].

Corégulateurs des RE. AIB1

Le REα remplit sa fonction de facteur de transcription en se dimérisant et en interagissant avec un ensemble de protéines corégulatrices et d'autres facteurs de transcription. Ces interactions protéine-protéine sont influencées par les modifications posttraductionnelles évoquées supra, aussi bien celles du RE que celles des protéines qui interagissent. Plusieurs études ont montré que ces interactions pouvaient être associées à l'hormonorésistance [49]. Le coactivateur le plus étudié est certainement AIB1 (aussi dénommé NCOA3 ou SCR3). Sa surexpression et son hyperphosphorylation conduisent à une transcription REα dépendante constitutionnelle, qui confère une hormonorésistance *in vitro* et dans des modèles de xénogreffes [50]. Les mécanismes par lesquels AIB1 confère cette hormonorésistance sont cependant multiples et complexes, pouvant associer majoration de l'effet agoniste du tamoxifène, induction des voies de signalisation des facteurs de croissance notamment HER2 (voir *infra*) avec déséquilibre AIB1/PAX2 [51]. Plusieurs revues cliniques rétrospectives sont venues confirmer cette vraisemblable hormonorésistance attribuée à la surexpression de AIB1 [52], avec cependant une interrogation persistante chez la femme non ménopausée [53]. De plus, AIB1 aurait la faculté de recruter le récepteur relié à REα (ERRα, voir *infra*) en stimulant son activité transcriptionnelle qui est très proche de celle du REα, formant ainsi un complexe AIB1/ERRα contrôlant les gènes régulés par l'estradiol de manière hormono-indépendante (Heck, CCR09). Ces données restent à valider en clinique.

Ces corégulateurs sont nombreux et ont une expression ubiquitaire ; ils régulent des récepteurs et facteurs de transcription autres que le RE ou le RP, ce qui rend leur analyse en clinique difficile du fait de cette absence de spécificité.

Variations au cours de l'évolution tumorale et sous-traitement

Une des voies d'analyse les plus importantes récemment mise en évidence est la variation du niveau d'expression de ERα au cours de l'évolution tumorale et en fonction de la pression thérapeutique. Plusieurs mécanismes ont été invoqués pour expliquer notamment la perte d'expression du REα : perte d'hétérozygotie du locus de ESR1, mutations de ESR1, méthylation du promoteur, modification du niveau d'activité des facteurs de transcription régulant le promoteur de ESR1, dégradation des mRNA, miRNA, épissage alternatif, dégradation du récepteur *via* le protéasome, et *down-regulation* par les voies des facteurs de croissance et des MAPK [54].

Il a notamment été possible, *in vitro*, en inhibant la voie des MAPK, de restaurer une expression significative d'un ERα fonctionnel [55]. De même, il a été montré *in vitro* que le trastuzumab, en inhibant la voie HER2, pouvait restaurer une expression significative de ERα, rendant les cellules alors sensibles à l'action du létrozole [56].

Des études cliniques sont venues confirmer l'importance de la variation de l'expression du REα. L'étude

P024 a comparé l'effet du tamoxifène et du létrozole en situation néoadjuvante [57]. Un indice postopératoire (score PEPI), combinant taille tumorale, statut ganglionnaire, Ki67 et expression de ERα est calculé en fonction du score de chaque variable. Trois groupes sont ainsi définis montrant une étroite corrélation de ce score avec le pronostic à cinq ans [58]. Cet indice a de surcroît été validé grâce à l'étude IMPACT comparant anastrozole et tamoxifène en situation préopératoire [58]. Parallèlement, il a pu être montré que même s'il est globalement conservé, le statut du REα peut être différent entre tumeur primitive et métastase [8].

Intervenants moléculaires indirects au niveau tumoral

Interaction avec les réseaux de signalisation : les facteurs de croissance et leurs récepteurs (*cross talks*)

HER2 est un récepteur de membranaire à activité tyrosine-kinase intrinsèque (c-erbB2/HER2/neu). Il est anormalement amplifié dans environ 15-20 % des cancers du sein [59, 60]. Tenant compte de la relation inverse existant entre l'expression des récepteurs hormonaux et de l'expression de HER2, il est admis que la surexpression de HER2 est un marqueur de résistance à l'hormonothérapie [61, 62]. La surexpression et l'amplification d'HER2 est associée à un grade élevé, une expression moins fréquente (30-50 %) et plus faible de RE et RP [63, 64]. Les liens entre les récepteurs hormonaux et HER2 sont actuellement bien décrits : l'expression d'HER2 est régulée négativement par les œstrogènes [65] et l'expression d'HER2 induit la phosphorylation des RE entraînant une prolifération cellulaire indépendante des œstrogènes [66]. En effet, la signalisation par différents récepteurs de facteurs de croissance, dont HER2, induit une phosphorylation (donc une activation) de différents facteurs de la voie de signalisation de RE, dont le RE lui-même. À titre d'exemple, la phosphorylation de la sérine 305 du RE nucléaire augmente la transcription de la cycline D1 dans les cancers du sein, et augmente la prolifération cellulaire [67]. De même, la phosphorylation de la serine 118 et de la sérine 167 du RE augmente son activité transcriptionnelle [68, 69]. La phosphorylation des RE et de ses protéines corégulatrices par la voie de signalisation des récepteurs de facteurs de croissance (HER2, mais aussi EGFR et IGFR1) est aussi un élément important dans la régulation de l'activité des REs [70]. En présence d'une augmentation de la signalisation de ces voies de récepteurs de facteurs de croissance, ce qui est relativement fréquent dans les cancers du sein, cela peut contribuer à entraîner une résistance au traitement hormonal.

En aval des récepteurs de facteurs de croissance, l'activation aberrante de la voie PI3K/Akt/mTor est fréquente dans le cancer du sein, incluant les cancers du sein RE positifs. *In vitro*, la privation estrogénique combinée à l'inhibition de la sous-unité catalytique de PI3K a un effet de type synergie létale [71].

ERRα

Il a été récemment montré que le ERRα (*estrogen-related receptor* α) qui est un récepteur nucléaire orphelin [72, 73] est un marqueur pronostique dans les cancers du sein de mauvais pronostic clinicopathologique. Il transactive les gènes hormonodépendants indépendamment de REα. Cependant, ils ont en commun certains gènes cibles dont des gènes dont le rôle dans la biologie des cancers du sein est important tels que des gènes localisés sur l'amplicon HER2 ou GATA3. AIB1, coactivateur du REα stimule directement l'activité transcriptionnelle de ERRα dans les tumeurs REα négatives. Les complexes ERRα/AIB1 peuvent contrôler les gènes estradiol-dépendants indépendamment.

MicroRNA

Les microRNA (miRNA) sont des RNA de petite taille qui régulent physiologiquement l'expression des gènes, mais aussi dans un contexte pathologique tel que le cancer. Un panel de miRNA a été mis en évidence dans les cancers du sein n'exprimant pas des RE, et différentiellement exprimés dans les cancers du sein REα positifs et REα négatifs. Dans des modèles précliniques, il a été montré que miR-221 et miR-222 diminuaient l'expression des protéines REα et que les modèles KO pour miR-221/222 restauraient partiellement l'expression du REα. Les cellules deviennent alors sensibles au tamoxifène [74]. Une étude clinique récente montre que miR-195 et let-7a sont détectables à la fois dans la tumeur et dans le sang périphérique des patientes présentant un cancer du sein, ce qui

Tableau 3. Essais thérapeutiques de phase III randomisée en cours. Données extraites du site PDQ® du National Cancer Institute. Les données européennes Eudract sont confidentielles.

Nom essai	Type d'essai	N° PDQ	Question posée/substance	indication
BOLERO-2	Phase III	NCT00863655	Exemestane + everolimus	Échappement à anastrozole ou létrozole
LEANEX	Phase III	NCT00902954	Exemestane	Échappement à anastrozole ou létrozole
STRIDE	Phase III	NCT00925548	BLP25 vaccin liposomal ± hormonothérapie	Maladie avancée, première ligne
Tamoxifène citrate	Phase III	NCT00963209	Dose de tamoxifène et génotype CYP2D6	Indication de tamoxifène
Sans nom	Phase III	NCT00944918	Fulvestrant + placebo *versus* fulvestrant + anastrozole *versus* exemestane	Échappement aux IA non stéroïdiens

laisse augurer des perspectives intéressantes non invasives pour l'exploration clinique de ces marqueurs dans un futur proche [75].

Données cliniques

Au-delà du modèle expérimental cité plus haut (*cf.* chapitre variant du RE) [56], plusieurs études cliniques ont maintenant évalué l'apport potentiel du blocage des voies des facteurs de croissance. En monothérapie après échec des traitements hormonaux conventionnels, le géfitinib (inhibiteur de la tyrosine-kinase de l'EGFR/HER1) est inefficace [76]. Le géfitinib a été associé à l'anastrozole en situation néoadjuvante [77]. Aucun effet biologique ni clinique n'a été observé.

Le blocage combiné de la voie HER2 et voie des œstrogènes a été testé dans deux études randomisées. L'étude TAnDEM a comparé chez 207 patientes HER2+/ER+ anastrozole et anastrozole-trastuzumab [78]. Même si cette étude est dite « positive », au sens où la PFS est significativement allongée, elle est surtout spectaculaire par le très médiocre résultat obtenu sous anastrozole seul : PFS limitée à 2,4 mois ! Ces données ont été confirmées de manière quasi jumelle par l'étude EGF 30008 testant létrozole *versus* létrozole + lapatinib, ciblant ainsi les voies HER1 et HER2 [79]. Dans cette étude, il est confirmé que le ciblage de HER2 reste la « pierre angulaire » du traitement de ce sous-type de cancers du sein. L'analyse rétrospective en sous-groupes de patientes HER2 négatives, en évolution précoce, suggère dans cette situation un effet du lapatinib. Au total, ces études prospectives, randomisées, multicentriques, démontrent que les traitements hormonaux sont intrinsèquement peu efficaces chez les patientes HER2+. Cela souligne avant tout le besoin de documenter biologiquement la maladie métastatique avant toute décision thérapeutique *(tableau 3)*.

Un blocage en aval de la voie de signalisation des récepteurs de facteurs de croissance par un inhibiteur de mTor-everolimus [80] en situation néoadjuvante semble majorer l'efficacité du létrozole au plan biologique (diminution du KI67, diminution de phospho S6) et clinique.

Prolifération

Son rôle dans la réponse à l'hormonothérapie est plus implicite que démontré. Si une prolifération élevée est un facteur prédictif de réponse pathologique à une chimiothérapie néoadjuvante [81-83], la démonstration d'une mauvaise réponse à l'hormonothérapie dans le cas d'une tumeur hautement proliférante ou d'une efficacité différente du tamoxifène *versus* les IA n'est pas claire ou insuffisamment documentée. Cela est en partie dû aux différentes modalités d'analyse de la prolifération (analyse de la phase S, KI67, index mitotique, cyclines E et D1, thymidine-kinase et des difficultés de seuillage en fonction du type d'anticorps utilisé), et de l'absence actuelle de standardisation internationale des méthodes d'analyse.

En situation adjuvante un niveau élevé de l'expression de KI67 est associé à un pronostic défavorable que cela soit sous tamoxifène, goséréline ou létrozole [84, 85]. L'analyse de l'étude ATAC utilisant le test Oncotype Dx® et le *Recurrent Score* (RS) confirme la valeur pronostique défavorable d'un RS élevé [86].

Dans un cadre néoadjuvant, plusieurs études concordantes montrent que la diminution de la prolifération (KI67) est un marqueur précoce de la réponse à l'hormonothérapie [87-89].

Signatures moléculaires

De manière confirmatoire, au moins neuf signatures génomiques ont confirmé la valeur pronostique péjorative d'une prolifération [90]. Cette information est surtout pertinente dans les tumeurs RE+ HER2– témoignant d'une vraisemblable résistance au moins relative de ces tumeurs aux manipulations hormonales.

Les analyses génomiques de haut débit (transcriptome) ont permis ces dernières années une meilleure classification des cancers du sein et en particulier des cancers du sein dits « hormonodépendants » (RE+) en deux sous-groupes, luminaux A et luminaux B. Ces deux sous-groupes ont cependant des caractéristiques phénotypiques différentes, ainsi que des pronostics et des réponses au traitement différents : les cancers du sein luminaux A ont les plus hauts niveaux d'expression des récepteurs hormonaux ainsi que les proliférations les plus faibles. Ils ont un meilleur pronostic et une bonne réponse aux traitements hormonaux [91-93]. Les cancers du sein luminaux B ont des taux de récepteurs hormonaux plus faibles, ainsi que d'autres altérations moléculaires telles que des mutations de la protéine p53, parfois une surexpression de HER2, et en général un moins bon pronostic et une moins bonne réponse au traitement hormonal que les luminaux A [94].

Ces analyses ont aussi permis de mettre en évidence des gènes fortement liés au REα. Une première analyse a mis en évidence une série de 18 gènes régulés par les œstrogènes (entre autres RP, IGF-1R, BCl2) [95].

La signature « 21 gènes » a été initialement développée et décrite par Paik *et al.* [96] (Oncotype Dx, Genomic Health, Redwood City, CA) comme une signature permettant de prédire la rechute à dix ans chez des patientes présentant un cancer du sein sans envahissement ganglionnaire, ayant des RE et traitées pendant cinq ans par tamoxifène. Cette signature comprend 16 gènes cibles et cinq gènes de référence. Les gènes cibles sont classés en cinq groupes en fonction de leur fonctionnalité : REα (*REα*, *RP*, *BCl2*, *Scube2*) HER2 (*HER2*, *GRB7*), prolifération (*KI67*, *STK 15*, *survivine*, *cycline B1* et *MYBL2*), invasion (*stromélysine 3*, *cathepsine L2*), autres (*GSTM1*, *Bag1*, *CD68*). Elle a initialement été évaluée rétrospectivement chez des patientes incluses dans l'essai NSABP B-14 qui comparaît tamoxifène et surveillance.

Un algorithme a été défini par les auteurs à partir des valeurs d'expression de ces différents gènes auxquels un coefficient différent est attribué. Il leur permet de définir un risque de rechute (RS, *Recurrence Score*) bas (RS < 18), intermédiaire (RS entre 18-30) et un risque de rechute élevé (RS > 30) [97]. La validation externe de cette étude a ensuite été réalisée et publiée par Habel *et al.* sur une étude rétrospective indépendante [98]. Il s'agit d'une étude cas-témoins chez des patientes dont la tumeur est sans envahissement ganglionnaire et ne recevant pas de chimiothérapie, incluant 220 patientes décédées de leur cancer du sein et 570 témoins appariés. La très forte corrélation entre le RS et le risque de décès a conforté le score de risque et le test a été validé par le CLIA (*under provision of the Clinical Laboratory Improvement Act of 1988*-CLIA). À l'inverse, l'étude d'Esteva du MD Anderson, sur 149 patientes ayant un cancer du sein de stades I et IIa sans envahissement ganglionnaire, RH+ (69 %), HER2 (17 %) ne confirme pas la valeur prédictive du test [99].

Le seul essai prospectif intitulé *trial assigning individualized options for treatment* (RX) ou TAILORx, en cours d'inclusions, a pour objectif principal de valider cette signature dans la prédiction individuelle de la réponse à la chimiothérapie, et non l'hormonothérapie [100]. Il n'y a pas effectivement de validation prospective de la prédiction de l'hormonothérapie réalisée ou prévue. Une signature de 36 gènes prédisant la rechute chez les patientes traitées par tamoxifène a été récemment publiée. Elle a été définie à partir d'une série de 138 patientes ayant eu un traitement adjuvant par tamoxifène. Elle permet de prédire 78 % des patientes qui ont rechuté et 80 % des patientes sans rechute [101]. Le test développé par Ma *et al.*, analyse le rapport d'expression d'ARN de deux gènes HOXB13/IL17BR. Ces deux gènes dérivent d'une analyse rétrospective de *microarrays* réalisée sur des fragments congelés de tumeur du sein de patientes traitées par tamoxifène et radiothérapie en situation adjuvante [102]. Cette signature a été récemment complétée avec des gènes liés à la prolifération [103].

Pharmacogénétique

La notion que l'hôte pouvait interférer dans la réponse à l'hormonothérapie a été particulièrement étudiée ces dernières années grâce à l'identification des polymorphismes du cytochrome 2D6, qui peuvent interférer avec l'efficacité et la tolérance du tamoxifène. Pendant

longtemps, le 4-OH-tamoxifène a été considéré comme le principal métabolite actif du tamoxifène, ayant une affinité pour le RE plus de 100 fois supérieures à celle du tamoxifène et inhibant la prolifération de cellules estrogénosensibles (MCF-7) 30 à 100 fois plus que le tamoxifène [104], jusqu'à la description récente de l'endoxifène (N-desmethyl 4-OH tamoxifène) dont l'affinité pour le RE est similaire à celle du 4-OH tamoxifène, mais dont la concentration plasmatique est supérieure à celle du tamoxifène (en moyenne dix fois) mais particulièrement variable d'une patiente à l'autre en fonction de polymorphismes du gène codant pour l'enzyme qui métabolise le tamoxifène en endoxifène (CYP2D6) et pouvant aller à des concentrations 100 fois supérieures chez les patientes dites « métaboliseurs ultrarapides » ayant plusieurs copies du gène *CYP2D6* [105, 106]. À l'inverse, les patientes ayant le génotype CYP2D6*4 et CYP2D6*5 sont des « métaboliseurs lents » ayant des niveaux d'endoxifène circulants très bas, l'activité enzymatique étant nulle. Une grande variation est observée en fonction de l'origine ethnique de la patiente [107]. À ce jour, environ 71 variants du gène ont été décrits correspondant à des activités fonctionnelles différentes de l'enzyme. De nombreuses études rétrospectives ont confirmé l'importance du génotype CYP2D6 dans la réponse au tamoxifène [108-112] alors que deux études ne confirment pas ces résultats [113, 114]. Il faut noter dans les études positives une plus large analyse des différents variants du gène *CYP2D6*, incluant en particulier ceux entraînant une diminution de la fonction de l'enzyme [108-111]. Aux États-Unis, la FDA en 2006 a ajouté une option pour la prescription du tamoxifène (génotypage CYP2D6). En France, cela n'est pas encore utilisé en pratique clinique et des études prospectives sont en cours pour évaluer la procédure la plus adaptée pour une meilleure identification des patientes susceptibles de bénéficier du tamoxifène en particulier en tenant compte des interactions médicamenteuses (par exemple, la paroxétine, antidépresseur fréquemment prescrit pour diminuer les bouffées de chaleur et inhibiteur très puissant du CYP2D6).

Une analyse exploratoire rétrospective réalisée dans l'étude ATAC suggère également une interaction pharmacogénétique dans l'activité des inhibiteurs de l'aromatase. Comme pour le tamoxifène, la survenue de bouffées de chaleur ou d'une symptomatologie articulaire est associée à une réduction du risque de rechute de 15 et de 35 % respectivement, tandis que les patientes présentant les deux types de symptômes ont une réduction du risque de 44 % ($p = 0{,}01$) par apport aux patientes n'ayant pas de retentissement systémique du traitement [115]. Des polymorphismes génétiques du gène *CYP19* codant pour l'aromatase pourraient expliquer ces résultats [116].

Même si l'on connaît le métabolisme des IA, il y a encore très peu de données concernant des altérations pharmacogénétiques qui entraîneraient des variations dans l'efficacité de ces médicaments [117]. Des études prospectives et rétrospectives sont en cours notamment en France.

Conclusions et perspectives

Récemment, M. Dowsett et son équipe ont proposé une nouvelle évaluation de la résistance aux œstrogènes des tumeurs du sein : le GIDE (*global index of dependence on estrogens*). Cet index de signatures moléculaires inclut des gènes de prolifération, apoptose/autophagie, quiescence cellulaire, angiogenèse, invasion, métastase, etc.) [118]. Cet index devrait être validé dans l'étude prospective préopératoire POETIC. Les données pharmacogénétiques du tamoxifène sont en cours d'évaluation dans le cadre d'un protocole prospectif préopératoire français qui analyse en parallèle la pharmacocinétique du tamoxifène et de ses métabolites ainsi que les variants du CYP2D6 chez les patientes traitées pendant cinq semaines par tamoxifène (PHRC AO 2008 FNCLCC). De nouvelles voies de développement de molécules sont en cours avec des NRAMs, molécules bloquant l'hélice 12 du RE, bloquant les coactivateurs du RE [119] *(tableau 3)*.

Ainsi, depuis des années, la connaissance des mécanismes de sensibilité et de résistance à l'hormonothérapie s'est élargie, et les outils d'analyses se sont considérablement perfectionnés. Cependant, les seuls marqueurs, utilisables en routine clinique, prédictifs de réponse à l'hormonothérapie restent au niveau international les RE et RP, et nous ne disposons en pratique clinique d'aucun critère clinique, anatomopathologique ou biologique qui permette de choisir entre différents traitements endocrines qui ont pourtant des mécanismes d'action très différents. Cependant, lors d'une résistance à l'hormonothérapie, dans la majorité des tumeurs, l'expression des récepteurs persiste, témoignant de la complexité du réseau de signalisation

interagissant avec les récepteurs hormonaux. De multiples essais tentent actuellement de mettre en pratique ces données pour approcher d'une application plus individualisée des traitements hormonaux des cancers du sein tenant compte non seulement de la tumeur, mais aussi de l'hôte, en particulier dans sa capacité à métaboliser ou non le médicament administré. ▼

Remerciements. Pr J. Robert pour ses très pertinentes critiques. Mme P. Mandé pour son aide dans l'organisation du manuscrit.

Conflits d'intérêts : aucuns.

Références

1. Forbes JF, Cuzick J, Buzdar A, Howell A, Tobias JS, Baum M. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 2008 ; 9 : 45-53.

2. Coates AS, Keshaviah A, Thurlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, *et al.* Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : 486-92.

3. Goss PE, Ingle JN, Pater JL, Martino S, Robert NJ, Muss HB, *et al.* Late extended adjuvant treatment with letrozole improves outcome in women with early-stage breast cancer who complete 5-year of tamoxifen. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 1948-55.

4. Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF, Paridaens R, Coleman RE, Jones SE, *et al.* Survival and safety of exemestane *versus* tamoxifen after 2-3-years' tamoxifen treatment (intergroup exemestane study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007 ; 369 : 559-70.

5. Guarneri V, Giovannelli S, Ficarra G, Bettelli S, Maiorana A, Piacentini F, *et al.* Comparison of HER2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management. *Oncologist* 2008 ; 13 : 838-44.

6. Lower EE, Glass EL, Bradley DA, Blau R, Heffelfinger S. Impact of metastatic estrogen receptor and progesterone receptor status on survival. *Breast Cancer Res Treat* 2005 ; 90 : 65-70.

7. Lu J, Steeg PS, Price JE, Krishnamurthy S, Mani SA, Reuben J, *et al.* Breast cancer metastasis: challenges and opportunities. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 4951-3.

8. Steeg PS, Theodorescu D. Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008 ; 5 : 206-19.

9. Panel ATME. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1996 ; 14 : 2843-77.

10. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999 ; 17 : 1474-81.

11. de Cremoux P, Tran-Perennou C, Elie C, Boudou E, Barbaroux C, Poupon MF, *et al.* Quantitation of estradiol receptors alpha and beta and progesterone receptors in human breast tumors by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Correlation with protein assays. *Biochem Pharmacol* 2002 ; 64 : 507-15.

12. Group EBCtc. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005 ; 365 : 1687-717.

13. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Powe DG, Gee J, *et al.* Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : 4772-8.

14. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 1973-9.

15. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, *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 : 5287-312.

16. Allred DC, Mohsin SK. ER expression is not bimodal in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2005 ; 124 : 474-5 (author reply 475-6).

17. Bezwoda WR, Esser JD, Dansey R, Kessel I, Lange M. The value of estrogen and progesterone receptor determinations in advanced breast cancer. Estrogen receptor level but not progesterone receptor level correlates with response to tamoxifen. *Cancer* 1991 ; 68 : 867-72.

18. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, McGuire WL, Fabian C, Pugh RP. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992 ; 10 : 1284-91.

19. Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, *et al.* Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immunohistochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer* 2000 ; 89 : 111-7.

20. Cui X, Zhang P, Deng W, Oesterreich S, Lu Y, Mills GB, *et al.* Insulin-like growth factor-I inhibits progesterone receptor expression in breast cancer cells *via* the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway: progesterone receptor as a potential indicator of growth factor activity in breast cancer. *Mol Endocrinol* 2003 ; 17 : 575-88.

21. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 7721-35.

22. Creighton CJ, Kent Osborne C, van de Vijver MJ, Foekens JA, Klijn JG, Horlings HM, *et al.* Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2009 ; 114 : 287-99.

23. Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1982 ; 10 : 7895-903.

24. Mathelin C, Tomasetto C, Rio MC. Trefoil factor 1 (pS2/TFF1), a peptide with numerous functions. *Bull Cancer* 2005 ; 92 : 773-81.

25. Amiry N, Kong X, Muniraj N, Kannan N, Grandison PM, Lin J, *et al.* Trefoil factor-1 (TFF1) enhances oncogenicity of mammary carcinoma cells. *Endocrinology* 2009 ; 150 : 4473-83.

26. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 2003 ; 144 : 4562-74.

27. Ochsner SA, Steffen DL, Hilsenbeck SG, Chen ES, Watkins C, McKenna NJ. GEMS (gene expression metasignatures), a web resource for querying meta-analysis of expression microarray datasets: 17-beta-estradiol in MCF-7 cells. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 23-6.

28. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 5925-30.

29. Balfe P, McCann A, McGoldrick A, McAllister K, Kennedy M, Dervan P, *et al.* Estrogen receptor alpha and beta profiling in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004 ; 30 : 469-74.

30. Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, Younes M, Takubo K, *et al.* Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 3727-34.

31. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, *et al.* Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 247 : 75-8.

32. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, *et al.* Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor ofestrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 1998 ; 26 : 3505-12.

33. Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson JA. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* 2003 ; 546 : 17-24.

34. Speirs V, Carder PJ, Lane S, Dodwell D, Lansdown MR, Hanby AM. Estrogen receptor beta: what it means for patients with breast cancer ? *Lancet Oncol* 2004 ; 5 : 174-81.

35. Esslimani-Sahla M, Simony-Lafontaine J, Kramar A, Lavaill R, Mollevi C, Warner M, *et al.* Estrogen receptor beta (ER beta) level but not its ER beta cx variant helps to predict tamoxifen resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 5769-76.

36. Vinayagam R, Sibson DR, Holcombe C, Aachi V, Davies MP. Association of estrogen receptor beta-2 (ER beta-2/ER beta cx) with outcome of adjuvant endocrine treatment for primary breast cancer-a retrospective study. *BMC Cancer* 2007 ; 7 : 131.

37. de Cremoux P, Bieche I, Tran-Perennou C, Vignaud S, Boudou E, Asselain B, *et al.* Interlaboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocr Relat Cancer* 2004 ; 11 : 489-95.

38. Davies MP, O'Neill PA, Innes H, Sibson DR, Prime W, Holcombe C, *et al.* Correlation of mRNA for estrogen receptor beta splice variants ERbeta1, ERbeta-2/ERbetacx and ERbeta-5 with outcome in endocrine-treated breast cancer. *J Mol Endocrinol* 2004 ; 33 : 773-82.

39. Kok M, Holm-Wigerup C, Hauptmann M, Michalides R, Stal O, Linn S, *et al.* Estrogen receptor: a phosphorylation at serine-118 and tamoxifen response in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009 ; 101 : 1725-9.

40. Fuqua SA, Wiltschke C, Zhang QX, Borg A, Castles CG, Friedrichs WE, *et al.* A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 4026-9.

41. Barone I, Cui Y, Herynk MH, Corona-Rodriguez A, Giordano C, Selever J, *et al.* Expression of the K303R estrogen receptor-alpha breast cancer mutation induces resistance to an aromatase inhibitor *via* addiction to the PI3K/Akt kinase pathway. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 4724-32.

42. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 2009 ; 9 : 631-43.

43. Eccles D, Gerty S, Simmonds P, Hammond V, Ennis S, Altman DG. Prospective study of outcomes in sporadic *versus* hereditary breast cancer (POSH): study protocol. *BMC Cancer* 2007 ; 7 : 160.

44. Tapper W, Hammond V, Gerty S, Ennis S, Simmonds P, Collins A, *et al.* The influence of genetic variation in 30 selected genes on the clinical characteristics of early onset breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008 ; 10 : R108.

45. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 336 : 1023-7.

46. Shi L, Dong B, Li Z, Lu Y, Ouyang T, Li J, *et al.* Expression of ERalpha36, a novel variant of estrogen receptor alpha, and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 3423-9.

47. Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan MC, Corbo L. Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 2005 ; 19 : 2671-84.

48. Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghou K, *et al.* Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 2008 ; 31 : 212-21.

49. Musgrove EA, Sergio CM, Anderson LR, Inman CK, McNeil CM, Alles MC, *et al.* Identification of downstream targets of estrogen and c-Myc in breast cancer cells. *Adv Exp Med Biol* 2008 ; 617 : 445-51.

50. Butt AJ, McNeil CM, Musgrove EA, Sutherland RL. Downstream targets of growth factor and estrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer* 2005 ; 12 (Suppl 1) : S47-59.

51. Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI, Brown M, *et al.* Regulation of ERBB2 by estrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature* 2008 ; 456 : 663-6.

52. Lahusen T, Henke RT, Kagan BL, Wellstein A, Riegel AT. The role and regulation of the nuclear receptor co-activator AIB1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009 ; 116 : 225-37.

53. Alkner S, Bendahl PO, Grabau D, Lovgren K, Stal O, Ryden L, *et al.* AIB1 is a predictive factor for tamoxifen response in premenopausal women. *Ann Oncol* 2010 ; 21 : 238-44.

54. Lopez-Tarruella S, Schiff R. The dynamics of estrogen receptor status in breast cancer: reshaping the paradigm. *Clin Cancer Res* 2007 ; 13 : 6921-5.

55. Bayliss J, Hilger A, Vishnu P, Diehl K, El-Ashry D. Reversal of the estrogen receptor negative phenotype in breast cancer and restoration of antiestrogen response. *Clin Cancer Res* 2007 ; 13 : 7029-36.

56. Sabnis G, Schayowitz A, Goloubeva O, Macedo L, Brodie A. Trastuzumab reverses letrozole resistance and amplifies the sensitivity of breast cancer cells to estrogen. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 1416-28.

57. Ellis MJ, Ma C. Letrozole in the neoadjuvant setting: the P024 trial. *Breast Cancer Res treat* 2007 ; 105 (Suppl 1) : 33-43.

58. Ellis MJ, Tao Y, Luo J, A'Hern R, Evans DB, Bhatnagar AS, *et al.* Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2008 ; 100 : 1380-8.

59. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, *et al.* Studies of the HER2/neu proto-oncogen in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989 ; 244 : 707-12.

60. Hudis CA. Trastuzumab :mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007 ; 357 : 39-51.

61. De Laurentiis M, Arpino G, Massarelli E, *et al.* A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005 ; 11 : 4741-8.

62. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, *et al.* Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003 ; 95 : 353-61.

63. Lal P, Tan LK, Chen B. Correlation of HER2 status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3.655 invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2005 ; 123 : 541-6.

64. Dowsett M. Overexpression of HER2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001 ; 8 : 191-5.

65. Dati C, Antoniotti S, Taverna D, Perroteau I, De Bortoli M. Inhibition of c-erbB-2 oncogene expression by estrogens in human breast cancer cells. *Oncogene* 1990 ; 5 : 1001-6.

66. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, *et al.* Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 1992 ; 24 : 85-95.

67. Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK, Kumar R. Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Lett* 2004 ; 567 : 243-7.

68. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, *et al.* Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995 ; 270 : 1491-4.

69. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 9817-24.

70. de Cremoux P, Rosenberg D, Goussard J, Bremont-Weil C, Tissier F, Tran-Perennou C, *et al.* Expression of progesterone and estradiol receptors in normal adrenal cortex, adrenocortical tumors, and primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Endocr Relat Cancer* 2008 ; 15 : 465-74.

71. Crowder RJ, Phommaly C, Tao Y, Hoog J, Luo J, Perou CM, *et al.* PIK3CA and PIK3CB inhibition produce synthetic lethality when combined with estrogen deprivation in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 3955-62.

72. Heck S, Rom J, Thewes V, Becker N, Blume B, Sinn HP, *et al.* Estrogen-related receptor alpha expression and function is associated with the transcriptional coregulator AIB1 in breast carcinoma. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 5186-93.

73. Deblois G, Hall JA, Perry MC, Laganiere J, Ghahremani M, Park M, *et al.* Genome-wide identification of direct target genes implicates estrogen-related receptor alpha as a determinant of breast cancer heterogeneity. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 6149-57.

74. Zhao JJ, Lin J, Yang H, Kong W, He L, Ma X, *et al.* MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 31079-86.

75. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Kerin MJ. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. *J Oncol* 2009 ; 950201.

76. Green MD, Francis PA, Gebski V, Harvey V, Karapetis C, Chan A, *et al.* Gefitinib treatment in hormone-resistant and hormone receptor-negative advanced breast cancer. *Ann Oncol* 2009 ; 20 : 1813-7.

77. Smith IE, Walsh G, Skene A, Llombart A, Mayordomo JI, Detre S, *et al.* A phase II placebo-controlled trial of neoadjuvant anastrozole alone or with gefitinib in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : 3816-22.

78. Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, Bapsy PP, Vaid A, Wardley A, *et al.* Trastuzumab plus anastrozole *versus* anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 5529-37.

79. Johnston S, Pippen Jr J, Pivot X, Lichinitser M, Sadeghi S, Dieras V, *et al.* Lapatinib combined with letrozole *versus* letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 5538-46.

80. Baselga J, Semiglazov V, van Dam P, Manikhas A, Bellet M, Mayordomo J, *et al.* Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 2630-7.

81. Remvikos Y, Mosseri V, Asselain B, Fourquet A, Durand JC, Pouillart P, *et al.* S-phase fractions of breast cancer predict overall and postrelapse survival. *Eur J Cancer* 1997 ; 33 : 581-6.

82. Chang J, Ormerod M, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Dowsett M, *et al.* Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2000 ; 89 : 2145-52.

83. Archer CD, Parton M, Smith IE, Ellis PA, Salter J, Ashley S, *et al.* Early changes in apoptosis and proliferation following primary chemotherapy for breast cancer. *Br J Cancer* 2003 ; 89 : 1035-41.

84. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, *et al.* Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008 ; 100 : 207-12.

85. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, *et al.* Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 5569-75.

86. Dowsett M. Introduction to sessions on "predicting personal risk for breast cancer". *Breast Cancer Res* 2008 ; 10 (Suppl 4) : S9.

87. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R, *et al.* Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007 ; 99 : 167-70.

88. Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, Daley FM, Noble S, Pittam M, *et al.* Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer* 2005 ; 92 : 147-55.

89. Anderson H, Bulun S, Smith I, Dowsett M. Predictors of response to aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007 ; 106 : 49-54.

90. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, *et al.* Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer sub-typing and prognosis signatures. *Breast Cancer Res* 2008 ; 10 : R65.

91. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al.* Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000 ; 406 : 747-52.

92. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 10869-74.

93. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 8418-23.

94. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 10393-8.

95. Lyng MB, Laenkholm AV, Vach W, Pallisgaard N, Knoop A, Ditzel HJ. Predictive gene expression profile in breast cancer patients treated by tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2007 ; 106 (Supplement 1) : 167.

96. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 2817-26.

97. Sparano JA, Paik S. Development of the 21 gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 721-8.

98. Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, *et al.* A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 2006 ; 8 : R25.

99. Esteva FJ, Sahin AA, Cristofanilli M, Coombes K, Lee SJ, Baker J, *et al.* Prognostic role of a multigene reverse transcriptase-PCR assay in patients with node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* 2005 ; 11 : 3315-9.

100. Sparano JA. TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx). *Clin Breast Cancer* 2006 ; 7 : 347-50.

101. Chanrion M, Negre V, Fontaine H, Salvetat N, Bibeau F, Mac Grogan G, *et al.* A gene expression signature that can predict the recurrence of tamoxifen-treated primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008 ; 14 : 1744-52.

102. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, *et al.* A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004 ; 5 : 607-16.

103. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 790-800.

104. Jordan VC, Collins MM, Rowsby L, Prestwich G. A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J Endocrinol* 1977 ; 75 : 305-16.

105. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, *et al*. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 2003 ; 95 : 1758-64.

106. Borges S, Desta Z, Li L, Skaar TC, Ward BA, Nguyen A, *et al*. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther* 2006 ; 80 : 61-74.

107. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007 ; 116 : 496-526.

108. Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, *et al*. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 9312-8.

109. Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, *et al*. The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2007 ; 101 : 113-21.

110. Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM, *et al*. Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : 5187-93.

111. Lim HS, Ju Lee H, Seok Lee K, Sook Lee E, Jang IJ, Ro J. Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : 3837-45.

112. Beverage JN, Sissung TM, Sion AM, Danesi R, Figg WD. CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *J Pharm Sci* 2007 ; 96 : 2224-31.

113. Nowell SA, Ahn J, Rae JM, Scheys JO, Trovato A, Sweeney C, *et al*. Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2005 ; 91 : 249-58.

114. Wegman P, Vainikka L, Stal O, Nordenskjold B, Skoog L, Rutqvist LE, *et al*. Genotype of metabolic enzymes and the benefit of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2005 ; 7 : R284-R290.

115. Cuzick J, Sestak I, Cella D, Fallowfield L. Treatment-emergent endocrine symptoms and the risk of breast cancer recurrence: a retrospective analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 2008 ; 9 : 1143-8.

116. Wang L, Ellsworth KA, Moon I, Pelleymounter LL, Eckloff BW, Martin YN, *et al*. Functional genetic polymorphisms in the aromatase gene CYP19 vary the response of breast cancer patients to neoadjuvant therapy with aromatase inhibitors. *Cancer Res* 2010 ; 70 : 319-28.

117. Colomer R, Monzo M, Tusquets I, Rifa J, Baena JM, Barnadas A, *et al*. A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008 ; 14 : 811-6.

118. Mackay A, Urruticoechea A, Dixon JM, Dexter T, Fenwick K, Ashworth A, *et al*. Molecular response to aromatase inhibitor treatment in primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007 ; 9 : R37.

119. Moore TW, Mayne CG, Katzellenbogen JA. Not Picking pockets: nuclear receptor alternate-site modulators (NRAMs). *Mol Endocrinol* 2010 ; 24 : 683-95 (Epub ahead of print).

4. VOIE PI3K/AKT/MTOR DANS LES CANCERS DU SEIN LUMINAUX

LA VOIE PI3K / AKT / MTOR

La voie PI3K/Akt/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire critique et impliquée dans de multiples processus physiologiques tels la prolifération, la croissance et la survie cellulaires, et le métabolisme notamment glucidique et énergétique[116] (figure 19).

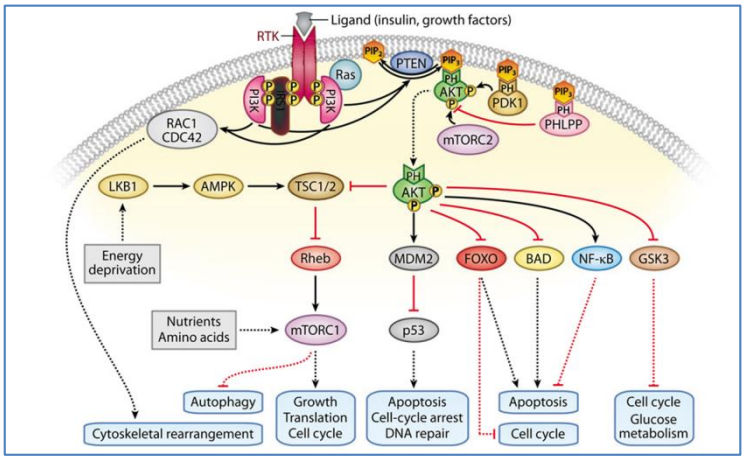


Figure 19. La voie PI3K/Akt/mTOR (D'après Réf 116)

Des altérations de cette voie sont impliquées dans de multiples processus pathologiques, dont des maladies héréditaires comprenant certains cancers[117] (figure 20). La mise en évidence du rôle potentiellement clé de la voie PI3K/mTOR dans le cancer est venu de l'observation de syndromes familiaux liés à des mutations de gènes suppresseurs codant pour des protéines régulatrices négatives (PTEN : syndrome de Cowden comportant des cancers du sein et de la thyroïde ; LKB1/STK11 : syndrome de Peutz Jeghers comportant des cancers colorectaux) (figure 20). Il a ensuite été montré que des mutations activatrices d'oncogènes de la voie (PIK3CA, Akt) se trouvaient parmi les mutations les plus fréquemment observées dans les cancers humains[116–118]. Le lien entre altération de la voie PI3K/mTOR et cancers du sein luminaux a été établi à partir de deux constats : la voie semble activée en situation d'hormonorésistance, et les mutations de PIK3CA sont les mutations les plus fréquemment retrouvés dans les cancers du sein luminaux[76].

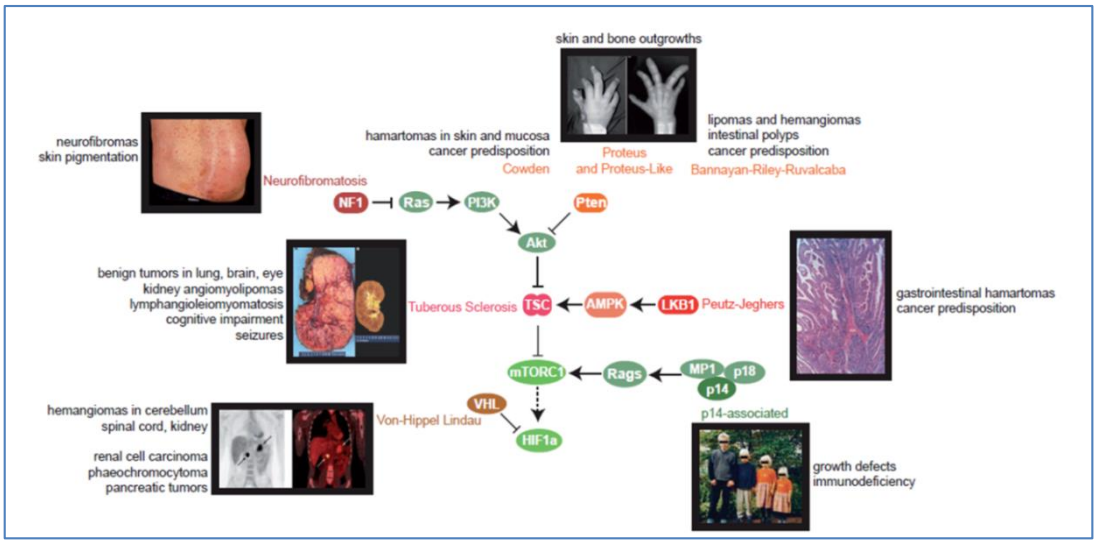


Figure 20. Voie PI3K/mTOR et maladies associées aux anomalies de la voie (D'après Réf 117)

L'activation pathologique de la voie peut être secondaire soit à la perte de fonction (mutation, perte allélique) des protéines inhibitrices (PTEN ; INPP4B ; TSC1/2 ; LKB1), soit à l'activation spontanée en général par mutations de protéines activatrices (PI3K ; Akt). L'activation de la sous unité catalytique de la PI3K (PIK3CA) soit par mutation[119, 120], soit physiologique sous l'action de facteurs de croissance éventuellement via des protéines adaptatrices telles IRS-1 ou directement par Ras, libère la sous-unité régulatrice PI3KR1 et convertit le PIP2 (phosphatydil-inositol-3,5-biphosphate) en forme triphosphate PIP3 qui induit la phosphorylation d'Akt sur la Thr308 via PDK1[120]. Akt est le senseur central de la voie qui oriente son effet selon le stimulus initial. Un des effets majeurs d'Akt est de bloquer la suppression de mTOR par le complexe de la protéine de la sclérose tubéreuse (TSC1/2). La protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) appartient à une famille de sérine/thréonine kinases identifiées par screening génétique de mutations de résistance à la rapamycine, antibiotique macrolide naturel, et est la sous-unité catalytique de deux complexes dénommés mTOR complex 1 (mTORC1) et mTORC2[118]. Les protéines accessoires clés sont respectivement RAPTOR (*regulatory associated protein*) et RICTOR (*rapamycin insensitive companion*) qui servent à stabiliser le complexe et permettent l'association aux autres protéines[117]. La rapamycine inhibe mTORC1, mais pas mTORC2, en se liant à FKBP12 qui dissocie spécifiquement RAPTOR de mTOR et S6, et bloque l'accès à ses substrats. Le complexe mTORC1 a deux substrats majeurs impliqués dans la traduction, 4E-BP1 (*factor 4E-binding protein 1*) et la kinase p70S6. La phosphorylation de 4E-BP1 le dissocie du complexe formé avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor* 4E) et libère la traduction. La kinase p70S6 a pour action principale de phosphoryler la riboprotéine S6 (RPS6) et de multiples facteurs eux aussi impliqués dans la traduction et l'élongation (figure 21). Le complexe mTORC2 agit en amont de la voie

(figure 19) et semble impliqué dans des processus tels le cycle cellulaire, l'anabolisme et la survie cellulaire[117].

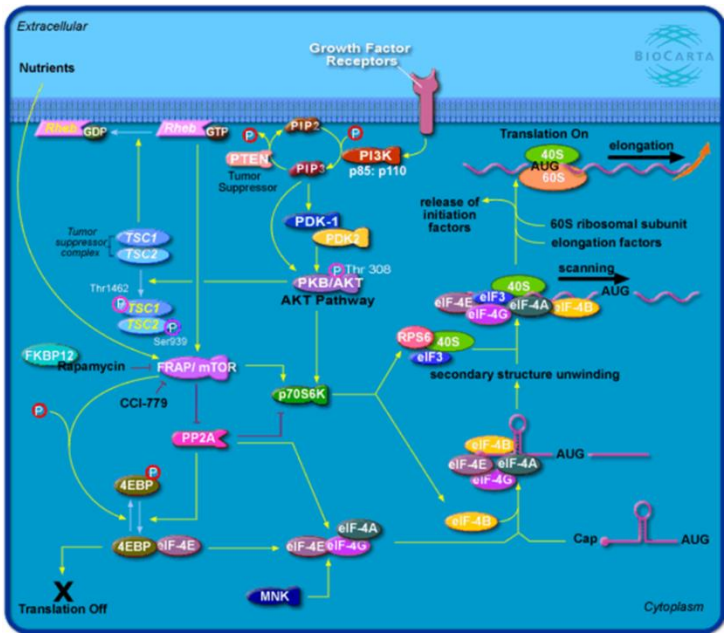


Figure 21. Actions de mTORC1 sur la traduction (d'après Biocarta®)

ACTIVATION DE LA VOIE PI3K / MTOR DANS LES CANCERS DU SEIN LUMINAUX

La transformation maligne est classiquement vue depuis Hanahan et Weinberg[121] comme la résultante d'altérations de la physiologie cellulaire (autosuffisance en facteurs de croissance, résistance à l'apoptose, potentiel réplicatif illimité, capacité d'invasion, métabolisme) et de l'environnement tumoral (réponse immune, inflammation, angiogenèse, métabolisme). L'activation aberrante de la voie PI3K/mTOR et en particulier de mTORC1 peut contribuer de manière majeure à la plupart de ces mécanismes. Son rôle dans la survie cellulaire y compris en cas d'exposition à une HT en fait un acteur potentiellement majeur de la résistance aux traitements. Le RE peut être impliqué dans les cross talks avec la voie PI3K de manière génomique et non génomique (figures 17-18).

De nombreux travaux menés essentiellement *in vitro* ont contribué à éclairer le lien entre voie PI3K et résistance aux traitements endocriniens du CS. Le principal modèle utilisé a été celui de lignées cellulaires et en particulier MCF-7 (lignée issue d'une pleurésie tumorale RE+), rendue résistante par

déprivation oestrogénique prolongée, soit un modèle assimilé à celui des inhibiteurs de l'aromatase chez la femme ménopausée[122]. Ces modèles ont permis de montrer que les voies MAPK et PI3K/Akt avaient la capacité de phosphoryler le RE de manière indépendante de l'œstradiol, induisant une transactivation ligand-indépendante[106, 123]. De plus, les cellules résistantes au tamoxifène expriment des niveaux élevés d'Akt sous sa forme phosphorylée évoquant une activation de la voie, ainsi qu'une relocalisation extranucléaire du RE. Ces modèles permettent aussi de montrer une association de ces caractéristiques à l'expression de HER2, dont l'inhibition permet de restaurer une localisation nucléaire avec baisse du niveau de phosphorylation d'Akt[122, 124]. Il a aussi été mis en évidence que des cellules MCF7 exprimant Akt de manière constitutive avaient la capacité *in vitro* et *in vivo* de proliférer en l'absence d'œstrogènes et résistaient au tamoxifène[125, 126]. Dans tous ces modèles, l'inhibition pharmacologique de la voie entraîne un effet antitumoral, cependant par des mécanismes non totalement élucidés.

MUTATIONS DE PIK3CA DANS LES CANCERS DU SEIN LUMINAUX

Les mutations de PIK3CA en particulier de l'exon 9 (E542 et E545 le plus souvent, domaine hélice) et de l'exon 20 (H1047, domaine catalytique) ont été rapportées il y a plus de 10 ans[119, 127]. Ces mutations sont considérées comme activatrices de l'activité catalytique et donc de la voie PI3K/Akt/mTOR. Les séries cliniques initiales ont confirmé l'existence de ces mutations de manière nettement plus fréquentes dans les tumeurs luminales (32-46%) que dans les autres sous-types de cancers du sein (HER2 : 22% ; basal : 8%)[128]. L'analyse en parallèle d'Akt1 (isoforme la plus fréquente) et de PTEN a montré des fréquences de mutation dans les cancers luminaux bien plus faibles, respectivement de 0-3% et 2-12%[128]. Les données les plus solides sont venues de l'analyse du TCGA[76] qui a généré les fréquences suivantes pour les gènes de la voie PI3K (table 6) :

	Luminal A N=225	Luminal B N=126	HER2 N=57	Basal N=93
PIK3CA	45%	29%	39%	9%
PIK3R1	0,4%	2%	4%	0
AKT1	4%	2%	2%	0
PTEN	4%	4%	2%	1%

Table 6 : Fréquence des mutations non silencieuses dans les cancers du sein primitifs, par sous-type. Données du TCGA 2012.

Ces résultats ont encore été confirmés par l'analyse issue d'études prospectives. Dans l'étude TEAM ayant évalué l'apport de l'exemestane (IA stéroïdien) à la phase adjuvante[129], une mutation PIK3CA est retrouvée chez 40.4% des patientes, et AKT1 chez 3.2%. La valeur relative des mutations du domaine hélice (liaison de la sous-unité régulatrice PIK3R1) et du domaine catalytique (domaine kinase) ont été étudiées. De manière intéressante, les deux principales lignées luminales utilisées contiennent chacune une mutation de PIK3CA (MCF7 dans le domaine hélice, et T47D dans le domaine kinase) tout en présentant chacune un phénotype luminal A[130]. La différence fonctionnelle entre ces mutations n'est pas totalement établie. Le caractère oncogénique de la mutation H1047R a été récemment confirmé en montrant sa capacité à activer un programme génétique précoce de multipotentialité vraisemblablement à l'origine de la future hétérogénéité intra tumorale[131, 132].

Sur le plan clinique, il semble que les mutations du domaine hélice sont plutôt présentes chez les patientes âgées et/ou dans les tumeurs de moins bon pronostic, alors que celles du domaine catalytique sont associées aux tumeurs sans envahissement ganglionnaire, et plus fréquemment de type lobulaire[130, 133, 134]. Les données issues de l'étude TEAM ont confirmé cette valeur pronostique favorable d'une mutation PIK3CA, mais avec une valeur inverse quant au type de mutation, les mutations du domaine hélice étant plus favorables[129]. Retenons que cette valeur pronostique s'effaçait en analyse multivariée, et qu'aucune valeur prédictive n'a pu être mise en évidence.

Partie II : résumé

- La résistance à l'hormonothérapie se définit selon des critères cliniques
- Les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie sont complexes et non univoques
- Le RE joue un rôle central
- Les « cross talks » entre voies du RE et autres voies de signalisation dont la voie PI3K/mTOR sont impliqués dans la résistance
- Les mutations de PIK3CA ont une valeur pronostique favorable
- Les modèles précliniques reposent essentiellement sur la lignée MCF7

III. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE DOCTORAT

Nous avons exposé dans les Parties I et II l'enjeu que représente l'étude des mécanismes de résistance à l'hormonothérapie dans les cancers du sein luminaux. Ces sont les cancers du sein les plus fréquents, et même si les traitements endocriniens induisent un bénéfice clinique majeur à tous les stades, les rechutes et progressions sous traitement sont fréquentes, voire quasi constantes à la phase avancée. Sur la base des données cliniques et anatomopathologiques conventionnelles, le seul critère solidement associé à la réponse à l'HT est l'expression du REα, les autres paramètres étant uniquement pronostiques. Nous avons vu aussi que le modèle néoadjuvant/préopératoire pouvait et devait servir d'outil d'évaluation prospective et rapide de nouveaux critères biologiques.

Parallèlement, et même s'ils ont permis des avancées théoriques majeures telles la description des cross talks et de la voie PI3K/mTOR, les modèles précliniques restent limités. La plupart sont des modèles cellulaires, éventuellement utilisés sous formes de xénogreffes murines, dérivées des lignées luminales de référence MCF7 et T47D[135]. Il nous est apparu important de pouvoir mettre en place des modèles tumoraux qui soient les plus récents et les plus proches possibles des tumeurs étudiées. Le Laboratoire d'Investigation Préclinique (LIP) du Département de Recherche Translationnelle a développé une technique originale de xénogreffes sur souris nude de tumeurs fraîches, dites PDX (*patient derived xenograft*), utilisée et validée dans de multiples modèles tumoraux, mais très rares dans les cancers du sein luminaux.

Les objectifs poursuivis étaient les suivants :

- Développer et valider des modèles de PDX de cancers du sein luminaux
- Développer et valider des modèles de PDX hormonorésistants
- Utiliser ces modèles pour contribuer à la description biologique de l'hormonorésistance
- Utiliser ces modèles pour évaluer la réponse *in vivo* et biologique à des inhibiteurs de la voie PI3K
- Identifier les futures voies de recherche

L'ensemble des travaux présentés ont été menés en étroite collaboration avec l'équipe du LIP et l'encadrement d'Elisabetta Marangoni (PhD).

IV. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DES PDX LUMINALES

1. LE LABORATOIRE D'ACCUEIL ET LES PDX

Le Laboratoire d'Investigation Préclinique du Département de Recherche Translationnelle de l'Institut Curie, fondé il y a plus de 15 ans par le Dr Marie-France Poupon et actuellement dirigé par le Dr Didier Decaudin, a été pionnier dans le développement et la diffusion de la technique des *patient-derived xenografts* (PDX). Cette technique s'est rapidement répandue dans les principaux laboratoires de recherche, en particulier depuis quelques années avec plus de 1000 articles publiés depuis 3 ans. Ces modèles sont utilisés de manière croissante dans l'évaluation préclinique des agents anti-cancéreux, et comme outils de modélisation biologique de la réponse et de la résistance aux traitements.

En complément des modèles très utilisés de xénogreffes développés à partir de lignées cellulaires et permettant d'explorer la résistance acquise à l'hormonothérapie[136], plusieurs groupes ont en effet contribué au développement des PDX depuis la publication princeps du LIP[137]. Il est immédiatement apparu que les cancers du sein luminaux étaient sous représentés avec un taux de prise de 4%, versus 37% pour les cancers RE négatifs. Des difficultés similaires ont été rencontrées par d'autres groupes pour la greffe de tumeurs primitives luminales, quelle que soit la souche de souris utilisée[138–140]. Les diverses approches développées par le laboratoire pour tenter d'améliorer ce taux de prise se sont révélées infructueuses (données non publiées). La prise de greffe semble plus facile à partir de fragments tumoraux métastatiques[139, 141], mais cette approche ne correspondait pas à notre objectif qui était de disposer de modèles les plus proches possible des tumeurs primitives, et non modifiés par des traitements préalables ni par d'éventuelles manipulations initiales (dissociation, humanisation stromale, matrigel, etc). Cette approche permet aussi de modéliser l'approche clinique néoadjuvante dont on a vu qu'elle était porteuse d'enseignements. Il est reconnu que ces modèles permettent de maintenir les caractéristiques biologiques des tumeurs d'origine, notamment l'architecture tumorale y compris l'organisation stromale, le profil génétique y compris mutationnel, ainsi que le profil d'expression, le potentiel métastatique et la réponse aux traitements[139, 140, 142–146].

Dans ce contexte, et compte tenu de la nécessité de développer de nouveaux modèles de CS luminal pour mieux explorer la résistance à l'hormonothérapie, nous avons poursuivi et amplifié le développement et la validation des modèles PDX de CS luminal.

2. MATERIELS ET METHODES

ETABLISSEMENT DES XENOGREFFES* NOTE2

Les fragments de tumeur fraîche ont été prélevés au décours immédiat de la procédure opératoire. Seules ont été greffées des tumeurs initiales, opérables, et n'ayant jamais été exposées à un traitement préalable. Des sections de 2 x 2 à 3 x 3 mm ont été greffées sous anesthésie générale (ketamine, 80 mg/kg and xylazine 10 mg/kg, par voie intrapéritonéale) et contrôle vétérinaire selon les recommandations ARRIVE (*ANIMAL RESEARCH: REPORTING IN VIVO EXPERIMENTS*)[147]. Les fragments tumoraux étaient glissés délicatement dans le coussinet graisseux interscapulaire de souris Swiss nude femelles (Charles River Laboratories, 69592, L'Arbresle Cedex, France; souche Crl:NU(Ico)-Foxn1nu) âgées de 8 à 12 semaines (environ 25 g). La peau était fermée par des agrafes. Les souris ont été élevées par cages (cage polycarbonate autoclavées, Tecniplast, Buguggiate, Italie) de 5-6 souris dans un environnement EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique, Directive Européenne 86/609/EEC) contrôlé pour la température (20-22°C) et la lumière (rythme jour/nuit de 12h). Elles étaient nourries de croquettes référencées (4RF25, Mucedola, Milan, Italy), et exposées à l'œstradiol dans l'eau de boisson (E2, Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France) à la concentration de 8 µg/mL jusqu'à confirmation de la prise de greffe, définie par la réalisation de 3 passages *in vivo* successifs (figure 22). Le suivi tumoral était réalisé une fois par semaine.

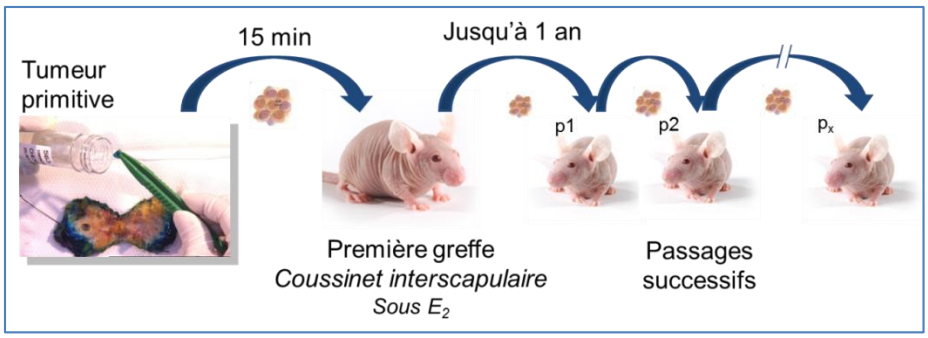


Figure 22. Etablissement des PDX

[2] Seront indiquées par un astérisque dans le titre des chapitres des différentes parties les expériences que j'ai menées ou supervisées personnellement. Par défaut, les travaux ont été menés en collaboration.

Le premier passage se faisait après une période dite de latence, pouvant durer 6 à 12 mois pour les tumeurs luminales. Une fois atteinte une taille d'environ 2 500 mm^3 (12-15 mm de grand axe), ou plus tôt selon des considérations éthiques (altération de l'état général, infection, ulcération tumorale), la souris était sacrifiée par dislocation cervicale, la tumeur retirée et fragmentée en sections de 2-3 mm (figure 23). Les sections étaient soit regreffées pour un passage n+1 (mêmes conditions de greffe que précédemment), soit fixées en formaline pour analyse anatomopathologique ultérieure, soit congelées immédiatement dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C. Les modèles obtenus ont été dénommées HBCx- (*Human Breast Cancer xenograft*) et numérotés de manière incrémentale.

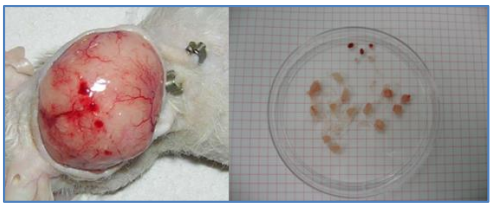


Figure 23. Tumeur au moment du sacrifice et fragments tumoraux avant réimplantation

VALIDATION ANATOMOPATHOLOGIQUE

La validation anatomopathologique était réalisée par analyse comparative et centralisée de la tumeur primitive donneuse et de la xénogreffe obtenue au passage 3. Une analyse conventionnelle était menée, associant :

- Description morphologique et architecturale par coloration à l'hématoxyline-éosine
- Evaluation de la prolifération (compte mitotique) et du stroma tumoral
- Etude immunohistochimique : RE, RP, HER2 (références et dilutions respectives : 6F11, Novocastra®, 1/50; 1A6, Novocastra®, 1/200; CB11, Novocastra®, 1/800).

VALIDATION BIOLOGIQUE

Ces premières séries d'analyses avaient pour objectif de vérifier la stabilité du profil génétique apprécié par CGHarray et de l'expression de gènes clés entre tumeur donneuse et PDX au passage 3. Les méthodes utilisées étaient identiques pour la tumeur initiale et les PDX.

Détection de REα, REβ, HER2 et Ki67 par transcription reverse et PCR quantitative *(*qRT-PCR*).*

La synthèse de l'ADNc était menée à partir de 1 µg d'ARN total avec la reverse transcriptase Superscript II dans un volume final de 20 µL L'analyse PCR quantitative était menée à partir de 6,25 ng d'ADN en duplicats indépendants pour les transcrits REα, REβ, HER2 et Ki67 (gènes cibles) de même que pour les transcrits *human acidic ribosomal phosphoprotein PO* (RPLPO) and *TATA box-binding protein* (TBP) comme gènes de référence pour la normalisation. Les séquences nucléotidiques et des sondes étaient celles utilisées dans les travaux initiaux[148], avec vérification du caractère spécifiquement humain (BLAST) et contrôle de l'absence de détection chez la souris. Le cycle thermique comprenait une dénaturation initiale à 95°C pendant 1 min, suivie de 45 cycles à 95°C x 15 sec et 65°C x 1 min. Les lignées humaines T47D (luminale) et MDA-MB231 (basale) avaient été utilisées pour générer 7 points standards pour chaque courbe (*calibrator*). La quantification des gènes cibles pour chaque tumeur (*sample*) était normalisée contre chacun des gènes de référence et calibrée avec le 2nd point de chaque courbe standard. Le résultat final était exprimé en ratio de différence d'expression du gène cible et des gènes de référence et de calibration, exprimé comme suit :

$$E_{\text{cible}}^{(\text{Ct calibrator} - \text{Ct sample})} / E_{\text{reference gene}}^{(\text{Ct calibrator} - \text{Ct sample})}$$

Où E dénote l'efficacité de la RT-PCR mesurée avec la pente de la courbe de calibration, et Ct le seuil du cycle (*cycle threshold*). Un seuil d'expression positive avait été défini préalablement par quantification protéique[149].

CGH par BAC array

La méthode a été rapportée par le laboratoire[137, 150]. L'ADN génomique tumoral des tumeurs donneuses et des xénogreffes à différents passages était hybridé sur des lames de verre portant des séquences de BAC clonées et cartographiées, à une résolution de 0,5 Mb sur tout le génome. Chaque clone était déposé sur lame en quadruplicate et étiqueté de manière aléatoire par coloration à la cyanine 3 ou 5. L'analyse d'image et l'assignation à un statut donné (perte, gain ou amplification, normal) ont été faites par des systèmes référencés[151, 152].

VALIDATION THERAPEUTIQUE*

Les xénogreffes considérées comme établies (au moins 3 passages successifs) et validées ont été soumises à divers tests thérapeutiques. L'objectif était d'évaluer un panel thérapeutique reproduisant les approches utilisées en clinique, de manière à caractériser ces tumeurs non préalablement exposées à une manipulation hormonale. Nous avons utilisé les traitements suivants :

- Anti estrogènes :
  - Tamoxifène, auquel nous avons ajouté le 4-OH tamoxifène de manière à court-circuiter le métabolisme hépatique supposé moins efficace chez la souris[153]. Le tamoxifène et le 4-OH tamoxifène étaient administrés par gavage à la dose respective de 4 et 5 mg/kg par semaine dans une solution glucosée.
  - Fulvestrant, par administration intramusculaire hebdomadaire à la dose de 50 mg/kg. (figure 24)

- Suppression de la synthèse des œstrogènes :
  - Castration chirurgicale, réalisée dans les conditions d'anesthésie exposées plus haut
  - Létrozole. Administration orale 5 jours /7, à la dose de 5 mg/kg/j.
  - Combinaison des deux méthodes

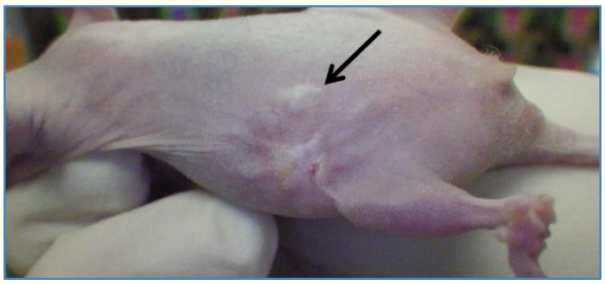


Figure 24. Point d'injection du fulvestrant dans la cuisse (flèche).

Des groupes de 8-12 souris étaient constitués par tirage au sort, et à chaque expérience était ajouté un groupe contrôle sans traitement. Dans certaines expériences était ajouté un groupe contrôle positif par poursuite de la supplémentation en E2 dans l'eau de boisson, alors qu'en règle générale l'œstradiol était supprimé, de manière similaire à ce qui est réalisé en situation clinique humaine où tout apport oestrogénique exogène est supprimé dès le diagnostic.

Le suivi de la croissance tumorale sous traitement était réalisé par évaluation hebdomadaire de la taille tumorale par mesure bidimensionnelle à l'aide d'un pied à coulisse (figure 25).

Figure 25 : Tumeur dans le coussinet interscapulaire (flèche) et mesure au pied à coulisse.

Les mesures étaient consignées manuellement puis reportées dans une table automatisant les calculs de volume tumoral, volume tumoral relatif et inhibition de la croissance tumorale. Le volume tumoral relatif (RTV, *relative tumor volume*) était obtenu par les formules suivantes :

$$\mathbf{V_0} \text{ (volume tumoral initial) } \mathbf{= a \times b^2/2}$$

Où a = grand diamètre ; b = petit diamètre, au moment du début des traitements.

$$\mathbf{RTV_t = V_t / V_0}$$

Où V_t indique le volume au temps t.

Une fois atteinte une taille tumorale d'environ 2 500 mm^3 (12-15 mm de grand axe) ou plus tôt selon des considérations éthiques, la souris était sacrifiée, la tumeur retirée et fragmentée, puis soit regreffée, soit conservée pour analyses anatomopathologiques et biologiques.

STATISTIQUES*

Les variables catégorielles ont été traitées par le test du Chi-deux, ou le test exact de Fisher pour les petits effectifs. Une corrélation de Pearson a été calculée pour chaque comparaison appariée des profils CGH. Pour les expériences thérapeutiques, la significativité statistique des variations du RTV a été évaluée par le test de Student, en comparant les RTV des groupes traités à ceux du (des) groupes(s) contrôle(s). Le calcul du nombre de souris nécessaires par groupe de traitement a été effectué en faisant l'hypothèse d'un taux de mortalité de 10% et en fonction de l'expérience du laboratoire[137, 150]. Une analyse multivariée par régression logistique a été menée pour la modélisation des variables binomiales. L'ensemble des calculs a été mené sur le logiciel XLSTAT®.

3. RESULTATS

Nous résumons ici les points clés de l'article 2.

PRISE DE GREFFE

Nous avons rapporté nos résultats initiaux sur 423 prélèvements frais, dont 352 tumeurs primitives non prétraitées, et parmi lesquelles 254 tumeurs luminales RE+ (voir article 2). Ces résultats viennent compléter et enrichir les résultats préliminaires qui avaient été rapportés[137], et les analyses ont mis l'accent sur les cancers luminaux.

Le premier niveau d'analyse mené sur l'ensemble de la population considérée (greffes anciennes + greffes récentes depuis mon arrivée au laboratoire en 2009) a évalué les facteurs associés au succès de la prise de greffe. **Seuls deux facteurs considérés comme indépendants ont été retenus : un haut grade histopronostique de la tumeur donneuse, et l'absence d'expression du RE, avec des odds ratio respectifs de 10,04 (p=0,052), et 7,14 (p=0,001).** Dans cette série, le taux de prise des tumeurs luminales est de 2,5%, soit 8 xénogreffes obtenues au moment de la publication de l'article. Les caractéristiques des 8 tumeurs initiales ayant conduit à une PDX sont indiquées dans la table 7.

Patiente	Age	Type Histologique	T (mm)	pN	RE*	RP	HER2	Grade	HT	suivi
1	59	CCI	25	4/13	15	0	0	3	Tamoxifène	Rechute locale (7 m) M+ os (9 ans)
2	45	CCIS + carcinome mucineux	28	NA	15	15	0	NA	-	RC (48 m)
3	46	CCI	25	5/9	80	80	0	3	Tamoxifène	RC (45 m)
4	70	CCI	23	1/18	90	80	0	2	Létrozole	RC (47 m)
5	50	CCI	17	6/14	98	50	95[§]	2	Létrozole	RC (50 m)

Patiente	Age	Type Histologique	T (mm)	pN	RE*	RP	HER2	Grade	HT	suivi
6	37	CCI	14	0/3	30	10	0	3	Goséréline	RC (42 m)
7	53	CCI	28	3/8	100	15	100§	3	Létrozole	RC (44 m)
8	61	Micropapillaire	7	7/13	20	25	0	3	Létrozole	M+ os, poumon (14 m)

Table 7. Caractéristiques des tumeurs ayant permis de générer les 8 premières xénogreffes RE+. CCI : carcinome canalaire infiltrant. m : mois. CCIS : carcinome canalaire in situ. *RE en pourcentage de cellules infiltrantes marquées. § 2 tumeurs RE+ mais aussi HER2+ (non maintenues). pN : statut ganglionnaire initial. M+ : métastase. RC : rémission complète.

Depuis la publication de ces résultats, l'équipe du LIP a au total greffé plus de 1000 tumeurs primitives, et l'analyse des facteurs associés à la prise de greffe est en cours d'actualisation par une doctorante de l'Institut (Anne-Sophie Hamy-Petit, direction F. Reyal et E. Marangoni).

STABILITE TUMORALE

Anatomie pathologique

Le phénotype architectural et immunohistochimique a été analysé par paire tumeur donneuse/PDX. La stabilité phénotypique entre tumeur donneuse et PDX a été observée sur les deux plans. La figure 26 montre trois exemples soulignant cette stabilité, à partir de tumeurs d'architecture très différente. La PDX HBCx-3 se caractérise par une importante composante stromale qui est parfaitement reproduite, de même que la composante mucineuse de HBCx-21 ou l'aspect trabéculaire de HBCx-34 (flèches).

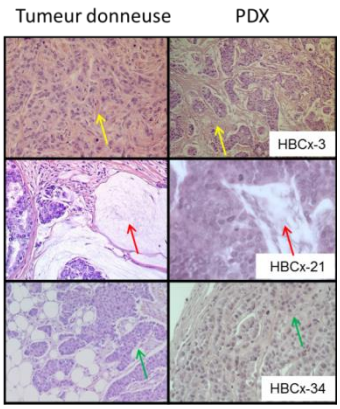


Figure 26. Stabilité architecturale des PDX

Cette stabilité a également été observée dans les PDX non luminales. L'étude immunohistochimique est venue conforter ces résultats en montrant la conservation de l'expression des récepteurs hormonaux entre tumeur donneuse et PDX (figure 27). L'impression visuelle d'une augmentation du pourcentage de l'expression du RP, en général plus faiblement exprimé, s'explique avant tout par une augmentation de la cellularité tumorale dans les xénogreffes. On observera à nouveau dans cet exemple la conservation de l'architecture tumorale tissulaire. La stabilité de l'expression des biomarqueurs a été confirmée en RT-PCR dans l'ensemble des PDX analysées. La figure 27 montre un exemple de conservation de RE et RP en immunohistochimie et qRT-PCR à différents passages.

	Tumeur donneuse	PDX	Tumeur donneuse	PDX p2	PDX p5
RE			2779 + +	2902 + +	5004 + + +
RP			75 ++	743 +++	853 +++

Figure 27. Maintien de l'expression de RE et RP en IHC et en qRT-PCR à différents passages.

Profilage génomique

Les analyses génomiques menées sur les premières PDX ont permis de comparer les profils obtenus en CGH sur BAC array, et ont secondairement été complétées par une analyse transcriptomique comparative sur puces Affymetrix HGU133 Plus 2.0[154]. Les profils présentés dans la figure 28 à titre d'exemple correspondent à ceux de la PDX de la figure 27 (HBCx-22). Brièvement, il est observé à partir de l'analyse de 18 paires dont 5 tumeurs luminales que le profil génétique d'origine est généralement maintenu dans les PDX, quel que soit le sous type moléculaire. Par ailleurs et à titre d'exemple, le profil génomique de HBCx-3 a confirmé son type luminal B[154]. L'appartenance au sous-type luminal B a été confirmée pour l'ensemble des PDX luminales obtenues par le test PAM50. Bien que les corrélations soient peu aisées compte tenu de l'hétérogénéité des cancers du sein, les coefficients calculés étaient au-dessus de 0.5 pour 16 paires sur les 18 analysées. La majorité des tumeurs présentaient une distribution concordante des pertes et gains chromosomiques, ainsi que des régions amplifiées. Il

existe toutefois une tendance à l'enrichissement de réarrangements génomiques dans les PDX par rapport aux tumeurs donneuses. Le clustering hiérarchique confirme cette tendance en montrant une plus grande proximité entre passages successifs des PDX qu'entre PDX et tumeur primitive. Ceci est encore confirmé par la comparaison des profils d'expression génique où les variations d'expression sont essentiellement observées entre tumeur primitive et PDX, plus qu'entre les passages des PDX.

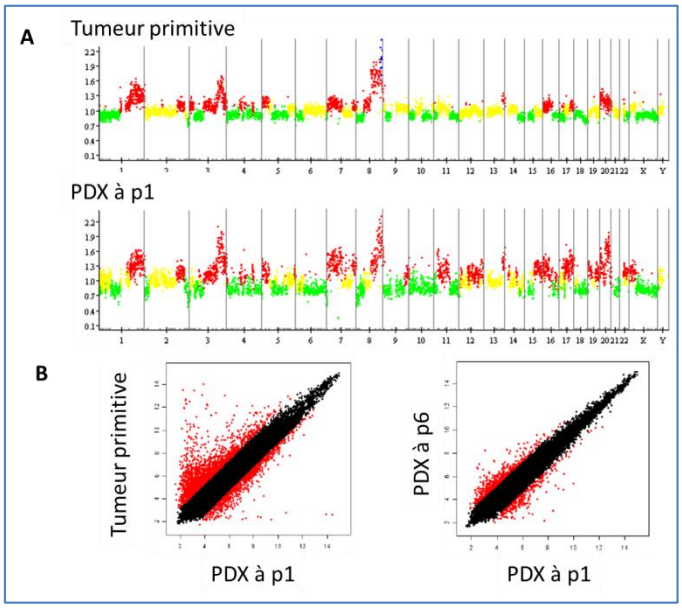


Figure 28. Analyse comparée des profils génomiques d'une tumeur donneuse et de la PDX HBCx-22. **A**. profil CGH obtenu par BAC array. Rouge : gain ; jaune : normal ; vert : perte (Pearson : r=0.74). **B**. profil d'expression obtenu par Affymetrix HGU133 plus 2.0. Les *probes sets* en noir ne sont pas différentiellement exprimés et suivent un modèle linéaire. Les points rouges représentent les valeurs résiduelles extrêmes (sur- ou sous-exprimées).

PROFILAGE THERAPEUTIQUE

L'objectif du profilage thérapeutique, une fois la validation biologique acquise par la démonstration de la stabilité morphologique, architecturale, immunophénotypique et génomique, était d'évaluer le maintien de la dépendance oestrogénique pour la croissance tumorale des PDX, ainsi que leur profil de sensibilité aux diverses modalités de traitement endocrinien. Une fois la prise tumorale assurée, l'œstradiol était retiré de l'eau de boisson de manière à (i) se rapprocher de la situation clinique où tout apport d'œstrogènes exogènes est supprimé dès le diagnostic de cancer fait (« prise de greffe ») et (ii) contrôler l'apport d'E2 dans les groupes de contrôle positif. Nous avons initialement défini 4 modalités thérapeutiques correspondant aux situations cliniques : deux par antagonistes du RE : tamoxifène et fulvestrant, deux par déprivation oestrogénique : castration et association castration-létrozole. Les expériences initiales ont été menées sur les 4 PDX luminales les plus stables (HBCx-3, 21, 22, 34). Ces modalités ont ensuite été étendues à diverses combinaisons.

De manière synthétique, les conclusions de l'ensemble de ces expériences sont les suivantes :

1. Toutes ces PDX restent dépendantes de l'œstradiol pour assurer une croissance rapide (figure 29).

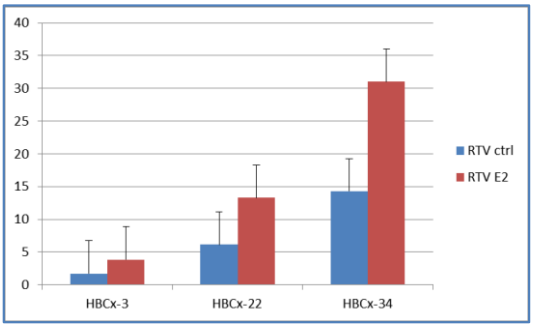
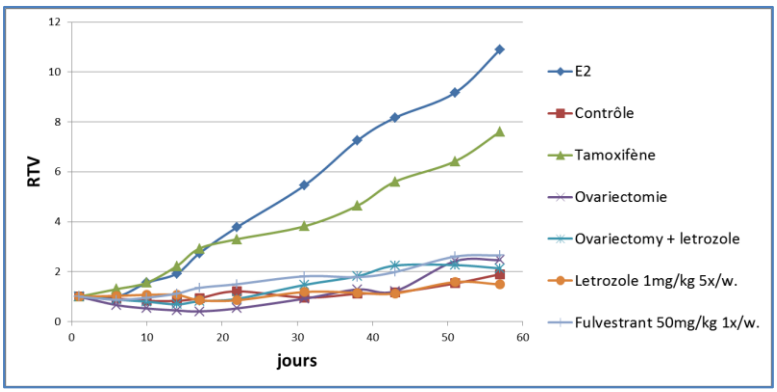


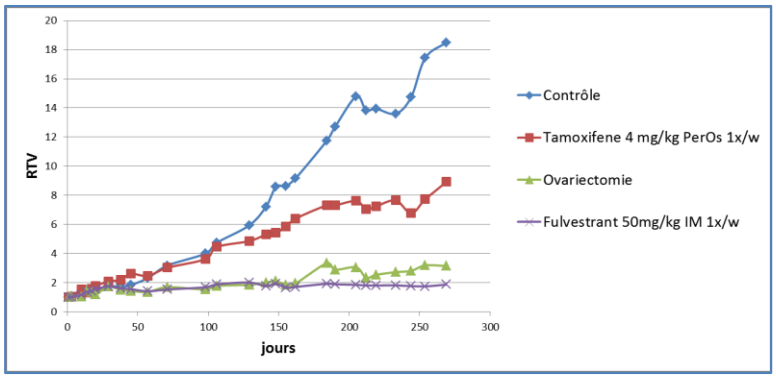
Figure 29. RTV comparés dans le bras contrôle (sans E2 dans l'eau de boisson) et le bras contrôle positif (apport contrôlé d'E2 oral). Exemple des PDX HBCx-3, HBCx-22 et HBCx-34.

2. Le profil d'hormonosensibilité est variable d'une PDX à l'autre et selon les traitements évalués.

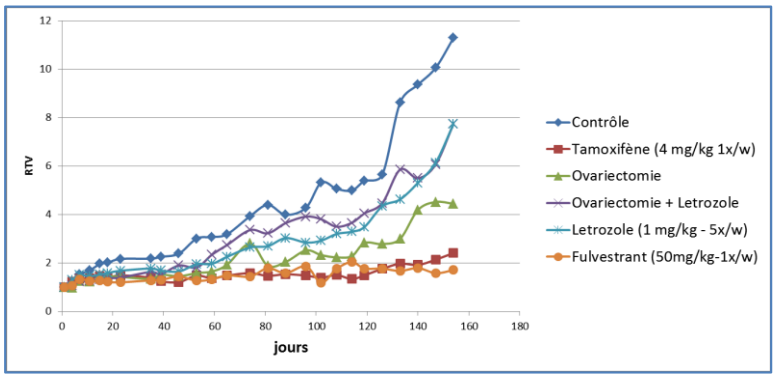
A titre d'exemple, la PDX HBCx-3 apparaît très peu sensible au tamoxifène avec même un probable effet agoniste, la courbe « tamoxifène » montrant une croissance tumorale plus rapide que le contrôle négatif dans plusieurs expériences, et une faible sensibilité aux autres modalités d'hormonothérapie (figure 30 A). Il convient de noter que cette PDX correspond à la seule situation clinique de rechute précoce sous HT, tout en gardant un profil clinique lentement évolutif. A l'opposé, la PDX HBCx-34 présente un profil globalement hormonosensible, et une sensibilité majeure au fulvestrant (figure 30 D). Les résultats les plus significatifs sont montrés. Les courbes obtenues avec le 4-OH tamoxifène sont superposables à celles du tamoxifène et ne sont pas montrées. Les courbes du bras E2 (contrôle positif) ne sont pas toutes montrées pour des raisons d'échelle.



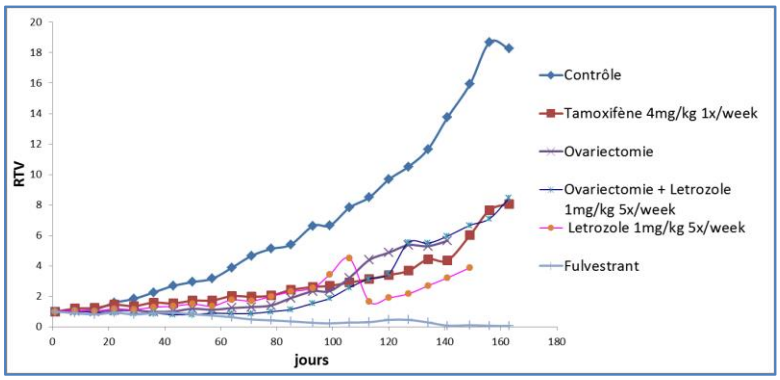
A. HBCx-3



B. HBCx-21



C. HBCx-22



D. HBCx-34

Figure 30. Profil d'hormonosensibilité de 4 PDX luminales. Il est mis en évidence un profil individuel et spécifique de chaque PDX.

Les courbes de croissance montrées sont obtenues en calculant à chaque point les moyennes des RTV de chaque groupe de souris (8 à 10 souris par groupe). Les intervalles de confiance ne sont pas montrés pour des raisons de lisibilité. A titre d'exemple, les différences de croissance des courbes thérapeutiques de la figure HBCx-34 sont toutes statistiquement significatives par rapport au contrôle (Student), avec des valeurs de respectives de 0,01 ; < 0,001 ; < 0,001 ; 0,01 et < 0,001 pour les différents traitements (dans l'ordre de la figure). De manière à explorer l'hétérogénéité intratumorale, potentiellement représentée par la fragmentation tumorale réalisée à chaque passage (figure 23),

nous avons analysé les courbes de croissance individuelles au sein de chaque groupe, et trois situations ont pu être observées (figure 30bis) :

- Absence de réponse au traitement et croissance rapide : « sous-clone » réfractaire
- Echappement lent et progressif, faisant évoquer une résistance acquise ou secondaire
- Poursuite de la réponse à long terme

La très faible voire la quasi absence de volume tumoral résiduel dans les situations de réponse de long terme n'a malheureusement pas permis de réaliser des analyses comparatives de ces tumeurs dérivées.

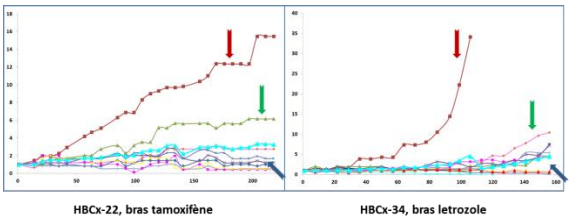


Figure 30bis. Exemples de courbes individuelles. Les courbes ▲ indiquent les valeurs moyennes. Flèche **rouge** : tumeur réfractaire ; flèche **verte** : résistance secondaire ; flèche **bleue** : réponse soutenue.

Partie IV : résumé

- Il est possible mais difficile de développer des PDX de cancer du sein luminal à partir des tumeurs primitives.
- Les PDX présentent une grande stabilité phénotypique et génomique, par rapport à la tumeur initiale et lors des passages successifs.
- Les PDX obtenues présentent divers profils de sensibilité aux traitements endocriniens.
- Il existe de probable sous-clones capables de développer une résistance plus ou moins précoce.

ARTICLE 2

P. Cottu, E. Marangoni, F. Assayag, *et al*.

Modeling of response to endocrine therapy in a panel of human luminal breast cancer xenografts

Breast Cancer Res Treat, 2012; 133(2):595-606

Breast Cancer Res Treat (2012) 133:595–606
DOI 10.1007/s10549-011-1815-5

PRECLINICAL STUDY

Modeling of response to endocrine therapy in a panel of human luminal breast cancer xenografts

P. Cottu · E. Marangoni · F. Assayag · P. de Cremoux · A. Vincent-Salomon · Ch. Guyader · L. de Plater · C. Elbaz · N. Karboul · J. J. Fontaine · S. Chateau-Joubert · P. Boudou-Rouquette · S. Alran · V. Dangles-Marie · D. Gentien · M.-F. Poupon · D. Decaudin

Received: 17 July 2011 / Accepted: 30 September 2011 / Published online: 16 October 2011
© Springer Science+Business Media, LLC. 2011

Abstract Resistance to endocrine therapy is a major complication of luminal breast cancer and studies of the biological features of hormonal resistance are limited by the lack of adequate preclinical models. The aim of this study is to establish and characterize a panel of primary human luminal breast carcinoma xenografts, and to evaluate their response to endocrine therapies. Four hundred and twenty-three tumor fragments obtained directly from patients have been grafted in the interscapular fatpad of Swiss nude mice. After stable engraftment with estradiol supplementation, xenografted tumors have been validated by conventional pathology and immunohistochemistry examination, and additional molecular studies. In vivo tumor growth and response to different endocrine treatments were evaluated. We have engrafted 423 tumors including 314 ER+ tumors, and 8 new luminal breast cancer xenografts have been obtained (2.5%). Tumor take was much lower for luminal tumors than for non-luminal tumors (2.5 vs. 24.7%, $P < 0.0001$), and was associated with two independent criteria, i.e., ER status ($P < 0.0001$) and a high grade tumor ($P = 0.05$). Histological and immunohistochemical analyses performed on patient's tumors and xenografts showed striking similarities in the tumor morphology as well as in the expression level of ER, PR, and HER2. Response to hormone therapy, evaluated in 6 luminal models, showed different sensitivities, thus exhibiting heterogeneity similar to what is observed in the clinic. We have established a panel of primary human luminal breast cancer xenografts, recapitulating the biological and clinical behaviors of patient tumors, and therefore suitable for further preclinical experiments.

Keywords Luminal breast cancer xenografts · Genomic characterization · Endocrine therapy modeling

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10549-011-1815-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Cottu (✉) · P. Boudou-Rouquette · D. Decaudin (✉)
Department of Medical Oncology, Institut Curie,
26 Rue d'Ulm, 75005 Paris, France
e-mail: paul.cottu@curie.net

D. Decaudin
e-mail: didier.decaudin@curie.net

P. Cottu · E. Marangoni · F. Assayag · Ch. Guyader · L. de Plater · C. Elbaz · N. Karboul · V. Dangles-Marie · M.-F. Poupon · D. Decaudin
Laboratory of Preclinical Investigations, Institut Curie Translational Research Department, Hôpital St Louis, Quadrilatère historique, Porte 13, 1, Ave Claude Vellefaux, 75010 Paris, France

P. de Cremoux · A. Vincent-Salomon
Department of Pathology and Tumor Biology, Institut Curie, 26 Rue d'Ulm, 75005 Paris, France

J. J. Fontaine · S. Chateau-Joubert
Pathology Department, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7, Ave du General de Gaulle, 94704 Maisons Alfort, France

S. Alran
Department of Surgical Oncology, Institut Curie, 26 Rue d'Ulm, 75005 Paris, France

D. Gentien
Molecular Biology Facilities, Institut Curie Translational Research Department, Hôpital St Louis, 1, Ave Claude Vellefaux, 75010 Paris, France

Introduction

Breast cancer (BC) is the most frequent cancer in women, and the first or second cause of cancer-related death in women in developed countries [1]. About 70% breast carcinomas express significant levels of the estrogen receptor (ER), which is closely associated with the clinical benefit of hormonal therapies (HT) [2]. However, many women, if not all, develop resistance to HT (called later on hormonal resistance or HR), as evidenced in long-term survival data from tamoxifen meta-analyses [3] or for example from the ATAC trial [4]. A huge research effort has over the years deciphered key biological mechanisms of HR [5]. Unfortunately, results obtained in biology-based clinical studies showed only very small and short-term clinical benefits [6–8], underlining the need for more in-depth molecular understanding of HR and adequately predictive preclinical investigations [9, 10].

Preclinical models of cancer have become an essential tool to enhance our understanding of cancer biology, and to develop and test the efficacy of new antineoplastic agents and combinations. These models however encounter limitations which might explain the poor clinical predictability. Indeed, most xenografts are obtained from a very limited number of tumor cell lines that may have been previously maintained in vitro for a long time before experimental use, some of them being genetically modified [11]. The molecular features of these engrafted cells may therefore widely differ from the original tumor, as well as the micro- and macroenvironment of such tumors, thus compromising the clinical relevance of preclinical conclusions. The molecular differences between cell lines and primary tumors have been widely described, cell lines harboring more frequent genome copy number abnormalities [12]. It has also been argued that cell lines as systems in three-dimensional and heterotypic cultures more precisely mimic the in vivo environment, stressing the need for such global approaches. Therefore, xenografts of cell lines and breast cancer fresh tumors have been developed, aiming at allowing for the examination of human breast cancer cells in the context of the in vivo environment [11].

In order to reconcile the need for relevant preclinical tools and their potential discrepancies with original human tumors, our group has implemented a panel of xenografts derived from fresh patient tumors, including breast, prostate, lung and colon cancer, uveal melanoma, and others. We have previously reported our preliminary data in breast cancer, showing that they maintained the biological characteristics of their respective patient's counterpart and that all known subtypes of human BC could be obtained [13, 14]. However, as previously shown, the in vivo tumor take of human BC samples was low and the majority of models that have been obtained were of basal-like subtype. In this report, we focus on xenografts derived from luminal breast carcinomas (i.e., breast carcinoma expressing the estrogen receptor, deemed ER+). We have established a panel of human luminal BC xenografts, representing with a striking architectural and biological stability the variety of human luminal breast carcinomas. These xenografts have also been characterized for their sensitivity to hormonal therapies commonly used in the clinic: estrogen receptor modulators such as tamoxifen and fulvestrant, as well as suppression of estrogen synthesis by either letrozole or ovariectomy. We have also used combined therapies and 4-OH tamoxifen, a more potent metabolite of tamoxifen. We show here that these models reproduce the heterogeneity of response commonly observed in the clinical setting. We therefore postulate that these primary human BC xenografted models offer one of the most faithful in vivo modelling of luminal breast carcinomas, and that these models constitute relevant and useful tools for preclinical assessment.

Materials and methods

In vivo establishment of the primary human luminal breast cancer xenografts (Fig. 1)

The vast majority of tumor specimens were obtained from patients with early stage, operable breast cancer at the time of surgery, as previously described [14]. All patients had given their informed consent, and procedures were approved by our internal review board. Briefly, fresh tumor fragments measuring 2 × 2 to 3 × 3 mm were grafted immediately after removal in the interscapular fatpad of 8–12-week-old female Swiss nude mice under general anesthesia and veterinary control (refer to Supplementary material 1 for detailed protocols). Mice were maintained in a specific pathogen-free animal housing (Institut Curie) and received estradiol (E2, Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France) diluted in drinking water (8 μg/ml) until engraftment was confirmed. After a latency period lasting from several weeks to several months, tumors appeared at the engraftment site. Once the tumor had reached a critical size of about 2,500 mm^3, mice were killed, and then the tumor was removed and cut into 2–3-mm pieces. Fragments were snap-frozen in liquid nitrogen for further biological analyses, fixed for histopathological analyses, and re-engrafted in nude mice fed with E2-containing water for sequential passages. Similar material was banked at each passage. A xenograft was deemed as established when it has been passed through three consecutive in vivo passages.

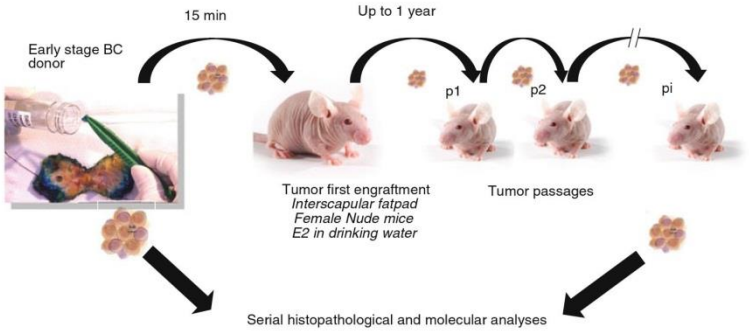


Fig. 1 Engraftment protocol. *BC* breast carcinoma, *E2* estradiol, p_i passage i

Histopathological validation studies

The pathological examination of the patient tumor and the third passage of the corresponding xenograft (necessary for validation) was performed on Hematoxylin and Eosin and Safran (HES)-stained slides (AVS), as well as for further passages xenograft samples (SCJ). Elston and Ellis pathologic grading was used. The mitotic index was evaluated per 10 high-power fields (size mm^2). Pathologic tumor size, peritumoral vascular invasion, presence of lobular or ductal carcinoma in situ (percentage of whole tumor and grading), perineural involvement, and axillary lymph node involvement were assessed. Immunostainings were performed on 4-μm tissue sections prepared from a representative sample of the tumor as previously reported [15]. After rehydration and antigenic retrieval in citrate buffer (10 mM, pH 6.1), tissue sections were stained for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and HER2. Staining was revealed with the Vectastain Elite ABC peroxidase mouse IgG kit (Vector Burlingame, CA, USA) using diaminobenzidine (Dako A/S, Glostrup, Denmark) as chromogen. Positive nuclear staining for ER and PR was recorded according to standardized guidelines [16]. For HER2, only membranous staining was interpreted, as previously defined [17]. Clone, source, and dilution of primary antibodies used for immunohistochemical analysis were for ER, PR, and HER2, respectively, 6F11, Novocastra, 1/50; 1A6, Novocastra, 1/200; CB11, Novocastra, 1/800.

Molecular validation

qPCR analyses and BAC array CGH analyses methods have been previously reported. Refer to Supplementary material 2 for details and references.

In vivo tumor growth and response to endocrine therapies

A series of tumor xenografts was grafted into nude mice which received E2 in drinking water. When engrafted tumors reached a volume of 65–200 mm^3, mice were individually randomized in groups of 8–12 to different treatment groups. Treatments (tamoxifen, fulvestrant, letrozole, ovariectomy, and combined therapies) were chosen according to present standard of care in early and advanced breast cancer [18]. We added 4-OH tamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, to by-pass the hepatic transformation of tamoxifen which may be less efficient with mice cytochromes [19]. The reference treatment experiment for luminal xenografts comprised at least four groups: a control group, without E2 in drinking water to document the spontaneous tumor progression; a tamoxifen-treated group; a fulvestrant-treated group; and a fourth group where all mice underwent bilateral ovariectomy under general anesthesia with the same protocol as for tumor engraftment (see Supplementary material 1 for details). Tamoxifen (tamoxifen, Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France) was diluted at 0.5 mg/ml in a 5% glucose solution and administered orally at a dose of 4 mg/kg once a week. Fulvestrant (Faslodex®, AstraZeneca, Macclesfield, UK) was administered by intramuscular injection with a $27^{3/4}$ gauge needle at a dose of 50 mg/kg once a week. In some experiments, four treatment groups were added: continuation of E2 supplementation at 8 μg/ml in the drinking water; 4-OH tamoxifen at a dose of 5 mg/kg *per os* once a week (same dilution as tamoxifen); letrozole at an oral dose of 5 mg/kg/day, 5 days per week (dilution 0.05 mg/ml in a 5% glucose solution); and the ovariectomy–letrozole combination.

Tumor growth was evaluated weekly by measurement of two perpendicular diameters of tumors with a calliper. Tumor volume, relative tumor volume, and tumor growth inhibition were recorded as previously reported [14]. Mice were ethically killed when the tumor volume reached 2,500 mm^3 or ulcerated the skin, or according to the mice welfare under veterinarian supervision.

Statistical analyses

Categorical variables were analyzed by Chi-square test and Fisher's exact test when necessary. A Pearson correlation was computed for each pair-wise comparisons of BAC array CGH profiles. For therapeutic experiments, statistical significance of RTV was calculated by the paired Student's *t* test by comparing the individual RTVs in the treated and control groups. Assuming a non-tumor-related 1/10 death rate in the treatment groups, and based on our previous works [13, 14], we chose groups of 8–12 mice for each treatment arm. Logistic regression analyses were used for binary outcome variables modelization.

Results

Characteristics of donor patients and tumor take in immunodeficient nude mice

We obtained 423 human breast cancer samples from 410 patients, which were engrafted immediately after surgery. Transplanted animals were kept up to 1 year (cut-off date was chosen to allow at least 1 year of clinical and pre-clinical follow-up). The clinical characteristics of the patients and of the tumors are presented in Table 1, according to ER status of the donor tumor, as defined by IHC. The median age of the whole population was 58 years (range 27–93). Tumor samples were originated from primary breast tumors in 369 cases (87.2%), including 4 local relapses, and from metastatic tissue in 54 cases (12.8%), including 33 axillary lymph nodes invaded by the primary tumor, and 21 miscellaneous metastatic deposits (omentum, ovary, skin, liver). Basic characteristics of primary tumors were representative of current diagnostic features. As expected for ER+ tumors, there was a significant overrepresentation of lobular carcinomas, as well as low grade, low proliferating, and PR+ tumors. Vascular emboli and lymph node involvement did not differ between ER+ and ER− tumors. Most patients (352 out of 406 with annotation, 86.7%) did not receive any treatment before surgery, while 54 (13.3%) were treated with chemotherapy, endocrine treatment, or radiotherapy.

After 1 year of follow-up of the engrafted tumors, tumor take was 2.5% in ER+ tumors, i.e., 8 tumors (all derived from primary patient breast tumor, not from metastases), and 24.7% in ER− tumors ($P < 0.0001$). Clinical characteristics of these 8 patients are shown in Supplementary Table 1. More specifically, 22 among the 61 triple negative tumors presented a stable tumor take (36.1%) in contrast to non-triple negative tumors (4.1%, $P < 0.0001$). After univariate analysis (data not shown), a logistic regression including dichotomized variables (tumor size inferior to or superior to 2 cm; grade 3 vs. non 3; mitotic activity high vs. non-high; vascular emboli present vs. none; pre-engraftment therapy yes vs. no; ER+ vs. ER−; pN0 vs. pN+) retained only a high grade (OR = 10.04 for high grade tumors, $P = 0.052$) and ER− status (OR = 0.14 for ER+ tumors, $P = 0.001$) as significant factors for tumor stable engraftment.

Histopathological and molecular characterization of luminal breast cancer xenografts and comparison with their corresponding primary patient tumors

To study the tumor morphology of the new established xenografts, morphological and immunohistochemical analyses were performed on six of the eight established luminal BC xenografts and compared to the patients tumors. In all cases, the morphological and architectural features of the patient's tumor were reproduced in the xenograft, whatever the histopathological type. Three examples are shown in Fig. 2a. For the first case, the tumor architecture of an infiltrating ductal carcinoma is maintained in the corresponding xenograft. Both massive and trabecular features are observed in the patient tumor and its xenograft, as well as the fibrous stromal component. In the second example, ductal carcinoma in situ features, and the invasive mucinous components are reproduced in the xenograft. The third example shows the preservation of the trabecular architecture between the patient tumor and its xenograft. Of note, cellular morphology was also highly conserved in all instances. Maintenance of the luminal type was assessed by both IHC and RT-qPCR quantification of specific genes. ER, PR, and HER2 expressions were reproduced in all xenografts but one (as shown in Fig. 2b).

The maintenance of the luminal type was also confirmed by RT-qPCR data, as ER, PR, and HER2 gene expressions were reproduced in all patient's tumor/xenografts. However, we have observed higher expression values for all studied genes in xenografts versus their corresponding primitive tumor, in line with the higher tumor cellularity generally observed in xenografts than in patient's tumors. Proliferation status was examined in both patient's tumors (mitotic count) and xenografts (mitotic index, Ki67 IHC and RT-qPCR quantification), showing that all patient's tumors presented either a high Ellis-Elston histological grade, and/or a high mitotic count (i.e., more than 21

Table 1 Characteristics of the patient tumors, according to ER status

ER status (*n*)	ER+ (314)	ER− (109)	*P* value
Age: median (range)	57 (27–93)	58 (34–90)	NS
Engrafted material, *n* (%)			
Patient tumor	284 (90.4)	85 (78)	$P = 0.02$
Metastases	30 (9.5)	24 (22)	
Tumor size : median (range)	23.5 (5–200)	25 (6–95)	NS
Pathological type, *n* (%)			
IDC	225 (71.6)	98 (89.9)	$P < 0.0001$
ILC	59 (18.8)	3 (2.7)	
Other	30 (9.5)	8 (7.3)	
Grade, *n* (%)			
1	60 (21)	4 (5)	$P < 0.0001$
2	141 (48)	9 (10)	
3	90 (31)	73 (85)	
$N = 377$[a]			
Mitotic activity, *n* (%)			
Low	144 (48)	10 (11.3)	$P < 0.0001$
Intermediate	56 (18.7)	16 (18.2)	
High	100 (33.3)	62 (70.5)	
$N = 388$[a]			
Vascular emboli, *n* (%)			
$N = 338$[a]	119 (47)	42 (49.4)	NS
pN+ (including pN1mi and pN0i+)	170 (54.5)	45 (49.5)	NS
PR+			
$N = 291$[a]	169 (84.9)	6 (6.5)	$P < 0.0001$
HER2+			
$N = 319$[a]	24 (10)	17 (21)	$P = 0.011$
Pre-treatment[b]			
$N = 406$[a]	35 (11.2)	19 (20.4)	NS
Tumor take, *n* (%)	8 (2.5)	27 (24.7)	$P < 0.0001$

IDC infiltrating ductal carcinoma, *ILC* infiltrating lobular carcinoma, *NS* not significant

[a] Actual number of annotated tumors

[b] Patients who have received any form of medical and/or radiation therapy before tumor removal and engraftment

mitoses per 10 fields at ×40 magnification). This high proliferation pattern was reproduced in all xenografts, with a non-significant trend toward higher proliferation parameters values (Table 2).

Comparative genomic human array (CGH)

To analyze the genomic profiles of the xenograft's tumors, we used the CGH array for both patients' and corresponding xenograft's tumor. The genomic pattern of the xenografts was generally similar to the patient's tumor. In all cases that have been analyzed, the alterations observed in the patient tumor were always observed in the xenografts as shown in Fig. 3, including specific amplicons. For instance, tumors HBCx-3 and HBCx-22 exhibit an almost similar pattern between the xenograft and the patient tumor, with very high Pearson correlation coefficients (Fig. 3a, b). It is noteworthy that this stability is observed on a very long span of time, i.e., more than 1 year and a half for HBCx-3. Additional data will be reported in a separate manuscript (Reyal et al., submitted).

In vivo tumor growth and estrogen dependence

E2 supported in vivo tumor growth was assessed for all luminal BC models. As shown in Table 3, the latency

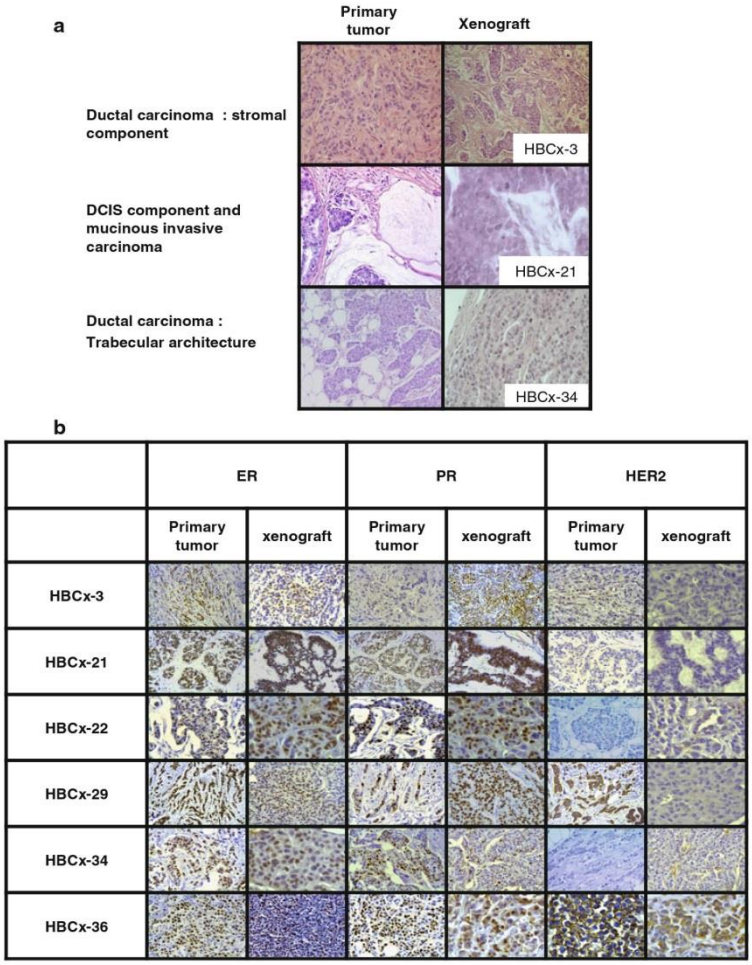


Fig. 2 Phenotypical stability of the xenografts. **a** Morphological and architectural stability between the patient tumor and its corresponding xenograft in three examples. **b** Maintenance of ER, PR, and HER2 status as assessed by IHC in different xenografts. *BC* breast carcinoma, *DCIS* ductal carcinoma in situ, *IHC* immunohistochemistry. Variation in the intensity of IHC is due to variations in fixative between donor tumor and xenograft samples

ranged between 28 and 77 days (median 47 days) and the doubling time between 10 and 85 days (median 14 days). The doubling time in ER+ xenografts was significantly longer than the doubling time previously observed in non luminal xenografts [14]. Estrogen dependence was further evaluated in in vivo experiments using mice bearing tumors receiving or not estrogen supplementation via drinking water, once the xenograft had reached the critical experimental size. As shown in Table 3, Figs. 4, 5, and Supplementary Fig. 6, estrogen supplementation significantly and strongly increased in vivo tumor growth. Finally, in one specific model, HBCx-29, we have observed a complete disappearance of the tumors after estrogen was removed from drinking water to begin the endocrine therapy experiments, as planned according to our protocol.

Endocrine therapies evaluation

The basic experiment to evaluate the degree of sensitivity to endocrine therapy of these xenografts was done including four "canonical" groups: a control group, and three treatment groups with tamoxifen, fulvestrant, and ovariectomy. Estradiol was removed from drinking water at the beginning of the experiments. In each group, all mice

Table 2 Comparative analysis of patient tumors and their corresponding xenografts for six luminal tumors

	Pathological type	ER				PR				HER2				Proliferation	
		IHC		qPCR[a]		IHC		qPCR		IHC		qPCR		Mitotic activity	
		PT	X	PT	X	PT	X	PT	X	PT	X	PT	X	PT (HES)	X (HES and Ki67 qPCR)
HBCx-3	IDC	+	+	NA	1381	–	–	NA	17	–	–		564	High	High
HBCx-21	DCIS + mucinous carcinoma	+	+	2779	5004	+	+	151	537	–	–	1646	1323	Intermediate	High
HBCx-22	IDC	+	+	1038	5869	+	+	72	853	–	–	2460	15,159[b]	High	High
HBCx-29	IDC	+	+	3646	1838	+	+	526	733	**+**	**–**	**66,575**	**2601**	High	High
HBCx-34	IDC	+	+	NA	1657	+	+	NA	67	–	–	NA	4425	High	High
HBCx-36	ILC	+	+	NA	720	+	+	NA	172	+	+	NA	101,609	High	High

HBCx human breast cancer xenograft, *IDC* infiltrating ductal carcinoma, *ILC* infiltrating lobular carcinoma, *DCIS* ductal carcinoma in situ, *PT* patient tumor, *X* xenograft, *HES* conventional hematoxylin eosine safran staining for mitotic count, *NA* non available (ongoing experiments)

[a] qPCR values were obtained at several passages; values of the most recent passages are given; Thresholds for qPCR positive values are: ER expression ≥ 1,400 units; PR: ≥ 35 units; HER 2: ≥ 15,000 units; Ki67 ≥ 1,000 units. Bolded cells denote discordant results between patient tumor and the corresponding xenograft

[b] Value at the cutpoint for HER2 overexpression by qPCR. Repeated IHC analyses on this xenograft always showed the lack of HER2 overexpression

were assessed. Overall, 335 mice were used for these experiments, with a death rate of 5.7%.

Actual values of tumor volumes at baseline, and at the time of evaluation, are shown in the Supplementary Table 2. It is evidenced that estradiol exerts a powerful growth effect in these models. Overall, the profile of response was different from one model to another, but all models were responsive to at least one modality of hormonal therapy (Table 3). Tamoxifen showed a moderate but statistically significant anti-tumor effect in HBCx-3 and HBCx-21 with a 40% TGI and a more pronounced anti-tumor activity in HBCx-22 and HBCx-34 (70% TGI). Fulvestrant was the most efficient treatment as it induced strong tumor growth inhibition or complete tumor regression (Table 3). Ovariectomy induced tumor regression, or at least long-term stabilization, in all models.

Another common feature was the very long time to tumor response and/or progression. For examples, Fig. 4a, b shows different response patterns to endocrine therapies. In Fig. 4a, we observe the slow spontaneous tumor growth (control group, E2-free), while all endocrine therapies show some degree of efficacy. Respective P values for ovariectomy, fulvestrant, and tamoxifen were: <0.001, <0.001, and 0.04. In order to further document the response profiles of our models, we conducted an expanded therapeutic experiment with HBCx-34, adding 4 treatment groups to the three of the four canonical groups: E2 supplemented group, 4-OH-tamoxifen-, letrozole-, and combined ovariectomy–letrozole groups to mimic the menopausal clinical setting. 4-OH-tamoxifen and letrozole were chosen to explore in these non-genetically modified in vivo systems the activity of a tamoxifen active derivative, as well as an aromatase inhibitor. Fulvestrant had been evaluated in a companion experiment (Supplementary Fig. 6f). As shown in Fig. 4b, the HBCx-34 model was characterized by long-term sensitivity to either drug, as well as a sustained dependence to estradiol. When the letrozole and ovariectomy + letrozole groups were compared to the ovariectomy group, P values were 0.23 and 0.28, respectively, suggesting the lack of synergy between ovariectomy and letrozole, and a high level of intrinsic activity of letrozole in this model. In all cases, TGI was not different between tamoxifen and its more potent derivative 4-OH-tamoxifen, suggesting a significant transformation of tamoxifen in mice. It therefore suggests that our models of primary human luminal breast cancer transplanted into immunodeficient mice are useful to evaluate the efficacy of tamoxifen.

Extensive results are presented in the Supplementary Fig. 6. For each extensively studied model, curves of response to endocrine therapies are presented. It is shown that different patterns of response may be observed between different models, thus reproducing the clinical heterogeneity. However, these models do not account for the potential heterogeneity of response within a single tumor. In order to explore more deeply the recapitulation of the clinical setting by our xenografts, we broke down the response curves into individual mice data. Response curves, as shown for instance in Fig. 4, depict the average response of a group of mice. When looking at the individual data of each group, we can observe three different situations: individual mice may not respond to treatment

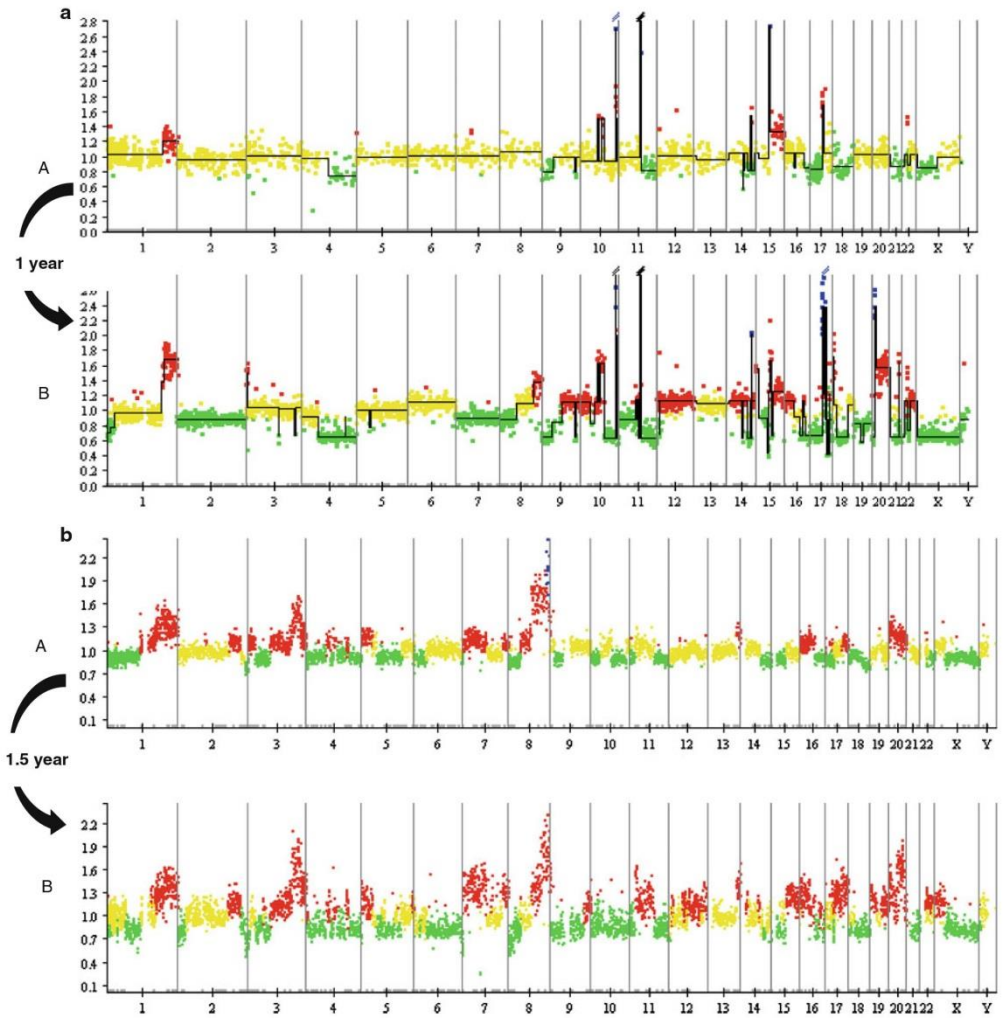


Fig. 3 BAC array CGH examples. **a** CGH profile from the patient tumor HBCx-3 (*panel A*) and its xenografts (*panel B*). It is shown that all variations observed in the patient tumor all also present in the xenografts, with additional alterations, such as higher gains (e.g., chromosome 1q), deeper losses (chromosome 2, chromosome 7), or even new amplicons (*blue dots*, chromosome 17 and 20). **b** A very similar pattern is observed for xenograft HBCx-22. In both the instances, a very long span of time separates acquisition of CGH data

(primary refractory disease), or may escape but more slowly, or finally display long-term sensitivity to treatment. Figure 5a and b presents two examples, for HBCx-22 and tamoxifen, and HBCx-34 and letrozole, respectively. We postulate that these individual curves may represent the differential response to treatment of tumor subclones.

Discussion

We report here our results on patient's-derived xenografts obtained by grafting 314 luminal breast carcinomas with standard clinical features. Despite the very low in vivo tumor take we obtained (2.5%), our panel of eight primary human luminal BC xenografts is to our knowledge the

Table 3 Tumor growth time-related parameters and tumor growth inhibition data

	Latency (days)	Doubling time without estrogen (days)	Doubling time with estrogen supplementation (days)	%TGI			
				Tamoxifen	Fulvestrant	Ovariectomy	Letrozole
HBCx-3	28	10	8	41	82	0	23
HBCx-21	77	14	NA	44	87	79	NA
HBCx-22	34	85	14	73	88	54	42
HBCx-29	53	NA	NA	NA	NA	NA	NA
HBCx-34	42	50	17	68	99	96	34
HBCx-36	53	12	NA	NA	NA	NA	NA

Latency: denotes time elapsed between engraftment of the fresh patient tumor and the xenograft take (volume $\geq 65\ mm^3$); Doubling time: denotes time needed to double the xenograft tumor volume; *TGI* tumor growth inhibition, as computed with the following formula: TGI (%) = 100 − [(RTV treated/RTV control) × 100]

NA not available (ongoing experiments)

largest ever established. Similar reports are very scarce in the literature. Fiebig et al. have published their early experience as soon as 1984 [20], which has been recently updated by Gieseman and coauthors, who report the establishment of two luminal B xenografts, with experimental conditions similar to ours, and also with molecular analyses confirming the overall phenotypical stability of the models [21]. They did not report on the overall tumor take efficiency for luminal BC, although they underlined the need for an orthotopic engraftment along with E2 supplementation. Bergamaschi et al. also reported one human luminal xenograft implanted subcutaneously with matrigel in a back pocket [22]. They also confirm the genetic stability of their model and the overall low tumor take of luminal tumors (1 out of 27). Other groups had also reported low take rates [23–25].

The ability of human luminal BC to grow in immunodeficient mice remains particularly poor. This very low tumor take may be attributed to several hypothetical factors. The observation that the tumor take is significantly lower in ER+ than in ER− tumors suggest that the hormone-dependence of these tumors is the major limiting factor. When looking at the grade of the tumors, we show (see Supplementary Table 1) that no grade 1 tumor was observed among our eight established xenografts. However, as depicted in Table 2, most ER+ tumors were grade 2 (48%) or 3 (31%), suggesting that these eight tumors may be representative of the average luminal breast cancer population. The other plausible factor favoring tumor take for luminal tumors is a high proliferation status ("luminal B tumors"), as shown in Table 2 and in the regression analysis. This has also been suggested by our previous report [14] and observed by Gieseman et al. [21] and Bergamaschi et al. [22].

Alternative methodologies should therefore be developed to increase the in vivo tumor take of luminal breast carcinomas, such as cell dissociation, humanized stroma, matrigel, use of mice with higher immunodeficiency, and others. However, all these methods will have to be validated in term of stability and reproducibility of the original patient tumors characteristics.

Indeed, we confirm in this report our previous findings [14] and those of others [22, 26] showing that as for other subtypes of breast cancer the phenotypical and the molecular profiles of the xenografts derived from luminal tumors are strikingly close to those of their patient tumor counterparts. This issue is particularly of importance in the view of preclinical therapeutic assessment. Extensive genomic data will be separately reported (Reyal et al., submitted); however, we have confirmed that the general profile was highly conserved, even if additional alterations could occur during the in vivo transplantation process. These new alterations may be explained by the higher content of tumor cells in the xenografts compared to the patient's tumors, due to a higher proliferation pattern commonly observed in the xenografts (see Figs. 2, 3). This phenomenon was also amplified by the quick disappearance of human cells in the stroma of the xenograft as evidenced by Alu probe staining (performed as in Ref. [27], data not shown), leading in the xenograft CGH experiments to an overrepresentation of human cancer cell DNA when compared to the human patient tumor. We postulate that these models are adequate in vivo surrogates for therapeutic preclinical studies, and to support this hypothesis, we conducted the first series of endocrine therapy experiments in this particular in vivo setting.

In addition to molecular and genomic assessments, we have also demonstrated, in most of our luminal BC xenografts, their estradiol-dependence. Estradiol has been shown to enhance tumor growth in our models, while estrogen removal from feeding in our control groups induced a slower tumor growth. Furthermore, additional

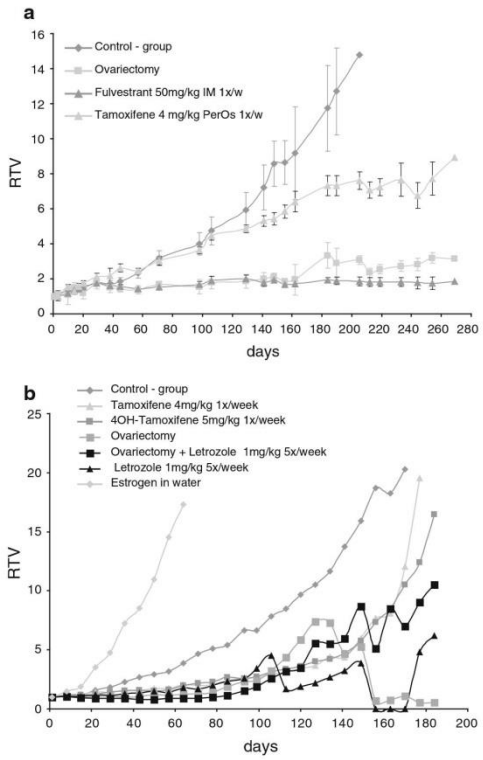


Fig. 4 Examples of responses to endocrine therapy. **a** Response of HBCx-21 to endocrine therapies. The four canonical group of endocrine therapy testing are shown: control group (*dark gray diamonds*, no estradiol), estrogen deprivation (ovariectomy—*light gray squares*), ER modulators (tamoxifen—*light gray triangles*), ER antagonist (fulvestrant—*dark gray triangles*). Sustained responses may be observed with each treatment, albeit with different levels of efficacy. **b** Extended therapeutic testing for xenograft HBCx-34. A different pattern of response is observed when compared to HBCx-21. Estrogen dependence is confirmed (*upper curve*). *P* values for tamoxifen, 4-OH-tamoxifen, ovariectomy, ovariectomy + letrozole, and letrozole were 0.01, 0.01, <0.001, <0.001, and 0.01, respectively

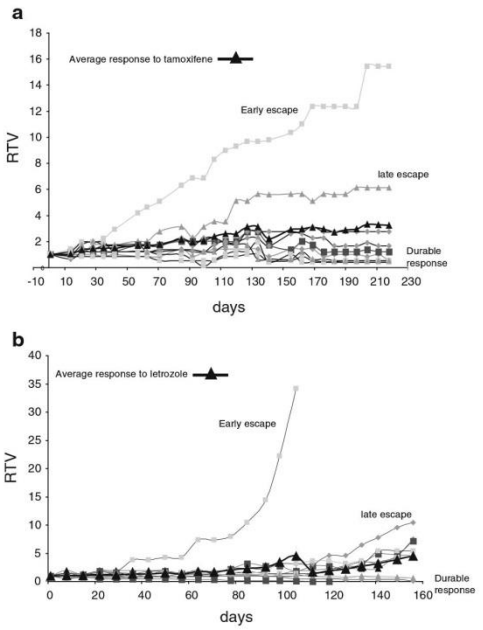


Fig. 5 Tamoxifen and letrozole individual data. In each case, the *thick curve plots* the average response of a group of mice, treated with tamoxifen (**a**, model HBCx-22) or with letrozole (**b**, model HBCx-34). *Thin curves* represent data from individual mice in each group. Three patterns of response are observed in each setting. *RTV* relative tumor volume

therapeutic estrogen deprivation by ovariectomy or letrozole had a significant inhibiting effect on tumor growth. Moreover, it is noteworthy that in vivo tumor growth of these ER+ BC tumors was slower than for various triple negative BC xenografts that we have also established and characterized [13, 14]. Such an observation is in complete concordance with the clinical outcome of both luminal and TNBC that occurred in women and therefore constitutes a characteristic that increases the relevance of our models. Considering the stability of the models in term of histopathological, molecular, and genomic characteristics, as well as the spontaneous in vivo tumor growth, we have therefore considered that these models are adequate in vivo surrogates for therapeutic preclinical studies and, to support this hypothesis, we have then evaluated various endocrine therapies in in vivo experiments.

We have shown that these models exhibit sensitivity to endocrine treatments. However, the response profiles varied widely from one model to another, reproducing the variability observed between patients in the clinical setting. Indeed, the patient population was representative of the common clinical setting, as evidenced in Table 1, adding a strong value to our observations.

The individual variability we observed in some treatment groups may also represent the individual variability observed at the single patient level. However, we have to keep in mind that intermouse variability could also be attributed to outbred status of the nude mice, as well as other parameters such as the actual tumor volume at the initiation of therapy (see Supplementary Table 2). Of note,

we have also shown in some models an equivalent efficacy of tamoxifen and its more potent derivative 4-OH-tamoxifen, thus supporting the existence of an active metabolism of tamoxifen in mice despite a lower affinity of the cyp2c2 cytochrome, the murine counterpart of the human CYP2D6 [19]. Using fulvestrant, a pure estrogen antagonist with no active metabolites or agonist effects, we were able to confirm that our models are strongly hormone-dependent. We have also demonstrated that the aromatase inhibitor letrozole can exert a significant antitumor efficacy in our system. Mice also harbor the murine equivalent of CYP19, called cyp2c19 [19]. It has been shown that aromatase knock-out mice develop a specific estrogen deprived phenotype [28, 29], and we have been able to observe that letrozole treatment induces a severe atrophy of the uterine bodies (data not shown).

Overall, we have durably established eight luminal BC models derived from patient luminal B breast cancer, of which six have been extensively characterized. These models seem to be able to mimic the clinical setting, and they present with biological features close to the patient tumors. They represent an opportunity for non-invasive biological and translational studies, as well as a powerful tool for preclinical biological investigations and drug developments.

Acknowledgments We are especially indebted to all the patients who consented to give their tumors for animal experiments. We would also like to thank all the members of the surgical oncology, and tumor biology teams who devoted much time to the patient tumor sampling. We deeply thank O. Chouchane and A. Nicolas for the IHC pictures. The Institut Curie in vivo experiment platform members should be gratefully acknowledged for their invaluable contribution to the mouse care. We are also indebted to C. Tran-Perennou and C. Barbaroux who performed the qPCR analyses. This work was supported by the Translational Research Department of Institut Curie. Dr. Paul Cottu is supported by a Grant from the Institut Curie Foundation.

Conflict of interest All authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer statistics, (2010). CA Cancer J Clin 60(5):277–300
2. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 25(1):118–145
3. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R (2011) Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. Lancet 378(9793):771–784
4. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, Forbes JF (2010) Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncol 11(12):1135–1141
5. Musgrove EA, Sutherland RL (2009) Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. Nat Rev Cancer 9(9): 631–643
6. Guix M, de Matos Granja N, Meszoely I, Adkins TB, Wieman BM, Frierson KE, Sanchez V, Sanders ME, Grau AM, Mayer IA, Pestano G, Shyr Y, Muthuswamy S, Calvo B, Krontiras H, Krop IE, Kelley MC, Arteaga CL (2008) Short preoperative treatment with erlotinib inhibits tumor cell proliferation in hormone receptor-positive breast cancers. J Clin Oncol 26(6):897–906
7. Johnston S, Pippen J Jr, Pivot X, Lichinitser M, Sadeghi S, Dieras V, Gomez HL, Romieu G, Manikhas A, Kennedy MJ, Press MF, Maltzman J, Florance A, O'Rourke L, Oliva C, Stein S, Pegram M (2009) Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. J Clin Oncol 27(33): 5538–5546
8. Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, Bapsy PP, Vaid A, Wardley A, Tjulandin S, Jahn M, Lehle M, Feyereislova A, Revil C, Jones A (2009) Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. J Clin Oncol 27(33): 5529–5537
9. Haddad TC, Yee D (2008) Of mice and (wo)men: is this any way to test a new drug? J Clin Oncol 26(6):830–832
10. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A (2007) Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. Am J Pathol 170(3):793–804
11. Vargo-Gogola T, Rosen JM (2007) Modelling breast cancer: one size does not fit all. Nat Rev Cancer 7(9):659–672
12. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW (2006) A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer Cell 10(6):515–527
13. de Plater L, Lauge A, Guyader C, Poupon MF, Assayag F, de Cremoux P, Vincent-Salomon A, Stoppa-Lyonnet D, Sigal-Zafrani B, Fontaine JJ, Brough R, Lord CJ, Ashworth A, Cottu P, Decaudin D, Marangoni E (2010) Establishment and characterisation of a new breast cancer xenograft obtained from a woman carrying a germline BRCA2 mutation. Br J Cancer 103(8): 1192–1200
14. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, de Plater L, Guyader C, De Pinieux G, Judde JG, Rebucci M, Tran-Perennou C, Sastre-Garau X, Sigal-Zafrani B, Delattre O, Dieras V, Poupon MF (2007) A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. Clin Cancer Res 13(13):3989–3998
15. Zafrani B, Aubriot MH, Mouret E, De Cremoux P, De Rycke Y, Nicolas A, Boudou E, Vincent-Salomon A, Magdelenat H, Sastre-Garau X (2000) High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. Histopathology 37(6):536–545
16. Balaton A (1999) Recommendations for the immunohistochemistry of the hormonal receptors on paraffin sections in breast cancer. Update 1999. Group for Evaluation of Prognostic Factors

using Immunohistochemistry in Breast Cancer (GEFPICS-FNCLCC). Ann Pathol 19(4):336–343
17. Vincent-Salomon A, MacGrogan G, Couturier J, Arnould L, Denoux Y, Fiche M, Jacquemier J, Mathieu MC, Penault-Llorca F, Rigaud C, Roger P, Treilleux I, Vilain MO, Mathoulin-Pelissier S, Le Doussal V (2003) Calibration of immunohistochemistry for assessment of HER2 in breast cancer: results of the French multicentre GEFPICS study. Histopathology 42(4):337–347
18. Carlson RW, Allred DC, Anderson BO, Burstein HJ, Carter WB, Edge SB, Erban JK, Farrar WB, Forero A, Giordano SH, Goldstein LJ, Gradishar WJ, Hayes DF, Hudis CA, Ljung BM, Mankoff DA, Marcom PK, Mayer IA, McCormick B, Pierce LJ, Reed EC, Sachdev J, Smith ML, Somlo G, Ward JH, Wolff AC, Zellars R (2011) Invasive breast cancer. J Natl Compr Canc Netw 9(2):136–222
19. McLaughlin LA, Dickmann LJ, Wolf CR, Henderson CJ (2008) Functional expression and comparative characterization of nine murine cytochromes P450 by fluorescent inhibition screening. Drug Metab Dispos 36(7):1322–1331
20. Fiebig HH, Schuchhardt C, Henss H, Fiedler L, Lohr GW (1984) Comparison of tumor response in nude mice and in the patients. Behring Inst Mitt 74:343–352
21. Giesemann T, Krumbach R, Schüler J, Vuaroqueaux V, Hofmann M, Liu N, Haegebarth A, Beckers T, Fiebig H (2010) Patient-derived breast cancer xenografts: Molecular characteristics and growth properties. In: 22th EORTC-NCI-AACR Conference, Berlin. Abstract 634
22. Bergamaschi A, Hjortland GO, Triulzi T, Sorlie T, Johnsen H, Ree AH, Russnes HG, Tronnes S, Maelandsmo GM, Fodstad O, Borresen-Dale AL, Engebraaten O (2009) Molecular profiling and characterization of luminal-like and basal-like in vivo breast cancer xenograft models. Mol Oncol 3(5–6):469–482
23. Luo M, Fan H, Nagy T, Wei H, Wang C, Liu S, Wicha MS, Guan JL (2009) Mammary epithelial-specific ablation of the focal adhesion kinase suppresses mammary tumorigenesis by affecting mammary cancer stem/progenitor cells. Cancer Res 69(2): 466–474
24. Sakakibara T, Xu Y, Bumpers HL, Chen FA, Bankert RB, Arredondo MA, Edge SB, Repasky EA (1996) Growth and metastasis of surgical specimens of human breast carcinomas in SCID mice. Cancer J Sci Am 2(5):291–300
25. Visonneau S, Cesano A, Torosian MH, Miller EJ, Santoli D (1998) Growth characteristics and metastatic properties of human breast cancer xenografts in immunodeficient mice. Am J Pathol 152(5):1299–1311
26. Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, Harris CC, McLellan MD, Fulton RS, Fulton LL, Abbott RM, Hoog J, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Kalicki J, Zhang Q, Chen L, Lin L, Wendl MC, McMichael JF, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Appelbaum E, Deschryver K, Davies S, Guintoli T, Crowder R, Tao Y, Snider JE, Smith SM, Dukes AF, Sanderson GE, Pohl CS, Delehaunty KD, Fronick CC, Pape KA, Reed JS, Robinson JS, Hodges JS, Schierding W, Dees ND, Shen D, Locke DP, Wiechert ME, Eldred JM, Peck JB, Oberkfell BJ, Lolofie JT, Du F, Hawkins AE, O'Laughlin MD, Bernard KE, Cunningham M, Elliott G, Mason MD, Thompson DM Jr, Ivanovich JL, Goodfellow PJ, Perou CM, Weinstock GM, Aft R, Watson M, Ley TJ, Wilson RK, Mardis ER (2010) Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. Nature 464(7291):999–1005
27. Just L, Timmer M, Tinius J, Stahl F, Deiwick A, Nikkhah G, Bader A (2003) Identification of human cells in brain xenografts and in neural co-cultures of rat by in situ hybridisation with Alu probe. J Neurosci Methods 126(1):69–77
28. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. Proc Natl Acad Sci USA 95(12):6965–6970
29. Toda K, Takeda K, Okada T, Akira S, Saibara T, Kaname T, Yamamura K, Onishi S, Shizuta Y (2001) Targeted disruption of the aromatase P450 gene (Cyp19) in mice and their ovarian and uterine responses to 17beta-oestradiol. J Endocrinol 170(1): 99–111

V. DEVELOPPEMENT ET CARACTERISATION DES MODELES HORMONORESISTANTS

1. CONTEXTE

Sur les bases établies dans la littérature, un consensus s'est dégagé pour souligner l'utilité des PDX dans l'évaluation préclinique et la recherche translationnelle[144, 155, 156], et nous avons poursuivi le développement des PDX de CS luminal dans le but de pouvoir modéliser la résistance à l'HT. La plupart des situations cliniques dans le CS luminal se déroulent sur un temps long avec apparition progressive de l'échappement thérapeutique (voir figures 3, 9-11), et compte tenu de la difficulté à obtenir des échantillons cliniques appariés (tumeur primitive « sensible », métastase « résistante »), il est apparu particulièrement pertinent de mettre à profit les tumeurs ou « sous-clones » devenus résistants à un traitement donnée (figures 30 et 30bis) pour développer des PDX de deuxième génération devant permettre des analyses comparatives entre PDX de référence hormonosensible et PDX rendue résistante sous pression thérapeutique. Nous avons également analysé dans ces modèles la sensibilité à l'évérolimus, inhibiteur spécifique de mTORC1 indiqué dans le CS RE+ devenu hormonorésistant, ainsi que la voie PI3K/mTOR.

2. MATERIELS ET METHODES

Nous résumons ici les principales méthodes utilisées dans ce deuxième temps du travail.

DEVELOPPEMENT DES MODELES RESISTANTS* ET TRAITEMENTS*

Les techniques de greffe utilisées sont les mêmes que celles décrites précédemment. Nous avons utilisé les PDX HBCx-22 et HBCx-34 et les tumeurs dérivées échappant à un traitement (figure 30bis) pour développer les modèles hormonorésistants. Nous avons défini une terminologie pour ces modèles basée sur le nom de la PDX initiale et le traitement [T] sous lequel la résistance (R) s'est

installée : HBCx-[num] [T]R. Nous avons également défini la méthodologie de création de ces modèles, selon les étapes suivantes :

1. A l'échappement tumoral, réimplantation sur souris Swiss nude traitées de manière identique au bras d'échappement
2. Obtention de 3 passages successifs dans les mêmes conditions (prise de greffe)
3. Nouvelle greffe avec tests thérapeutiques multiples. Confirmation de la résistance par obtention d'une courbe de croissance moyenne sous traitement identique à celle du bras contrôle

Les modèles ainsi obtenus étaient considérés comme utilisables pour les expériences et analyses ultérieures.

Les traitements hormonaux étaient administrés de manière identique à précédemment. L'évérolimus a été fourni gracieusement par Novartis Pharma® et administré par voie orale à la dose de 2,5 mg/kg 3 fois par semaine, selon l'expérience du laboratoire fournisseur. Le suivi des groupes traités et le soin apporté aux souris ont été réalisés de manière identique à celle précédemment exposée.

ANALYSES SUPERVISEES*

J'ai choisi de regrouper sous ce terme l'ensemble des analyses anatomopathologiques, protéiques (IHC et western blot), et moléculaires ciblées (RT-PCR, recherche de mutations) menées de manière simultanée et comparative sur les PDX et leurs dérivés résistants, à l'initiation et à la fin des traitements selon le volume tumoral résiduel disponible. Brièvement, les séries d'analyses suivantes ont été réalisées :

1. Evaluation architecturale comparative et réalisation de tissue micro array (TMA).
2. Coloration IHC (3 souris par groupe de traitement) pour les protéines RE, RP, FOXA1, Ki67, IGF1-R, PTEN, Akt1 et P-Akt1 (forme phosphorylée en Thr308), mTOR et P-mTOR, P-p70S6K sur des prélèvements effectués avant tout traitement et à H24 après la dernière dose de traitement. Un phospho-score (table 8) a été défini pour P-p70S6K (annoté de manière simplifiée P-S6 dans le texte) comme marqueur potentiel d'activation de la voie PI3K/mTOR :

Pourcentage de cellules marquées	score
>50%	++
>10 – 50%	+
>1 – 10%	±
≤1%	-

Table 8. Définition du phospho-score pour P-p70S6K

3. Analyse de l'expression par Western Blot (WB) de Akt1/P-AKT1 et p70S6K/P-p70S6K. Normalisation versus GADPH.
4. Analyse par RT-PCR selon les conditions décrites précédemment de l'expression de gènes des voies HER 1-3, du cycle cellulaire et de l'apoptose (5 réplicats par analyse).
5. Recherche de points chauds de mutation sur les gènes *PIK3CA, PIK3R1, ESR1* par amplification ciblée et séquençage direct avec un seuil de détection de 5% de cellules mutées[75, 116, 120, 157, 158].

L'analyse de l'expression des protéines a systématiquement été menée sur 2 ou 3 souris de chaque groupe de traitement et en duplicate pour chaque échantillon.

GENERATION ET ANALYSE* DES PROFILS GENOMIQUES

Un profil d'expression pangénomique a été généré pour chaque PDX et ses dérivés résistants, à partir de puces Affymetrix GeneChip Human 1.1 ST, en 5 réplicats pour chaque tumeur testée. Les données ont été normalisées puis analysées par la technologie EASANA développée par Genosplice®, en ne retenant que les gènes dont l'expression pouvait être comparée entre au moins 2 situations différentes (ex : sensible vs résistant au tamoxifène) et après comparaison de l'intensité entre les réplicats (test de Student). Les variations de niveau d'expression étaient considérées comme étant significatives au seuil de 5% avec un ratio (*fold-change*) ≥ 1,5. L'annotation Gene Ontology (GO) a été analysée sur la base DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*). Les fonctions biologiques et les régulations potentielles ont été analysées par IPA (*Ingenuity Pathway Analysis* - Ingenuity Systems®). Les données brutes sont accessibles sur GEO sous le numéro GSE55561.

En parallèle un profil génétique tumoral a été généré en duplicata pour HBCx-22, HBCx-34 et leurs dérivés TamR et OvaR. L'ADN génomique (ADNg) a été extrait par une méthode phénol/chloroforme

et contrôlé sur un gel d'agarose à 0.5%. La cartographie Affymetrix Human mapping SNP 6.0 a été réalisée avec 500 ng d'ADNg en suivant les instructions du fabricant au sein de la plateforme génomique de l'Institut Curie. Brièvement, l'ADN était digéré de manière indépendante par les enzymes Styl ou Nspl. Des adaptateurs dédiés étaient liés à l'ADN avant la réalisation d'une série de 7 PCR indépendantes avec la polymérase TitaniumTM Taq DNA (Clonetech®). Les produits de PCR étaient contrôlés sur gel d'agarose 2%, rassemblés puis fragmentés avec la DNAse I. La taille des fragments résultants était contrôlée par électrophorèse avant marquage terminal et hybridation SNP6.0. Après hybridation, les microarrays étaient colorés, lavés puis analysés grâce au système Affymetrix GCS3000. Les données ont été contrôlées sur la console Affymetrix Genotyping et les profils génétiques obtenus comparés avec la Suite Chromosome Analysis. Les méthodes détaillées ont été rapportés[159, 160].

3. RESULTATS

ETABLISSEMENT ET CARACTERISATION DES MODELES HORMONORESISTANTS

Obtention de 4 modèles

Nous avons pu par sélection des clones résistants et greffes successives obtenir 4 modèles résistants, dénommés HBCx-22 TamR, HBCx-22 OvaR, HBCx-34 TamR et HBCx-34 Ovar. TamR désigne la résistance au tamoxifène et OvaR la résistance à la castration chirurgicale, c'est-à-dire la déprivation oestrogénique. La comparaison aux PDX initiales, sensibles, a montré une parfaite stabilité architecturale, ainsi que de l'expression de RE, Ki67 et FOXA1 (figure 31). Cet aspect a été confirmé en qRT-PCR.

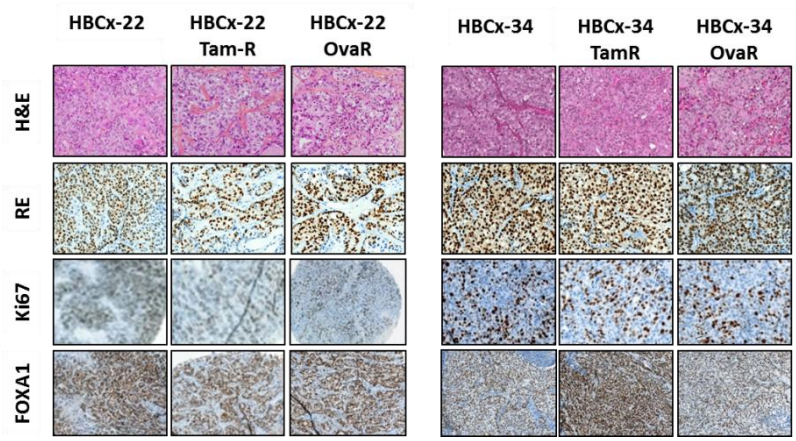


Figure 31 : Analyse comparée morphologique (H&E) et en IHC des deux PDX de référence et leurs dérivés résistants.

Confirmation de la résistance

La résistance acquise à l'hormonothérapie a été confirmée dans 3 modèles résistants, HBCx-22 TamR, HBCx-22OvaR et HBCx-34 TamR, le dernier (HBCx-34 OvaR) n'ayant pas encore été évalué. Les courbes sont reportées dans la partie VI. Pour chaque modèle, la résistance au traitement sous lequel il a été développé est confirmée, avec une courbe de croissance sous ce traitement superposable à celle du bras contrôle. La différence principale réside dans la spécificité de la résistance acquise :

- HBCx-22 TamR apparaît résistant à l'ensemble des modalités évaluées
- HBCx-22 OvaR est résistant à la déprivation oestrogénique même renforcée par le létrozole, et garde une sensibilité au tamoxifène (p=0,003) et intermédiaire au fulvestrant (ns).
- HBCx-34 TamR semble spécifiquement résistant au tamoxifène, garde une sensibilité significative au fulvestrant et probablement intermédiaire à la déprivation oestrogénique.

La table 9 ci-dessous résume l'inhibition de croissance observée avec les différents modalités d'HT : antioestrogène (Tamoxifène), antagoniste pur du RE (fulvestrant) et déprivation oestrogénique (castration associée à un IA).

	Tamoxifène % TGI (p)	Fulvestrant % TGI (p)	Ovariectomie + létrozole % TGI (p)
HBCx-22 TamR (J 106)	**6 (0,82)**	**5 (0,85)**	**9 (0,70)**
HBCx-22 OvaR (J 112)	46 (0,003)	**19 (0,20)**	**-26 (0,23)**
HBCx-34 TamR (J 114)	**-68 (0,21)**	86 (0,034)	**37 (0,57)**

Table 9. Inhibition de croissance (*tumor growth inhibition*, TGI). Pour un traitement X elle est calculée par la formule : TGI(%) = $(1-RTV_X/RTV_{contrôle}) \times 100$. Un TGI à 0 indique l'absence de régression tumorale et un TGI négatif une progression sous traitement. Les valeurs de p indiquent la différence par rapport au contrôle. L'absence de significativité (police rouge et orange) indiquent un TGI et une courbe de croissance identique au bras contrôle et indiquent la résistance au traitement X.

Fonctionnalité du RE

Aucune mutation de *ESR1* sur les points chauds récemment mis en évidence (E380Q, V392I, S463P, P535H, L536R, Y537C/N/S, D538G, R555C) dans le domaine de liaison du ligand[75] n'a été identifiée, ni dans les PDX initiales, ni dans les modèles résistants. Cet aspect couplé à la conservation à l'identique de l'expression du RE (IHC et qRT-PCR) et de FOXA1 (IHC et qRT-PCR), un de ses principaux facteurs pionniers, a conduit à évaluer sa fonctionnalité par la mesure de l'expression de ses principaux gènes cibles. L'analyse couplée par IHC et qRT-PCR de l'expression d'IGF1R et de RP montre des modifications importantes, parallèles en IHC et qRT-PCR, mais différentes selon les 4 situations de résistance étudiées, suggérant une spécificité de chaque situation considérée (figure 32). Une diminution de l'expression d'autres gènes cibles du RE : *MYB1, PS2, BCL2*, a également été observée en qRT-PCR dans les 4 modèles résistants.

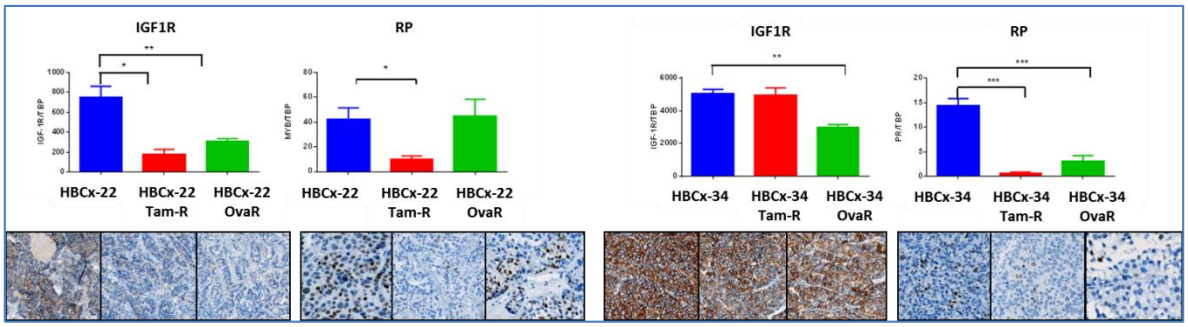


Figure 32. Expression génique et protéique comparée d'IGF1R et de RP dans les PDX sensibles et les dérivées résistantes.

Ces données ont été complétées par l'évaluation du niveau d'expression génique des principaux facteurs pionniers du RE : FOXA1 (voir supra), GATA3[87, 161], PBX1[84, 162], et GREB1[163] (figure 33).

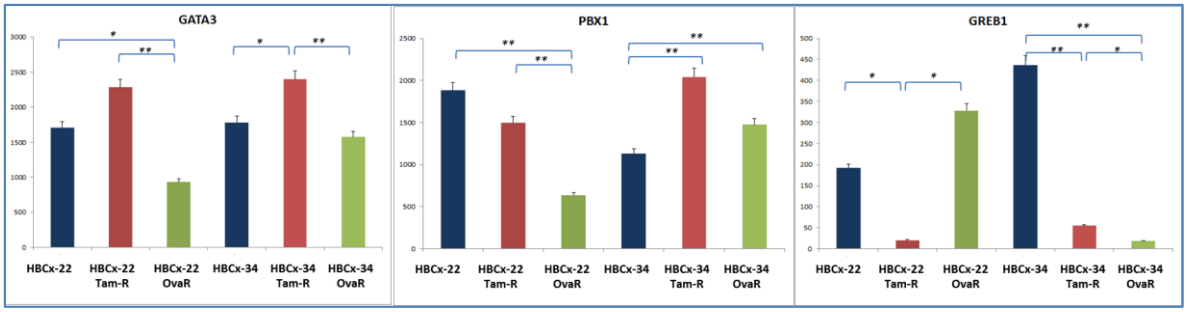


Figure 33. Expression (qRT-PCR) comparée des facteurs pionniers du RE dans les PDX et les modèles résistants dérivés. * : p<0,05 ; ** : p< 0,01.

On observe un comportement variable selon les PDX d'origine et les situations de résistance. GATA3 et PBX1 restent à des niveaux élevés pour les modèles TamR mais avec des variations inverses par rapport à la PDX parentale entre HBCx-22 et HBCx-34. Leur niveau est en général un peu plus bas dans les tumeurs OvaR mais avec une variation inverse pour HBCx-34 OvaR. Les variations les plus marquées sont observées pour GREB1 qui est pratiquement toujours effondré sauf pour HBCx-22 OvaR.

Description de la voie PI3K/Akt/mTOR

Il n'y a pas de test validé affirmant l'activation de la voie PI3K/mTOR. Nous avons mis à profit les TMA réalisés sur les PDX et modèles résistants pour évaluer l'expression des formes phosphorylées, actives, des principales protéines de la voie. Les résultats ont été confrontés à une analyse par western blot et sont présentés dans la figure 34 qui synthétise la figure publiée. En se référant à l'état phosphorylé de la p70S6 kinase, une des kinases terminales majeures de la voie, celle-ci apparaît activée pour HBCx-22 et HBCx-34. Les profils sont strictement superposables à la tumeur parentale pour les 4 modèles résistants. Le profil des séries HBCx-22 et HBCx-34 diffère cependant. On observe l'absence d'expression de PTEN par les cellules tumorales dans HBCx-22 (avec confirmation d'une perte d'hétérozygotie aussi bien dans la tumeur primitive que dans la PDX en CGH array et en SNP6.0, données non montrées), associée à une expression élevée de P-AKT, P-mTOR et P-S6 aussi bien en IHC qu'en WB. Le phospho-score de P-S6 est coté ++ aussi bien pour HBCx-22 que pour ses deux dérivés TamR et OvaR.

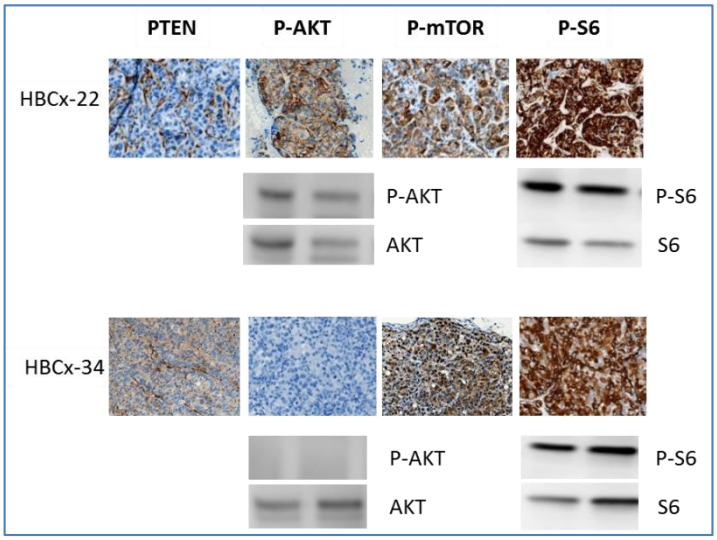


Figure 34. Activation de la voie PI3K dans les PDX parentales.

Cette analyse a été complétée par le séquençage des points chauds de mutations de *PIK3CA* et *PIK3R1*. Nous avons pu observer dans les tumeurs HBCx-22 une délétion de 24 pb dans l'exon 13 de *PIK3R1* (c.1704_1727del), connue pour activer la voie[158]. L'association perte de PTEN + mutation *PIK3R1* rend parfaitement compte de l'activation de la voie, présente dans la PDX initiale hormonosensible. La PDX HBCx-34 conserve une expression cytoplasmique de PTEN, associée à l'absence d'expression de P-AKT, alors que P-mTOR et P-S6 sont fortement exprimées. Le phospho-score de P-S6 est aussi coté ++ dans HBCx-34 et ses formes TamR et OvaR. Le séquençage de *PIK3CA*, *PIK3R1* et *AKT1* n'a retrouvé aucune anomalie.

L'ensemble de ces résultats montrent dans ces modèles l'apparition d'une résistance aux traitements hormonaux, partielle ou totale, et de profil différent chaque tumeur et chaque traitement de sélection. Cette résistance n'est associée ni à une perte de RE ni à une mutation de *ESR1*, ni à l'apparition d'une activation de la voie PI3K/mTOR qui est présente dans la tumeur parentale sensible dans les deux séries. Ces résultats suggèrent également des modifications de l'activité transcriptionnelle du RE.

ANALYSES GENOMIQUES

Les xénogreffes ont été au préalable analysées sur le plan génomique par SNP array 6.0. Aucune différence de profil n'a été observée entre les PDX parentales sensibles et leurs 2 dérivées résistantes (figure 35).

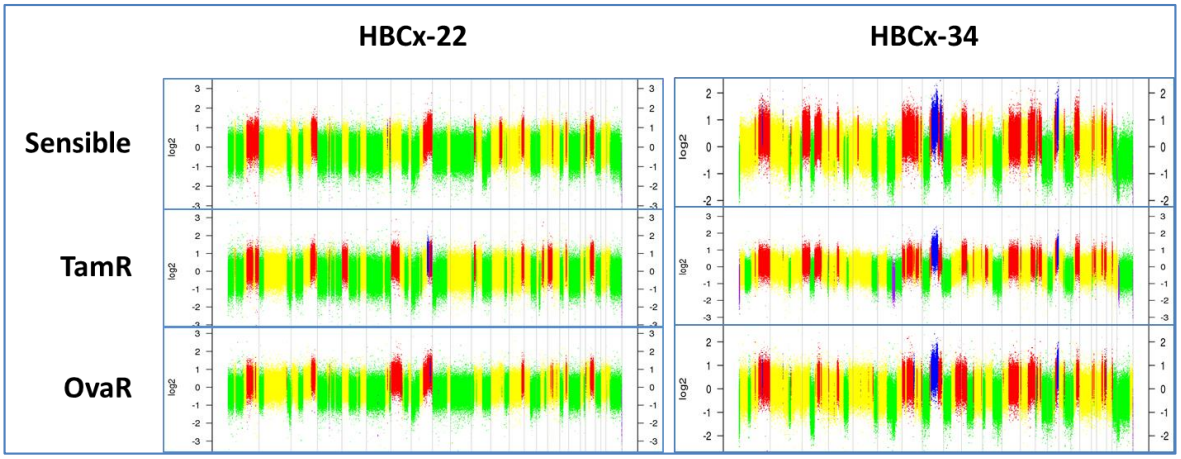


Figure 35. Profil SNP6.0 comparé des PDX parentales sensibles et des variants TamR et OvaR pour HBCx-22 et HBCx34.

On observera par ailleurs la grande stabilité des profils au fil du temps : à titre d'exemple, le profil CGH initial de HBCx-22 obtenu par BAC array sur la tumeur donneuse (de la patiente) et le passage p1 de la xénogreffe est superposable à ceux présentés dans la figure SNP, obtenus aux passages p10 (HBCx-22) et p7 (variants TamR et OvaR). Une analyse en composante principale (non montrée) a confirmé cette grande proximité des PDX entre elles. Cette description initiale a été complétée par la génération d'un clustering hiérarchique basé sur un profil d'expression pangénomique.

Dans un premier temps, nous avons confirmé l'appartenance au groupe luminal de l'ensemble des PDX RE+, tumeurs parentales comme variants résistants (données non montrées). Les variants co-ségrégent systématiquement avec leur PDX parentale.

Nous avons dans un second temps réalisé un clustering hiérarchique pour chaque groupe tumoral (ex : HBCx-22 et ses dérivés TamR et OvaR, avec 5 réplicats par tumeur) basé sur les 504 gènes les plus variants (figure 36). De manière remarquable, chaque xénogreffe présente un profil d'expression qui lui est propre, et ce de manière très reproductible.

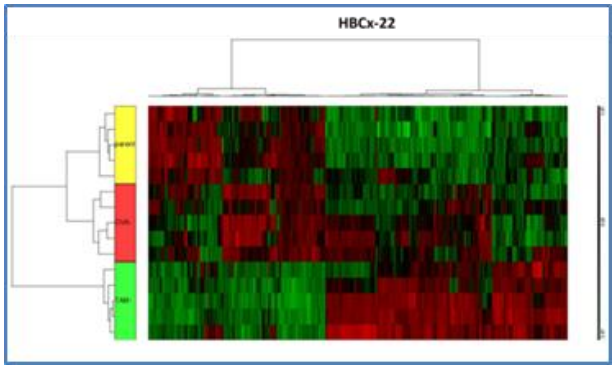


Figure 36. Clustering non supervisé de HBCx-22 et ses deux dérivés TamR et OvaR. Chaque tumeur est analysée en 5 exemplaires. Jaune : PDX parentale HBCx-22 ; Rouge : HBCx-22 OvaR ; vert : HBCx-22 TamR.

Ces résultats préliminaires et non publiés ont servi de base aux analyses plus détaillées des données transcriptomiques rapportées dans l'article 3 et dont nous résumons ci-après les conclusions principales :

1. Chacune des 4 PDX résistantes présente un profil d'expression différentiel spécifique par rapport à sa PDX sensible parentale originale. Pour chaque paire (HBCx-22 TamR et OvaR ; HBCx-34 TamR et OvaR) il existe un faible chevauchement entre les profils.
2. De même, les signatures TamR et OvaR semblent différentes pour chaque tumeur, avec par exemple seulement 210 et 207 gènes dérégulés en commun.

A titre d'exemple et pour souligner la diversité biologique, la liste des 10 gènes présentant la variation d'expression la plus importante (*fold change*) pour chaque PDX est indiquée en annexe « 2. transcriptome ». Nous avons construit le diagramme de Venn (figure 37) explorant le lien potentiel entre les 4 signatures obtenues en considérant les gènes avec un fold-change ≥ 1,5 ($p < 0,05$).

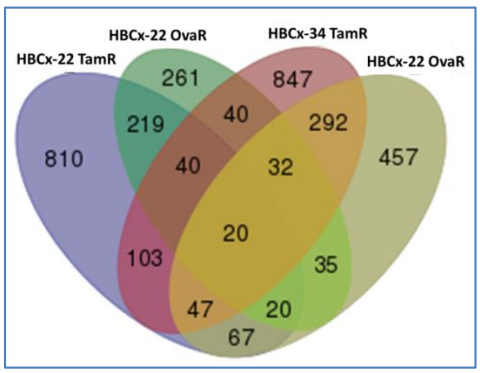


Figure 37. Diagramme de Venn permettant d'isoler les 20 gènes communs aux 4 signatures d'expression obtenues à partir des 4 PDX résistantes.

Ce diagramme permet d'obtenir une liste résiduelle de 20 gènes dont la liste est indiquée ci-dessous (Table 10). Il n'a pas été possible de mettre en évidence une unité dans le sens de la variation d'expression, ni de lien fonctionnel.

GENE	HBCx-22 TamR	HBCx-22 OvaR	HBCx-34 TamR	HBCx-34 OvaR	processus
QPRT	up	up	down	down	*neurology*
TCF4	down	down	up	up	*neurology*
CRABP1	down	up	down	down	*retinoic pathway*
TPD52L1	up	up	down	down	*interacts map3k5*
FAM83B	up	up	up	up	
NCAM2	up	up	up	up	*neurology*
TUSC3	up	up	down	down	*epithelial tumor cell lines- del in Prost Cancer*
LRRC20	up	up	down	down	
SLC27A2	down	up	down	down	
MLLT11	up	up	down	down	*leukemia*
STEAP1	up	up	up	up	*cell cell junction*
TNIK	up	up	down	up	
UCHL1	up	up	down	down	*neurology*
RBM24	down	up	down	down	
PPARG	down	up	down	down	*retinoic pathway*
FKBP10	up	up	down	down	*chaperone*
CLU	up	up	up	up	*chaperone*
ENDOD1	up	up	down	down	
PPP1R3C	up	up	down	down	
TBC1D9	up	up	down	down	*tubuline chaperone*

Table 10. Liste des 20 gènes communs aux 4 signatures. Surlignés en vert : gènes dont l'expression augmente dans HBCx-22 et baisse dans HBCx-34 ; en rouge : gènes dont l'expression augmente dans les 4 situations ; en blanc : variation complexe. Les processus auxquels sont associés ces gènes sont indiqués quand ils sont connus.

3. L'annotation DAVID (GO) et IPA des gènes dérégulés dans les 4 PDX résistantes a permis de mettre en évidence les processus biologiques (BP) potentiellement impliqués dans les mécanismes de résistance à l'HT. La table 11 liste les BP les plus fréquemment impliqués pour chaque PDX et en souligne la diversité.

HBCX-22 TamR	HBCx-22 OvaR
response to chemical stimulus	*nitrogen compound biosynthetic process*
response to wounding	*nucleotide metabolic process*
response to endogenous stimulus	*nucleoside phosphate metabolic process*
response to hormone stimulus	*antigen processing and presentation*
response to external stimulus	*purine nucleotide biosynthetic process*
HBCx-34 TamR	**HBCx-34 OvaR**
water-soluble vitamin biosynthetic process	*homophilic cell adhesion*
pyridine nucleotide biosynthetic process	*cell-cell adhesion*
regulation of phosphate metabolic process	*cell adhesion*
regulation of phosphorus metabolic process	*biological adhesion*
apoptotic mitochondrial changes	*response to vitamin*

Table 11. Liste des principaux processus biologiques associés à l'hormonorésistance dans les 4 PDX résistantes.

4. L'importance des modifications transcriptionnelles dans la résistance est soulignée par l'implication directe de multiples régulateurs transcriptionnels (NFκB, AP1, ETS1, BRCA1, FOXA1…) dans ces modifications.

Surtout, le point commun principal entre ces 4 modèles de résistance réside dans l'altération partagée mais avec un niveau variable de fonctions cellulaires majeures comme d'une part prolifération et cycle cellulaire, et d'autre part mort cellulaire et survie (analyse IPA). Cet aspect a été validé par l'analyse d'expression par qRT-PCR de gènes clés impliqués dans ces fonctions (famille *HER* ; gènes du cycle tels *MKI67, WEE1, CDC25B* ; gènes de l'apoptose tels *BCLxL, BLC2, PUMA*) qui a montré des modifications significatives d'expression, chaque tumeur présentant son profil propre.

Partie V : résumé

- Nous avons développé et validé des modèles de PDX devenus hormonorésistants. 4 modèles ont été obtenus.
- Le profil de résistance est tumeur- et traitement-spécifique.
- Le RE est conservé mais son activité transcriptionnelle est modifiée.
- L'activation de la voie PI3K/mTOR n'est pas impliquée dans la résistance dans ces modèles.
- Le profil génomique (CGHa et SNP6.0) est stable mais il existe de fortes variations du profil d'expression (Affy) d'un modèle à l'autre, sans signature commune.
- La prolifération, le cycle cellulaire, la survie et la mort cellulaire sont les fonctions cellulaires les plus impliquées.

VI. CIBLAGE DE LA VOIE PI3K/MTOR

L'évérolimus, inhibiteur spécifique de mTORC1, a obtenu son AMM en France en juillet 2012, dans l'indication CS avancé et en combinaison avec l'exemestane, sur la base de l'étude d'enregistrement Bolero-2[164–166]. Une étude de phase II randomisée avait aussi validé le principe de l'efficacité de l'association au tamoxifène[167]. Les analyses menées à partir de ces deux études n'ont pu être réalisées que sur des sous-populations et n'ont pas permis de mettre en évidence de manière formelle des facteurs prédictifs de bénéfice de l'évérolimus. Ces études n'ont de plus pas évalué l'évérolimus en monothérapie dans cette situation clinique d'hormonorésistance. Dans ce contexte et sur la base de la description des 4 PDX résistantes obtenues, nous avons évalué l'efficacité préclinique et biologique de l'évérolimus dans les PDX sensibles et leurs variants résistants.

1. EVALUATION DE L'EVEROLIMUS*

Les PDX HBCx-22, HBCx-34 et leurs dérivés résistants respectifs TamR, OvaR et TamR ont pu être évalués. Plusieurs situations sont ainsi identifiées, fonction de chaque tumeur. Pour les PDX HBCx-22 et dérivés, l'évérolimus est universellement actif aussi bien en monothérapie qu'en association, avec des régressions durables dans les 2 modèles résistants, et des régressions complètes et durables pour la PDX HBCx-22 native hormonosensible (figure 38). Le TGI est indiqué dans la table 12. Les données sont plus parcellaires avec HBCx-34, malgré la persistance d'une forte E2 dépendance (courbe non montrée). Seule la PDX TamR a pu être testée (figure 39). On observe néanmoins un profil tout à fait différent de HBCx-22 : il existe une efficacité similaire de l'évérolimus et de la combinaison évérolimus-tamoxifène, alors que la combinaison au fulvestrant est significativement supérieure au fulvestrant seul et à l'évérolimus seul suggérant une synergie qui serait à confirmer formellement *in vitro*.

Ces résultats ont été confirmés par l'observation d'une augmentation significative du taux de réponse avec la combinaison (55,5% sous évérolimus-fulvestrant vs. 0 sous fulvestrant seul, p=0,034 par le test exact de Fisher), et d'un allongement significatif de la survie sans progression dans le bras combinaison (p<0,001 par le test du log rank).

	Evérolimus % (p)	Evérolimus + tamoxifène % (p)	Evérolimus + fulvestrant % (p)	Evérolimus + létrozole/ovariectomie % (p)
HBCx-22	95 (3,9E-8)	97 (7,6E-8)	96 (1,04E-7)	99 (5,9E-8)
HBCx-22 TamR	90 (0,00002)	93 (0,0001)	95 (0,0002)	-
HBCx-22 OvaR	91 (2,1E-7)	91 (4,2E-7)	93 (1,3E-7)	-
HBCx-34 TamR	70 (0,0186)	69 (0,0488)	98 (0,0019) 93 (0,00022)* 84 (0.004)**	-

Table 12. Le taux d'inhibition de croissance est calculé comme indiqué dans la table 9. *indique le TGI par rapport au bras évérolimus monothérapie, et ** par rapport au bras fulvestrant monothérapie.

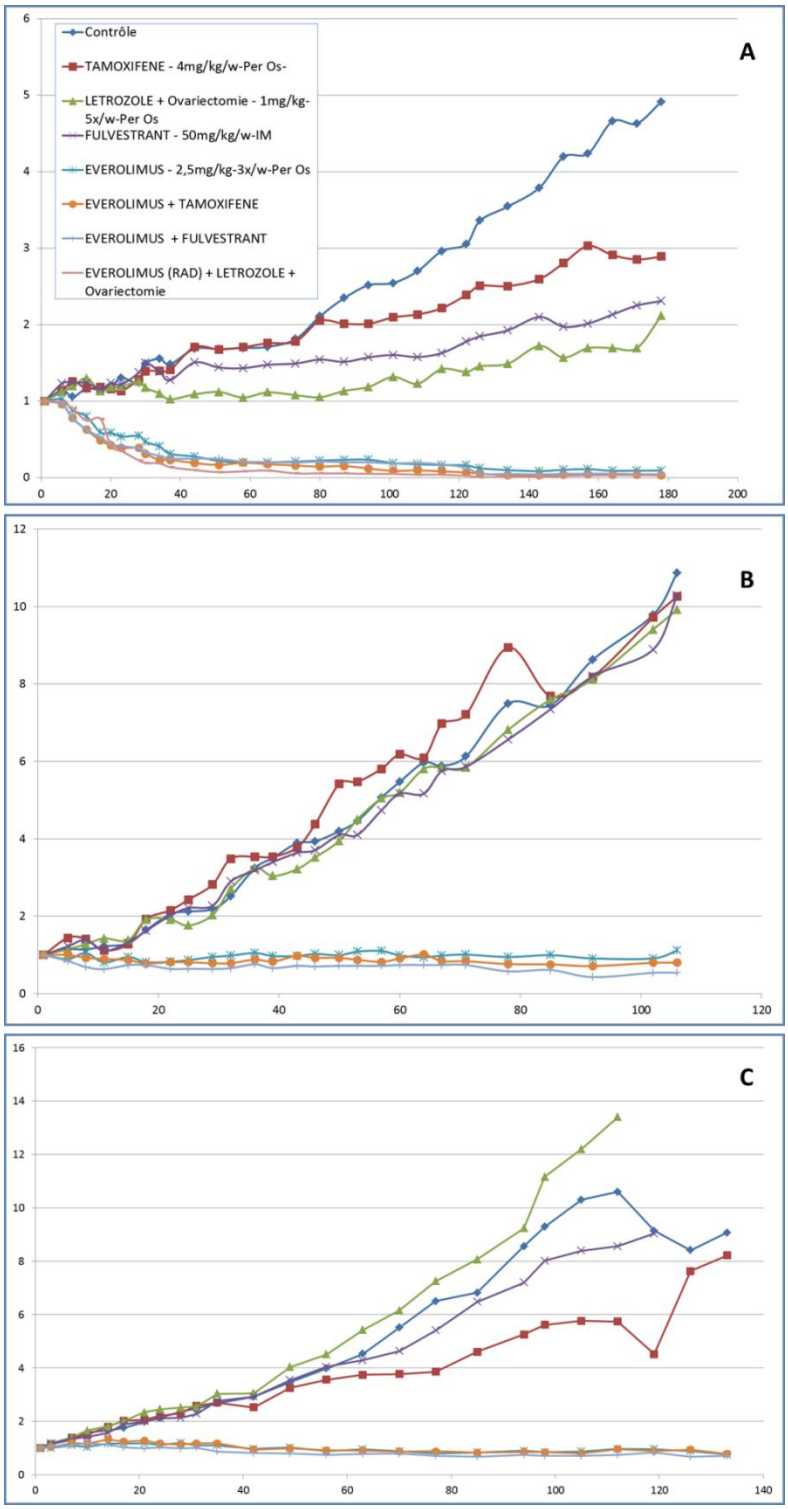


Figure 38. Evaluation de l'évérolimus seul et en combinaison. A. PDX HBCx-22. Les codes couleurs indiquent les bras de traitement, de manière identique pour A, B, C et la figure suivante. B. HBCx22 TamR. C. HBCx-22 OvaR.

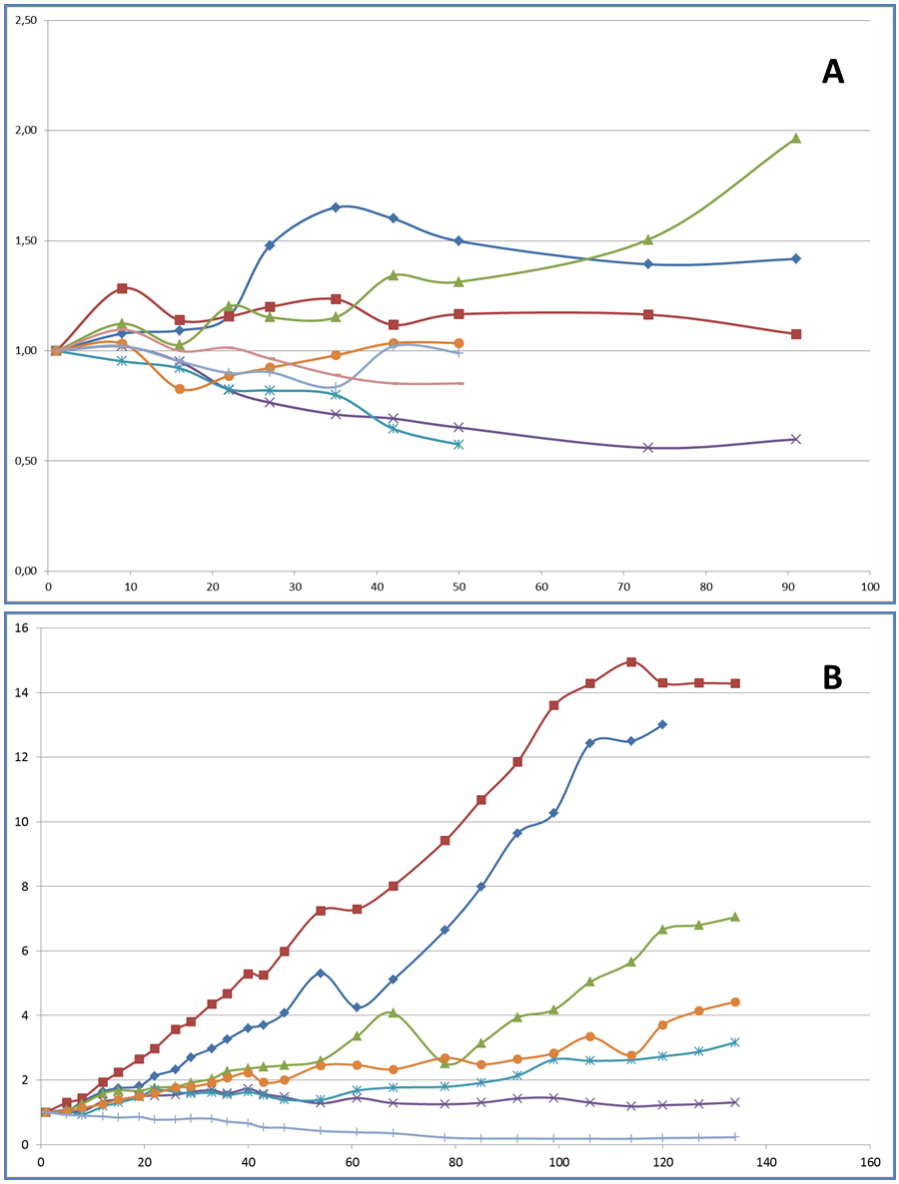


Figure 39. Evaluation de l'évérolimus seul et en combinaison. A : HBCx34 : arrêt précoce de l'expérience en raison de la faible croissance du groupe contrôle. On observe néanmoins une tendance à la régression tumorale dans les bras évérolimus (orange, gris, bleu pâle), et une tendance à l'efficacité supérieure du fulvestrant (violet). B. HBCx34 TamR : les courbes indiquent une résistance spécifique au tamoxifène (rouge), le maintien d'une activité du fulvestrant (violet), et l'effet au minimum additif de la combinaison évérolimus-fulvestrant (gris).

De manière à mieux mettre en évidence l'additivité de la combinaison évérolimus-fulvestrant, une vision détaillée des 3 courbes de traitement de HBCx34 TamR par fulvestrant seul, évérolimus seul et par l'association est présentée dans la figure 40.

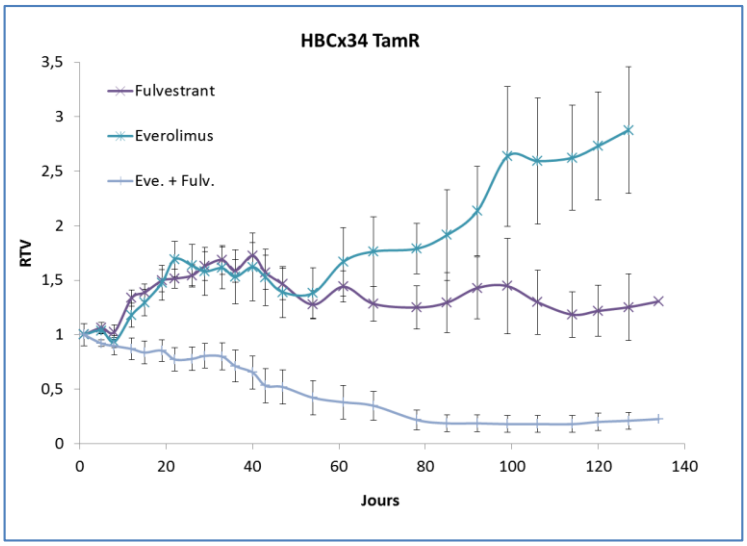


Figure 40. Vue détaillée des traitements de la PDX HBCx-34 TamR par fulvestrant seul, évérolimus seul et par la combinaison évérolimus-fulvestrant. Les barres verticales indiquent les intervalles de confiance de chaque valeur. Les différences sont significatives (voir table TGI supra).

2. ANALYSES PHARMACODYNAMIQUES

De manière à confirmer sur le plan pharmacodynamique les différences de profil d'efficacité observé avec l'évérolimus, nous avons analysé la voie PI3K/mTOR à partir de TMA effectués sur les tumeurs résiduelles après traitement. La table 13 résume les données obtenues par analyse IHC, en mettant l'accent sur le RE, marqueur pharmacodynamique du fulvestrant ; le Ki67, marqueur de prolifération ; la forme phosphorylée de la p70S6kinase (P-S6), marqueur pharmacodynamique de l'évérolimus.

	RE			Ki67			P-S6		
	Ctrl	Fulv.	Fu/Ev	Ctrl	Fulv.	Fu/Ev	Ctrl	Fulv.	Fu/Ev
HBCx-22 TamR									
HBCx-22 OvaR									
HBCx34 TamR									

Table 13. Analyse pharmacodynamique par IHC de l'effet du fulvestrant (Fulv.) et de la combinaison évérolimus-fulvestrant (Fu/Ev) sur les PDX résistantes à l'hormonothérapie conventionnelle. Ctrl : bras contrôle.

Les données visuelles IHC ont été semi-quantifiées par l'établissement d'un phosphoscore pour P-S6 (Table 14).

	HBCx-22 TamR	HBCx-22 OvaR	HBCx-34 TamR
Contrôle	++	++	++
Fulvestrant	++	++	+
Évérolimus	+/-	+/-	+/-
Eve. + Tam	+/-	+/-	+/-
Eve. + Fulv.	-	-	-

Table 14. Phospho-score pour P-S6 dans les différents bras de traitement. L'étude IHC a été pratiquée sur les résidus tumoraux 24h après la dernière administration. Un score « - » indique un pourcentage de cellules marquées ≤ 1%, et « +/- » inférieur ou égal à 10%.

Ces données montrent l'absence d'action du fulvestrant sur HBCx-22 TamR qui est considérée comme ayant développé une hormonorésistance universelle (voir figure 38B) malgré la diminution attendue de l'expression du RE : on n'observe une diminution ni de la prolifération ni de l'expression de P-S6. En revanche, l'introduction de l'évérolimus produit un effet majeur. Les constations sont similaires pour HBCx-22 OvaR. Le profil est différent pour HBCx34 TamR : le fulvestrant seul induit une baisse marquée de la prolifération et de P-S6, encore renforcée par l'adjonction de l'évérolimus. L'effet sur le Ki67 a été confirmé en qRT-PCR (voir article 3). Associées à la quasi extinction de l'expression du RE, ces données suggèrent un effet du fulvestrant sur la voie extra-génomique du RE, avec au minimum un effet additif du blocage de la voie PI3K/mTOR par l'évérolimus.

Au total, ces données pharmacodynamiques confirment les résultats obtenus en termes de régression ou au minimum de stabilisation tumorale dans les 3 modèles de PDX étudiés. Elles soulignent également le caractère original de chaque modèle de PDX résistante à l'hormonothérapie. Une potentielle synergie de l'évérolimus avec le fulvestrant est fortement suggérée dans HBCx-34 TamR.

3. EVALUATION D'INHIBITEURS DE PIK3CA, AKT ET MTOR

Le développement de ces PDX et la publication des premiers résultats (article 3 et annexes 3-4) ont permis de mettre en place des collaborations industrielles. Les travaux sont en cours et ne peuvent être dévoilés à ce stade. Néanmoins, il est possible de résumer les grandes tendances observées en fonction des modèles et des molécules utilisées, qui seront présentées par classe et de manière cryptée pour des raisons de confidentialité (table 15).

	Pan PIK3CA	PIK3CAα	AKT1	mTORC1/C2
Composés « G »	**G1** Effet dose sur PDX sensibles et résistantes Pas de synergie avec le fulvestrant sur HBCx-22 Peu efficace sur HBCx22 TamR	**G2** Effet dose sur les PDX sensibles Peu efficace sur les PDX résistantes		
Composés « N »	**N0** Synergie avec fulvestrant sur HBCx-22	**N9** Tendance à la synergie avec fulvestrant sur HBCx-22		
Composés « A »			**A3** Synergie avec fulvestrant sur HBCx22-OvaR	**A4** Synergie avec fulvestrant sur HBCx22-OvaR

Table 15. Premiers résultats de l'évaluation de l'effet des inhibiteurs de la voie PI3K sur les PDX sensibles et résistantes à l'hormonothérapie. Les noms des composés testés ont été codés pour des raisons de confidentialité.

Plusieurs classes médicamenteuses sont en cours d'évaluation, testant les différents étages de la voie PPI3K/mTOR. Globalement, les inhibiteurs de PIK3CA (spécifiques de PIK3CAα ou non) ont une activité modeste, y compris sur la PDX HBCx-22 porteuse d'une mutation de PI3KR1 et d'une perte de PTEN. La synergie avec le fulvestrant semble plus marquée lorsqu'on utilise des inhibiteurs de la partie basse de la voie.

Partie VI : résumé

- Dans les modèles testés, l'évérolimus est efficace en monothérapie et ne semble pas synergique avec les autres modalités d'HT. Il induit des régressions tumorales durables lorsqu'il est associé au fulvestrant (HBCx-34 TamR).
- L'analyse pharmacodynamique confirme le mode d'action du fulvestrant et de l'évérolimus, et leur synergie possible dans le modèle HBCx-34 TamR.
- Ces modèles peuvent servir de base d'évaluation préclinique des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR.

ARTICLE 3

P. Cottu, I. Bièche, F. Assayag, et al.

Acquired Resistance to Endocrine Treatments Is Associated with Tumor-Specific Molecular Changes in Patient-Derived Luminal Breast Cancer Xenografts

Clin Cancer Res, 2014; 20(16):4314-25

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

Clinical Cancer Research

Cancer Therapy: Preclinical

Acquired Resistance to Endocrine Treatments Is Associated with Tumor-Specific Molecular Changes in Patient-Derived Luminal Breast Cancer Xenografts

Paul Cottu[1,3], Ivan Bièche[2], Franck Assayag[3], Rania El Botty[3], Sophie Chateau-Joubert[9], Aurélie Thuleau[3], Thomas Bagarre[3], Benoit Albaud[4], Audrey Rapinat[4], David Gentien[4], Pierre de la Grange[5], Vonick Sibut[6], Sophie Vacher[2], Rana Hatem[2], Jean-Luc Servely[7,9], Jean-Jacques Fontaine[9], Didier Decaudin[1,3], Jean-Yves Pierga[1], Sergio Roman-Roman[8], and Elisabetta Marangoni[3]

Abstract

Purpose: Patients with luminal breast cancer (LBC) often become endocrine resistant over time. We investigated the molecular changes associated with acquired hormonoresistances in patient-derived xenografts of LBC.

Experimental Design: Two LBC xenografts (HBCx22 and HBCx34) were treated with different endocrine treatments (ET) to obtain xenografts with acquired resistances to tamoxifen (TamR) and ovariectomy (OvaR). PI3K pathway activation was analyzed by Western blot analysis and IHC and responses to ET combined to everolimus were investigated *in vivo*. Gene expression analyses were performed by RT-PCR and Affymetrix arrays.

Results: HBCx22 TamR xenograft was cross-resistant to several hormonotherapies, whereas HBCx22 OvaR and HBCx34 TamR exhibited a treatment-specific resistance profile. PI3K pathway was similarly activated in parental and resistant xenografts but the addition of everolimus did not restore the response to tamoxifen in TamR xenografts. In contrast, the combination of fulvestrant and everolimus induced tumor regression *in vivo* in HBCx34 TamR, where we found a cross-talk between the estrogen receptor (ER) and PI3K pathways. Expression of several ER-controlled genes and ER coregulators was significantly changed in both TamR and OvaR tumors, indicating impaired ER transcriptional activity. Expression changes associated with hormonoresistance were both tumor and treatment specific and were enriched for genes involved in cell growth, cell death, and cell survival.

Conclusions: PDX models of LBC with acquired resistance to endocrine therapies show a great diversity of resistance phenotype, associated with specific deregulations of ER-mediated gene transcription. These models offer a tool for developing anticancer therapies and to investigate the dynamics of resistance emerging during pharmacologic interventions. *Clin Cancer Res; 20(16); 1–12. ©2014 AACR.*

Introduction

At least 70% of breast cancers are classified as estrogen receptor positive (ER^+), commonly called luminal breast cancers (LBC). Interfering with the ER pathway with antiestrogens (e.g., tamoxifen) or estrogen deprivation (e.g., aromatase inhibitors or ovariectomy), decreases mortality from ER^+ breast cancer. However, endocrine treatments (ET) efficacy is limited by intrinsic and acquired resistance (1). The main mechanisms of intrinsic resistance to tamoxifen are lack of expression of ERα and failure to convert tamoxifen to its active metabolite, while acquired resistance to ET has been associated with several mechanisms (2). These include deregulation of ER-associated transcription factors and coactivators, activation of receptor tyrosine kinase signaling, aberrant expression of cell-cycle regulators, increased binding with the activating protein-1 (AP-1) transcription complex, and activation of the stress-activated protein kinase/JNK pathway (1, 2).

The majority of the information on these potential mechanisms has been derived from breast cancer cell lines selected for adaptation to exposure to antiestrogens

Authors' Affiliations: Departments of [1]Medical Oncology and [2]Genetics, Hospital, Institut Curie; [3]Laboratory of Preclinical Investigation, Translational Research Department; [4]Affymetrix Platform, Translational Research Department; [5]Genosplice; [6]Bioinformatics Unit, Inserm U900 Mines ParisTech; [7]INRA, Phase Department; [8]Translational Research Department, Institut Curie, Paris, France; and [9]Pathology Department, National Veterinary School of Alfort, Maisons Alfort, France

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

Corresponding Author: Elisabetta Marangoni, Laboratory of Preclinical Investigation, Translational Research Department, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, Paris 75005, France. Phone: 33153197422; Fax: 33153194130; E-mail: elisabetta.marangoni@curie.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

©2014 American Association for Cancer Research.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

Translational Relevance

Acquired resistance to endocrine therapy occurs with high frequency in patients with luminal breast cancer (LBC). We report here the establishment of four new patient-derived xenografts of LBC with acquired resistance *in vivo* to tamoxifen and estrogen deprivation. Gene expression profiling and *in vivo* drug-response studies showed a great diversity of endocrine resistance phenotypes, associated with tumor-specific deregulations of estrogen receptor (ER)-mediated gene transcription. One tamoxifen-resistant xenograft showed a cross-talk between the ER and PI3 kinase pathways and a high response to the fulvestrant-everolimus combination. These models offer a clinically relevant tool to evaluate anticancer therapies in the context of endocrine resistance and to investigate the dynamics of acquired resistances.

or long-term estrogen deprivation. However, such models identify mechanisms that can induce tamoxifen resistance *in vitro* rather than those that actually mediate resistance in patients with breast cancer, and data obtained from well-controlled experimental conditions may widely differ from what happens in a real tumor (3). *In vivo* models using cell line-derived xenografts have added some value to the biologic analyses of ET resistance, and have been of great help in testing and developing new drugs in this particular setting. It is nonetheless well known that cell line-derived xenografts do not adequately reflect breast cancer heterogeneity or morphology *in vivo* and have poor predictive value with regard to the clinical setting (4). Within this context, our group has established patient-derived xenografts (PDX) models of primary breast cancer of all subtypes of and we have shown, as well as other groups, that breast cancer PDX faithfully recapitulate the morphologic and biologic features of the parental tumors (5, 6).

The analysis of dynamic changes associated with tumor relapse in paired samples before and after resistance would be of great interest from a therapeutic point of view. However, paired primary and metastatic samples are not easily obtained in the current clinical practice, and biopsies from metastasis often yield poor tumor contents. In this report, we describe the establishment of four PDX models with acquired resistance to different ET, derived from two previously described ER^+ breast cancer PDXs. We show that acquired resistance was not associated with ER loss or ESR1 mutations and that the PI3K pathway activation status was similarly activated in sensitive and resistant models. We evaluated the everolimus efficacy in hormono resistant xenografts in combination with various ET modalities and found that each xenograft displayed a specific pattern of response to these agents. Gene expression analyses showed transcriptomic reprogramming which was tumor specific and treatment specific.

Expression changes associated with hormonoresistance were both tumor and treatment specific and were enriched for genes involved in cell growth, cell death, and cell survival.

Materials and Methods

Establishment of xenografts models resistant to ET

HBCx22 and HBCx34 PDX models have been established from untreated early-stage LBC as previously described (7). Both tumor models responded to ET (7). Luminal B status has been established on both patients' tumors and derived xenografts, and assessed on the basis of low PR/high Ki67 expression (7). To establish hormono-resistant models from these xenografts, tumor-bearing mice were treated during 6 to 8 months with different ET, including tamoxifen, fulvestrant, and ovariectomy and letrozole combination. At tumor escape, resistant tumors were re-engrafted in Swiss nude mice for three serial passages and treated with the therapy under which resistance had emerged (Fig. 1A). Resistant xenografts were established when tumors had successfully underwent these three passages, and exhibited a resistance phenotype defined by a tumor growth pattern similar between the control group and the treated group.

In vivo efficacy studies

In vivo efficacy studies with ET were performed in female Swiss nude mice as previously described (7) in accordance with the French Ethical Committee. Everolimus was provided by Novartis Pharma and was administered orally at a dose of 2.5 mg/kg 3 × week. Optimal tumor growth inhibition (TGI) of treated tumors versus controls was calculated as the ratio of the mean relative tumor volume (RTV) in treated group to the mean RTV in the control group at the same time. Statistical significance of TGI was calculated by the paired Student t test by comparing the individual RTVs in the treated and control groups. Kaplan–Meier survival analysis and log-rank tests were used to determine and compare the progression-free survival probability between the different treatments arms for the HBCx34 TamR xenograft.

Morphologic and IHC analyses of tumors

Xenografted tumors were fixed in 10% neutral buffered formalin, paraffin embedded, and hematoxylin–eosin-saffron (H&E) stained. Outgrowths were analyzed by IHC for expression of biomarkers: ERα, Progesterone Receptor (PR), and Ki67 rabbit monoclonal antibodies were purchased from Clinisciences. Phospho-S6, P-mTOR, P-AKT, insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR), and PTEN rabbit antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme). Tissue microarrays (TMA) were built from the *in vivo* efficacy studies as previously described (8). Three xenografts from each treatment group and two tissue cores per tumor were included in the TMA. Tumor sampling from treated xenografts was performed 24 hours after the last

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

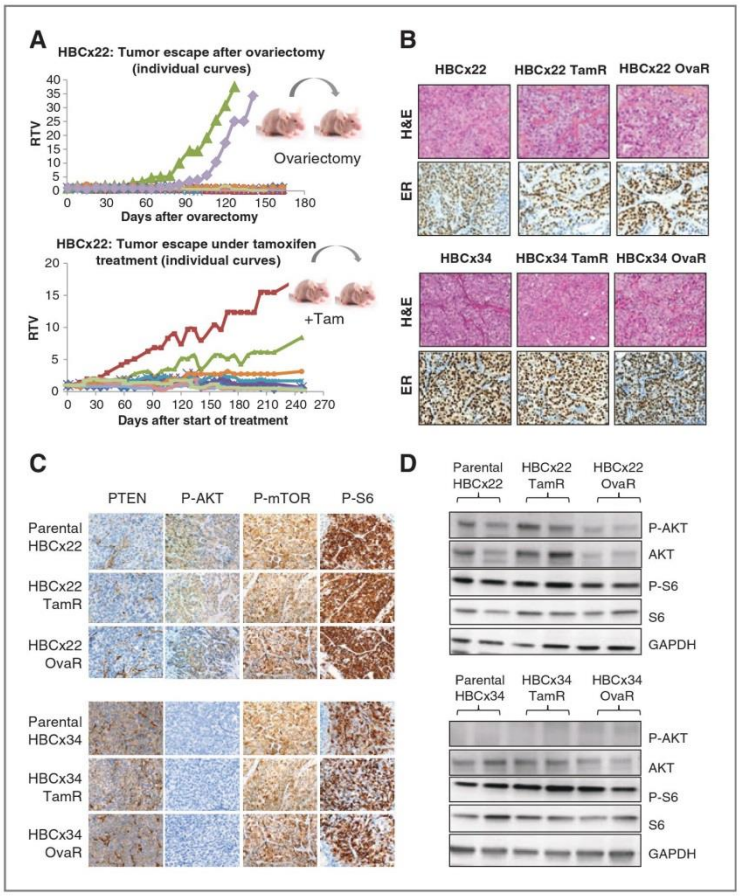


Figure 1. Expression of ER and activation status of the PI3K pathway in parental and resistant xenografts. A, individual tumor growth curves of HBCx22 xenografts under tamoxifen or ovariectomy pressure. Each curve represents tumor growth in a single mouse. B, tumor morphology and ER expression in parental HBCx22 and HBCx34 xenografts and their hormono resistant variants, TamR and OvaR. Magnification, ×20. C, IHC analysis of PI3K markers in untreated TamR, OvaR, and parental tumors (scale bar, 50 μmol/L). D, Western blot analysis of P-AKT, AKT, P-S6, S6, and GAPDH proteins ($n = 2$).

treatment. For Ki67 quantification, 10× pictures were automatically analyzed with the help of AxioVision 4.6.3 Zeiss software measurement tool (Carl Zeiss S.A. S.). The percentage of Ki67-positive cells was quantified by the ratio of Ki67-positive nuclei on total number of nuclei in one field. The Dunnett's multiple comparisons test was used for multiple comparisons. Phosphorylated S6 IHC scores were defined as follow: ++ more than 50% of P-S6 + cells, + between 10% and 50% of P-S6 +cells, ± between 1 and 10%, and − less than 1%.

Western blot analysis

Proteins were extracted as described previously (9). Lysates were resolved on 4% to 12% TGX gels (Bio-Rad), transferred into nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and immunoblotted with rabbit antibodies against GAPDH, AKT, P-AKT, S6, or P-S6 (Cell Signaling Technology). After washes, membranes were incubated with the appropriate secondary antibodies horseradish peroxidase-conjugated affinity-purified goat anti–rabbit (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Interchim).

Real-time RT-PCR

RNA extraction and qRT-PCR were performed as previously described (10, 11). For gene normalization, we used the human TATA box-binding protein (TBP, Genbank accession NM_003194). Detailed protocols for cDNA synthesis, PCR amplifications, and normalizations have been described elsewhere (12).

Mutation screening

Mutations of *PIK3CA* (exons 9 and 20), *PIK3R1* (exons 11–15), *AKT1* (exon 4), and *ERS1* (exons 5, 7, and 8 encoding the recently underlined somatic mutations E380Q, V392I, S463P, P535H, L536R, Y537C/N/S, D538G and R555C; refs. 13) were detected by sequencing

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

of cDNA fragments obtained by RT-PCR amplification. Details of the primers and PCR conditions are available on request. The amplified products were sequenced with the BigDye Terminator Kit on an ABI Prism 3130 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems) with detection sensitivity of 5% mutated cells, and the sequences were compared with the corresponding cDNA reference sequences (PIK3CA NM_006218, PIK3R1 NM_181523, AKT1 NM_005163, ESR1 NM_000125).

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. Arrays were normalized according to the GC-RMA normalization procedure (14). Analyses of array datasets were made using EASANA (GenoSplice technology), normalization, background corrections, and gene annotations were performed as previously described (15). Only genes expressed in at least one compared condition were analyzed. We performed an unpaired Student *t* test to compare gene intensities in the different biologic replicates. Genes were considered significantly regulated when fold-change was ≥ 1.5 and $P \leq 0.05$. The DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Gene Ontology website was used to test the significance of enrichment in specific gene ontology annotations. The identification of biologic functions and the upstream regulator analyses associated with gene expression datasets were conducted by Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems) according to their standard procedures. Raw data files are available from Gene Expression Omnibus under accession number GSE55561.

Results

ER and PI3K pathway status is conserved between sensitive and resistant models

To generate *in vivo* models of endocrine resistance, we used two previously described PDX models of hormono sensitive ER^+ breast cancer, HBCx22 and HBCx34 (7). From each model, we established a tamoxifen-resistant and ovariectomy-resistant xenograft (named HBCx22 TamR, HBCx22 OvaR, HBCx34 TamR, and HBCx34 OvaR), as described in the Materials and Methods section (two examples are shown in Fig. 1A). To compare tumor morphology and ERα expression between sensitive and resistant tumors, we performed H&E and IHC analyses. Tumor morphology was conserved between parental and resistant tumors (Fig. 1B) and IHC analysis showed ER expression was maintained (Fig. 1B). In addition, we sequenced the *ESR1* gene hot spots recently found to be mutated in metastases from patients with advanced ER^+ breast cancer (13). *ESR1* status was found to be wild-type in resistant and responder tumors from both HBCx22 and HBCx34 xenografts (data not shown). As the PI3K/AKT pathway activation has been described as a mechanism of resistance to ET (16, 17), we analyzed the phosphorylation of AKT, mTOR, and S6 and the expression of the tumor suppressor PTEN by IHC and Western blot analysis. The profile of the three HBCx22 tumors was similar, showing no PTEN expression and a similar level of expression of P-AKT, P-mTOR, and P-S6 in the sensitive and in OvaR and TamR tumors (Fig. 1C and D). We also assessed the mutational profile of *PI3KCA*, *PI3KR1* and *AKT1* genes by sequencing analysis. The HBCx22 tumors presented a 24-pb in-frame deletion in the exon 13 of *PIK3R1* (c.1704_1727del), previously shown to activate the PI3K pathway (ref. 18; data not shown). The IHC and Western blot analyses of the HBCx34 xenografts showed PTEN expression and absence of AKT phosphorylation. S6 and mTOR proteins where phosphorylated at similar levels in both parental and resistant tumors (Fig. 1C and D). The status of *PI3KCA*, *PIK3R1*, and *AKT1* genes was found to be wild-type in both parental and resistant xenografts. Overall, these results show that, in these models, hormonoresistance is not associated with ER loss, *ERS1* hotspots mutations, or changes in the activation profile of the PI3K pathway.

Resistance profile is tumor and treatment specific and *in vivo* mTOR targeting by everolimus alone arrests tumor growth in endocrine-resistant tumors

The addition of the mTOR inhibitor everolimus to ET has been successful in the treatment of advanced ER^+ breast cancer (19), but it is unclear whether this combination therapy is synergistic. To further refine the resistance profile of the resistant xenografts, we analyzed the response to ET and everolimus, alone and in combination, in the HBCx22 TamR and OvaR models and the HBCx34 TamR model (Fig. 2A–C, respectively). HBCx22 TamR displayed a lack of response to all ET tested (Fig. 2A), whereas HBCx22 OvaR showed a moderate response to tamoxifen (TGI = 46%; Fig. 2B). The effect of everolimus, alone or combined with ET, in HBCx22 TamR and OvaR was identical, with durable tumor stabilization (TGI = 90%). In contrast, in HBCx34 TamR, resistance to tamoxifen was not associated with resistance to other ET treatments (Fig. 2C). Treatment by everolimus alone or combined to tamoxifen resulted in long-term tumor stabilization, whereas combination of everolimus with fulvestrant resulted in tumor regressions (Fig. 2C). Statistical significances of TGI are provided in Supplementary Table S1.

A Kaplan–Meier analysis of tumor progression demonstrated that control and everolimus arms had a significantly shorter progression-free survival than the fulvestrant and fulvestrant-everolimus arms (log-rank test, $P = 0.0002$; Fig. 2D). Moreover, the fulvestrant-everolimus combination yielded a significantly higher rate of complete responses than fulvestrant alone (55.5% vs. 0, $P = 0.034$ by the Fisher exact test) and this benefit remained significant at 127 days (log-rank test, $P = 0.024$). Although synergism cannot be readily confirmed without dose response *in vivo* studies, these results strongly underline the high potency of the fulvestrant-everolimus combination in this particular setting.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

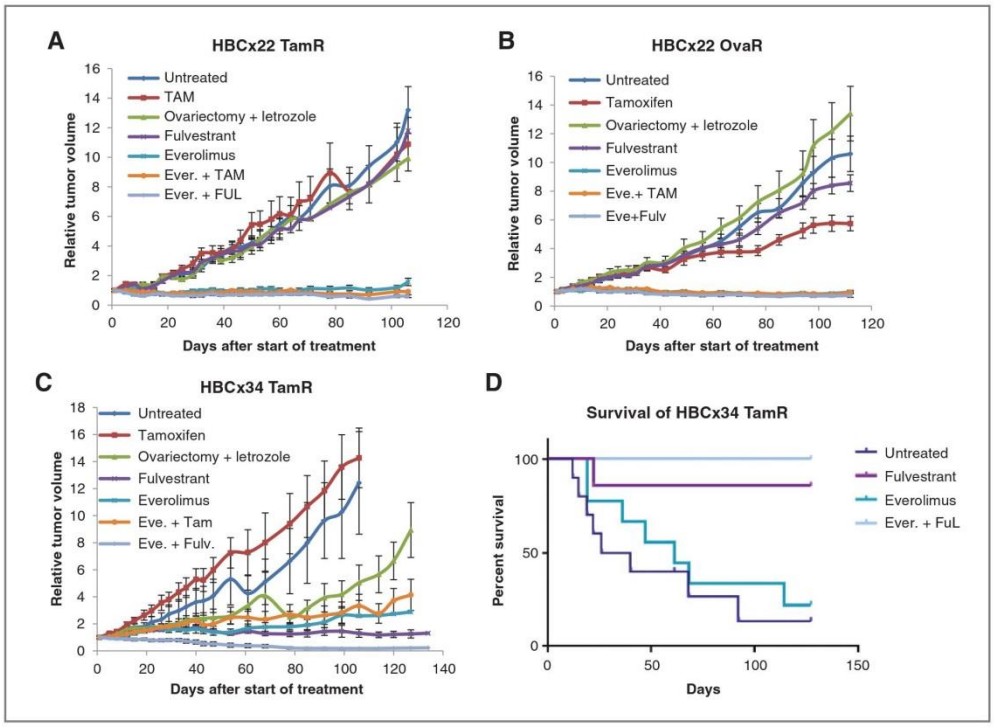


Figure 2. *In vivo* drug response to ET, everolimus alone, and combined to ET in hormono resistant tumors. A, effect of tamoxifen (Tam), estrogen deprivation (ovariectomy + letrozole), fulvestrant, everolimus, everolimus+tamoxifen (Ever. + Tam), and everolimus + fulvestrant (Ever. + Fulv.) on HBCx22 TamR tumor growth. Each treatment group included 10 mice, *y*-axis indicates the mean of RTV ± SD. B, effect of ET and everolimus in HBCx22 OvaR. C, effect of ET and everolimus HBCx34 TamR. Statistical significances of TGI were calculated by the paired Student *t* test and are provided in Supplementary Table S1. D, Kaplan–Meier survival analysis of HBCx34 TamR xenografts (untreated, fulvestrant, everolimus and fulvestrant + everolimus-treated groups). $P = 0.0002$ (Wilcoxon test); $P < 0.001$ (log-rank test). $N = 9$.

To analyze protein expression changes in treated tumors, tumors were included in TMA and IHC analyses were performed with the following antibodies: ER, PR, Ki67, P-AKT, P-mTOR, and P-S6. Representative sections from tumors corresponding to experiment shown in Fig. 2A (HBCx22 TamR) are illustrated in Fig. 3A. ER expression was decreased in the fulvestrant-treated groups, consistent with fulvestrant mode of action inducing ER degradation (20). P-AKT and P-mTOR were not affected by treatments, whereas the phosphorylation of S6 was strongly decreased in the everolimus-treated groups (Fig. 3A). Representative sections from tumors corresponding to experiment shown in Fig. 2C (HBCx34 TamR) are illustrated in Fig. 3B. Interestingly, in this tumor, P-S6 and P-mTOR were inhibited by fulvestrant alone. P-S6 expression was also decreased in the everolimus-treated group and completely abolished in tumors treated by fulvestrant and everolimus. Representative sections of tumors corresponding to HBCx22 OvaR are illustrated in the Supplementary Fig. S1. Phospho-S6 intensity scores are provided in Supplementary Table S2.

Quantifications of Ki67 expression are shown in Fig. 3C. Overall, there was a good correlation between Ki67 expression and tumor growth *in vivo*, with the exception of the tamoxifen-treated group in the HBCx34 TamR xenograft, which did not respond to treatment in term of tumor growth, but showed a significant decrease in the number of Ki67-positive cells.

In summary, these results show that each tumor displayed a specific profile in term of hormonoresistance and response to treatment combinations. The fulvestrant–everolimus combination induced tumor regressions in one tamoxifen-resistant tumor.

ER transcriptional activity is impaired in endocrine therapy-resistant tumors

To investigate the transcriptional activity of ER, we performed RT-PCR and IHC analyses of *IGF-1R* and *PR* genes whose expression is regulated by ER (Fig. 4A). IGF-IR mRNA expression was decreased in both the HBCx22 OvaR and TamR models when compared with HBCx22 parental

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

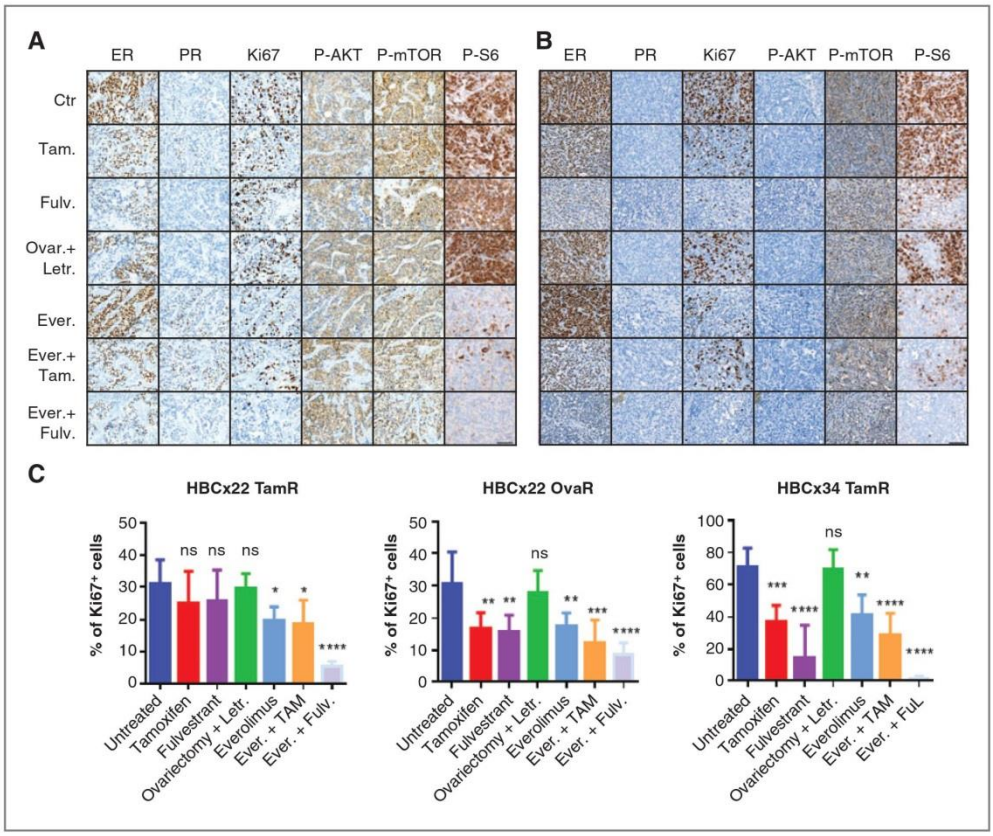


Figure 3. IHC analysis of treated tumors (scale bar = 50 μmol/L). A, representative sections of TMA obtained from therapeutic experiments on HBCx22 TamR and (B) representative sections of TMA obtained from therapeutic experiments on HBCx34 TamR. Ctr., control; Tam., tamoxifen; Fulv., fulvestrant; Ova., ovariectomy; Letr., letrozole; Ever., everolimus. C, percentage of Ki-67–positive cells determined from IHC staining in TMAs from experiments shown in Fig. 2, $n = 6$, mean ± SD. The Dunnett's multiple comparisons test was used to determine statistical significance of Ki-67 expression differences in treated versus untreated tumors. ns: $P > 0.05$; *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$.

tumor. This pattern was also observed to a lesser extent in the HBCx34 OvaR tumor, but not in the HBCx34 TamR tumor. The PR gene mRNA expression was significantly decreased in the HBCx22 TamR model and in both HBCx34 OvaR and TamR xenografts. IHC analyses confirmed very low levels of PR protein expression and a decrease in the IGF-IR protein expression in the HBCx22 resistant tumors but not in the HBCx34 models, where IGF-IR expression was higher. We also observed a decreased expression of MYB in the four resistant models (data not shown). We next analyzed the gene expression level of the ER coregulators FOXA1, GATA3, PBX1, and GREB1 (Fig. 4B). In the HBCx22 model, FOXA1 and PBX1 genes were repressed in the OvaR but not in the TamR tumor. GATA3 showed no significant variations. In contrast, the HBCx34 xenograft showed an expression increase of these three genes in the TamR tumors. Finally, the expression of GREB1, an ER regulatory factor, was strongly decreased in HBCx22 TamR, HBCx34 TamR, and HBCx34 OvaR (Fig. 4C).

Overall, these results suggest that ER transcriptional activity might be impaired in hormono resistant tumors.

Acquired resistance to hormonotherapies is associated with specific gene expression changes involving multiple biologic processes

To identify dynamic gene expression changes associated with endocrine resistance, sensitive and resistant tumors were profiled with gene expression array. The complete lists of genes differentially expressed in HBCx22 TamR, OvaR and HBCx34 TamR, OvaR tumors compared with parental xenografts are reported in Supplementary Tables S3–S6, respectively. The Venn diagrams generated with the 4-gene

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

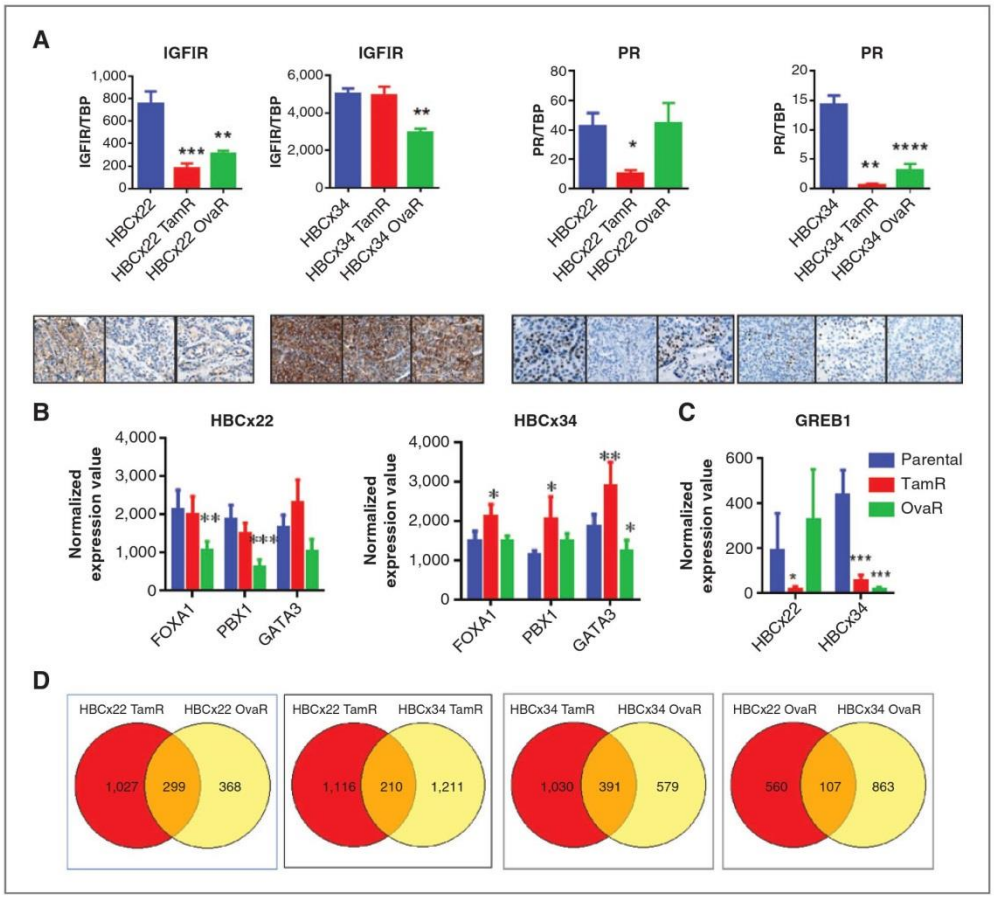


Figure 4. Expression analyses of hormono resistant tumors. A, IGF-IR and PR gene and protein expression in untreated TamR and OvaR tumors compared with parental xenografts determined by RT-PCR and IHC analyses. $n = 5$, mean ± SD. Statistical significance is measured by Student *t* test. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$. B, expression of FOXA1, GATA3, PBX1, and (C) GREB1 genes determined by RT-PCR ($n = 5$), in HBCx22 and HBCx34 parental, TamR, and OvaR tumors. $n = 5$, mean ± SD. D, Venn diagrams representing overlapping genes between resistance modalities and tumor models.

lists showed that genes deregulated in TamR and OvaR tumors were only partially overlapping in both HBCx22 and HBCx34 xenografts, indicating treatment-specific gene deregulations (Fig. 4D). In addition, TamR and OvaR signatures were tumor specific, with only 210 and 107 genes commonly deregulated, respectively (Fig. 4D).

The biologic processes (BP) corresponding to genes specifically deregulated in TamR and OvaR tumors are represented in Supplementary Tables S3–S6. In HBCx22 TamR tumors, the top biologic processes were response to wounding and response to hormone stimulus, including estrogen and steroid hormones, and processes associated with wound healing and inflammation, regulation of cell proliferation, and response to TGF-β signaling. In HBCx34 TamR, the top biologic processes were related to vitamin and nucleotide biosynthesis and regulation of phosphate metabolism (Supplementary Table S5). The top biologic processes of HBCx22 OvaR were nitrogen compound and nucleotide metabolism and antigen processing, while the HBCx34 OvaR top biologic processes included cell adhesion, response to vitamin, and intracellular signaling cascades (Supplementary Table S6). To identify upstream regulators of the gene expression changes, we performed an Upstream Regulator Analysis with the Ingenuity Software. Several transcription factors were predicted to be activated in the HBCx22 Tam-R tumors, including NFKB1, ETS1, Ap1, SP1, STAT3, and CEBPB (Supplementary Table S7). In the HBCx34 TamR

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

Table 1. Top molecular and cellular functions identified by Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Category	*P*	# Molecules
HBCx22 TamR		
Cellular movement	6.87E−11–1.09E−02	192
Cellular growth and proliferation	9.61E−09–1.11E−02	301
Lipid metabolism	2.34E−07–1.08E−02	112
Small-molecule biochemistry	2.34E−07–1.08E−02	138
Cell-to-cell signaling and interaction	2.62E−07–1.1E−02	140
HBCx22 OvaR		
Cell death and survival	2E−05–3.41E−02	120
Cellular growth and proliferation	5.71E−04–3.41E−02	142
Cellular assembly and organization	1.16E−03–3.41E−02	30
DNA replication, recombination, and repair	1.16E−03–3.41E−02	21
Molecular transport	1.16E−03–3.41E−02	28
HBCx34 TamR		
Cellular movement	2.75E−06–1.91E−02	173
Cellular development	6.9E−06–1.83E−02	217
Cellular growth and proliferation	6.9E−06–1.81E−02	281
Cell death and survival	2.92E−05–1.79E−02	274
Drug metabolism	3.32E−05–1.64E−02	15
HBCx34 OvaR		
Cell death and survival	8.51E−08–3.3E−02	209
Cellular development	2.15E−06–3.3E−02	197
Cellular growth and proliferation	2.15E−06–3.3E−02	210
Cell cycle	9.02E−06–3.26E−02	87
Cellular compromise	2.41E−05–2.4E−02	15

NOTE: *P* values are calculated by the Fisher exact test.

gene dataset, the upstream regulators BACH1 and FOXA1 were predicted to be activated.

Overall, these results indicate that ET resistance is associated with tumor-specific and treatment-specific gene expression signatures, involving multiple biologic processes.

Hormonoresistance is associated with expression modifications of genes related to cell cycle, apoptosis, and ERBB receptors

We next analyzed the molecular and cellular functions of the gene signatures with the Ingenuity Software. The lists of top five molecular and cellular functions with their respective scores are shown in Table 1. "Cellular growth and proliferation" were in the top five lists of altered function in both TamR and OvaR tumors and "cell death and survival" were the most altered functions of OvaR tumors. To further validate these findings, we performed an RT-PCR expression analysis of several genes included in these categories and significantly modulated in at least one gene expression dataset. The expression of *ERBB4* gene was upregulated in three out of four tumors, and the HBCx34 TamR showed a concomitant upregulation of *ERBB2*, *ERBB3*, and *ERBB4* genes (Fig. 5). Several genes associated with cellular proliferation were changed, the gene expression of *MKI67*, *WEE1*, and *CDC25B* were increased in the HBCx34 TamR. Finally, we found expression changes in genes associated with cell death and cell survival functions, such as *BCLXL*, *BCL2*, and *BBC3* (*PUMA*). In summary, the molecular changes occurring in hormono resistant impair the expression of several genes associated with cell proliferation, cell death and survival, including some targetable genes such as *WEE1* and *ERBB3*.

Discussion

We report here the analysis of four original hormono resistant models, obtained from two ER^+ breast cancer PDX, which have been rendered resistant to multiple modalities of ET, thus mimicking common clinical settings (21). Multiple resistances emerged from a single tumor, when challenged with different treatments (tamoxifen and estrogen deprivation). The resistance phenotype was specific of both the original tumor and the treatment modality under which resistance appeared. HBCx22 TamR tumor exhibited a general resistance to ET, whereas HBCx22 OvaR retained an intermediate sensitivity to tamoxifen. Conversely, resistance to tamoxifen was not associated with a universal endocrine resistant phenotype, as suggested by the different drug–response profiles of HBCx22 TamR and HBCx34 TamR. This is consistent with clinical observations where

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

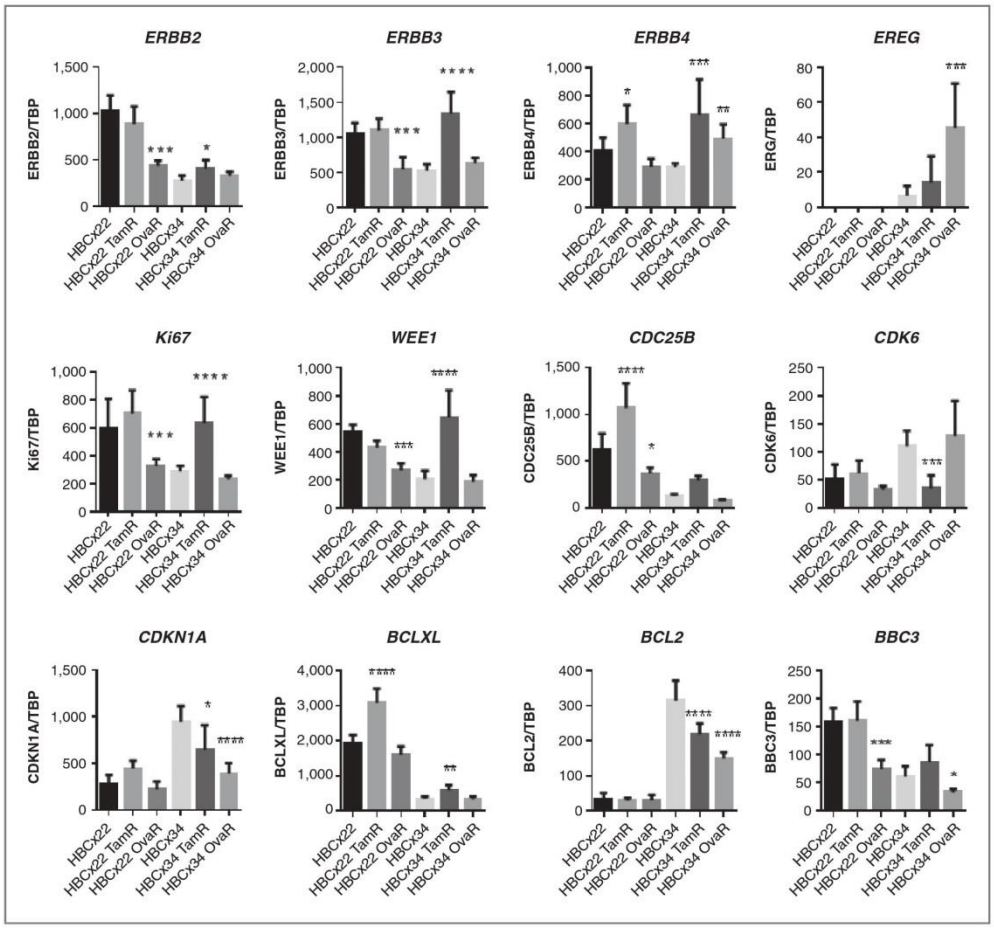


Figure 5. RT-PCR analysis of selected genes related to ERBB receptors, cell growth, and cell death functions. $n = 5$, mean ± SD. Statistical significance is measured by the Student t test. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$.

patients resistant to a given class of drug may still benefit from alternate ET (21, 22), while ER expression is generally highly conserved in distant metastases (23, 24). Li and colleagues recently identified *ESR1* mutations in metastases of advanced ER^+ breast cancer (13). The fact that we did not find such mutations in TamR and OvaR tumors, suggests the existence of other mechanisms of resistance in these PDX. A potential mechanism of endocrine resistance is aberrant signaling through the PI3K signaling pathway (17, 25). Preclinical studies have shown that breast cancer cells with upregulated AKT signaling are resistant to ET, but sensitivity may be restored by treatment with mTOR inhibitors (26, 27). However, no clinical study has demonstrated that secondary resistance to ET is associated with increased PI3K signaling in patients, and synergy between ET and everolimus has not been demonstrated in patient's tumors. The recent clinical studies showing that everolimus is beneficial to patients displaying acquired ET resistance (19) did not evaluate the efficacy of everolimus alone, which could spare the patient's additional ET-related side effects. The finding that phosphorylation of mTOR and S6 was constitutively high in both parental and hormono resistant tumors, suggests that activation of the AKT/mTOR pathway is not the predominant mechanism of endocrine resistance in these tumors. This is in line with recent genomic studies showing that tumors harboring *PI3KCA* mutations were not resistant to tamoxifen and had a good clinical prognosis (28, 29). Our results show that mTOR

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

targeting has antiproliferation effect *per se* without restoring tamoxifen sensitivity in TamR tumors. A lack of synergy between tamoxifen and everolimus has been also reported in the MCF-7 cell line (30). However, HBCx34 TamR tumor still responded to fulvestrant and combination with everolimus resulted in a marked tumor regression. Interestingly, the IHC analysis of treated tumors showed that fulvestrant alone induced a marked decrease of P-S6. As fulvestrant directly induces ER degradation (20), decrease of P-S6 in fulvestrant-treated tumors indicates that there is a cross-talk between the ER and PI3K/AKT pathways in this tumor. Preclinical *in vitro* data also suggest a synergism between fulvestrant and the PI3K pathway inhibition in cells with an activated PI3K pathway which has also retained ER expression (17). Results obtained with the HBCx34 TamR xenograft confirm these observations. Fulvestrant has also been used in advanced ET-resistant patients with some efficacy (31). Combinations studies are only beginning in the clinic and our data bring a further preclinical rationale.

The expression analysis of ER-dependent genes indicated that ER transcriptional activity is impaired in TamR and OvaR tumors, despite persistence of ER expression. Loss of PR and other ER target genes expression has been consistently associated with loss of sensitivity to tamoxifen in clinical cohorts (32). Disrupting ER signaling in resistant tumors has also been found *in vitro* and associated with an increase in promoter DNA-methylation of these genes (33). Epigenetic silencing of ER-responsive genes is conserved on the long term, and most probably involves negative regulators of proliferation. Epigenetic modifications and alterations of chromatin may contribute to ET resistance by altering ERα transcriptional activity and inducing a switch from classical ERα signaling to other signaling pathways through estrogen-responsive elements (34). In this process, several pioneer factors can dynamically modulate chromatin openness in breast cancer cells (35). Among the known pioneer factors contributing to the estrogen response, FOXA1, GATA3, and PBX1 seem to play a role in ET resistance (36–38). In the HBCx34 TamR tumor, FOXA1 and GATA3 expression was increased, supporting the possibility of an epigenetic origin of the generalized ET resistance in this tumor. It has been demonstrated that FOXA1 actively contributes to ERα recruitment on the chromatin in metastatic breast tumors, suggesting that FOXA1 may promote ET resistance in breast cancer (39). PBX1 expression was increased in both HBCx34 TamR and OvaR tumors in comparison with sensitive counterparts. PBX1 expression has been shown to be higher in ERα-positive breast cancer that performs poorly over time and its target genes define an expression signature predictive of resistance to endocrine therapies (36). In contrast with FOXA1 and PBX1, GREB1 expression was strongly decreased in both HBCx22 TamR and HBCx34 TamR tumors. GREB1 is a chromatin-bound ER coactivator, essential for ER-mediated transcription and expressed in tamoxifen-responding tumors (40). In the HBCx22 tumor, ET resistance was not associated with increased expression of FOXA1, PBX1, and GATA3. The analysis of HBCx22 TamR gene expression dataset suggests activation of several transcription factors, including NFKB1, ETS1, AP-1, SP1, STAT3, and CEBPB. Interestingly all of them have been associated with endocrine resistance. AP-1, SP1, or NFKB can interact with ERα to activate transcription of additional genes lacking estrogen response elements (41). NF-κB activation has been associated with tamoxifen resistance in the clinic (42) and ETS transcription factors recruit nuclear receptor coactivators to estrogen-responsive genes, thus leading to hormone-independent growth and resistance to hormone-based therapies (43). Differentially expressed genes were found to be very partially overlapping between tumors and treatments, suggesting that transcriptional reprogramming is both tumor and treatment specific. These observations are consistent with a previous work showing the existence of gene expression signatures specific to tamoxifen resistance and letrozole resistance in MCF-7 cells, mainly involving ER-responsive genes (44). These data have been confirmed on MCF7 xenografts studies which also suggested specific gene expression profiles according to the resistance context, involving ER target genes as well as FOX family genes (3). Gene expression data obtained from clinical series of tamoxifen-treated patients confirmed a potential poor predictive value of a high expression of CXCL or SERPIN genes from which, we also identified in the TamR tumors (45). A parallel dynamic assessment was also performed in a small series of 15 letrozole-resistant patients, again pointing out the role of ER-responsive and proliferation genes in ET resistance, with striking individual variations (46). Among the genes differentially regulated in hormono resistant tumors, we found an increased expression of *ERBB3* and *ERBB4*, whose expression has been associated with hormonoresistance (47). Additional *in vivo* experiments will be necessary to determine whether targeting ERBB receptors could restore tamoxifen response or increase the antitumor activity of fulvestrant in the HBCx34 TamR xenograft. A number of genes involved in cell growth, cell death, and cell-cycle control were modulated in hormono resistant tumors; these biologic functions have been frequently associated with endocrine resistance both *in vitro* and *in vivo* (2, 48, 49). In patients, cell cycle, cell growth, and cell survival signatures are independent predictors of outcome in tamoxifen-treated patients (50). Our data provide further evidence that acquisition of endocrine resistance is associated with deregulations of cell survival and cell death functions in patient-derived samples.

In summary, our data indicate that molecular changes associated with acquired ET resistance are both tumor and treatment specific, and that alternative therapeutic modalities in hormono resistant patient should be considered on an individual clinical and biologic basis. As the data obtained here have been generated from only two tumors, further validations using more PDX and clinical cohorts are needed to validate our results. We believe that these models will help enriching the biologic data associated with hormonoresistance in human breast cancer, and may serve as predictive tools to evaluate the efficacy of new drugs and drug combinations in the context of endocrine resistance.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: P. Cottu, F. Assayag, S. Roman-Roman, E. Marangoni
Development of methodology: P. Cottu, I. Bièche, F. Assayag, R. El Botty, A. Thuleau, T. Bagarre, S. Vacher, R. Hatem, E. Marangoni
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): P. Cottu, I. Bièche, F. Assayag, S. Chateau-Joubert, A. Thuleau, T. Bagarre, B. Albaud, A. Rapinat, D. Gentien, S. Vacher, R. Hatem, J.L. Servely, J.-J. Fontaine, D. Decaudin
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): P. Cottu, I. Bièche, F. Assayag, S. Chateau-Joubert, A. Thuleau, T. Bagarre, P. de la Grange, V. Sibut, S. Vacher, R. Hatem, J.L. Servely, S. Roman-Roman, E. Marangoni
Writing, review, and/or revision of the manuscript: P. Cottu, I. Bièche, F. Assayag, R. El Botty, S. Chateau-Joubert, J.-J. Fontaine, D. Decaudin, S. Roman-Roman, E. Marangoni
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): P. Cottu, F. Assayag, A. Thuleau, T. Bagarre, D. Decaudin, J.-Y. Pierga
Study supervision: P. Cottu, F. Assayag, J.-Y. Pierga, S. Roman-Roman, E. Marangoni

Acknowledgments

The authors thank Novartis for providing everolimus and Marie-Eglantine Dujaric and Lisa Belin from Institut Curie Biostatistics Department for their help in the statistical analyses.

Grant Support

This work was also supported by Institut Curie – Institut Carnot Grant #2012-010.

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 26, 2013; revised May 5, 2014; accepted May 29, 2014; published OnlineFirst June 19, 2014.

References

1. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. Endocr Relat Cancer 2004;11:643–58.
2. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. Nat Rev Cancer 2009;9:631–43.
3. Creighton CJ, Massarweh S, Huang S, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Osborne CK, et al. Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. Cancer Res 2008;68:7493–501.
4. Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the *in vitro* cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. Clin Cancer Res 2003;9:4227–39.
5. 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.
6. Landis MD, Lehmann BD, Pietenpol JA, Chang JC. Patient-derived breast tumor xenografts facilitating personalized cancer therapy. Breast Cancer Res 2013;15:201.
7. 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.
8. Romanelli A, Clark A, Assayag F, Chateau-Joubert S, Poupon MF, Servely JL, et al. Inhibiting aurora kinases reduces tumor growth and suppresses tumor recurrence after chemotherapy in patient-derived triple-negative breast cancer xenografts. Mol Cancer Ther 2012;11: 2693–703.
9. Marty B, Maire V, Gravier E, Rigaill G, Vincent-Salomon A, Kappler M, et al. Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. Breast Cancer Res 2008;10:R101.
10. Reyal 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. 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.
12. Tozlu S, Girault I, Vacher S, Vendrell J, Andrieu C, Spyratos 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.
13. Li S, Shen D, Shao J, Crowder R, Liu W, Prat A, et al. Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. Cell Rep 2013;4: 1116–30.
14. Wu Z, Irizarry RA, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F. A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. J Am Stat Assoc 2004;99:909–17.
15. Gandoura S, Weiss E, Rautou PE, Fasseu M, Gustot T, Lemoine F, et al. Gene- and exon-expression profiling reveals an extensive LPS-induced response in immune cells in patients with cirrhosis. J Hepatol 2013;58:936–48.
16. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. Clin Cancer Res 2004;10:331S–6S.
17. Sanchez CG, Ma CX, Crowder RJ, Guintoli T, Phommaly C, Gao F, et al. Preclinical modeling of combined phosphatidylinositol-3-kinase inhibition with endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer. Breast Cancer Res 2011;13:R21.
18. Cheung LW, Hennessy BT, Li J, Yu S, Myers AP, Djordjevic B, et al. High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. Cancer Discov 2011;1:170–85.
19. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA III, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. N Engl J Med 2012;366:520–9.
20. Howell A. Fulvestrant ('Faslodex'): current and future role in breast cancer management. Crit Rev Oncol Hematol 2006;57:265–73.
21. Pritchard KI, Gelmon KA, Rayson D, Provencher L, Webster M, McLeod D, et al. Endocrine therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive her2-negative advanced breast cancer after progression or recurrence on nonsteroidal aromatase inhibitor therapy: a Canadian consensus statement. Curr Oncol 2013;20:48–61.
22. Lonning PE. Clinico-pharmacological aspects of different hormone treatments. Eur J Cancer 2000;36 Suppl 4:S81–2.
23. Calcagno F, Nguyen T, Dobi E, Villanueva C, Curtit E, Kim S, et al. Safety and efficacy of cabazitaxel in the docetaxel-treated patients with hormone-refractory prostate cancer. Clin Med Insights Oncol 2013;7:1–12.
24. Hoefnagel LD, van de Vijver MJ, van Slooten HJ, Wesseling P, Wesseling J, Westenend PJ, et al. Receptor conversion in distant breast cancer metastases. Breast Cancer Res 2010;12:R75.
25. Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. Annu Rev Med 2011;62:233–47.
26. deGraffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH, Donzis EJ, Middleton AK, Silva JM, et al. Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity. Clin Cancer Res 2004;10:8059–67.
27. Beeram M, Tan QT, Tekmal RR, Russell D, Middleton A, DeGraffenried LA. Akt-induced endocrine therapy resistance is reversed by inhibition of mTOR signaling. Ann Oncol 2007;18:1323–8.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

Published OnlineFirst June 19, 2014; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3230

28. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. Nature 2012;486:400–4.
29. Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. Nature 2012;486:353–60.
30. Martin LA, Pancholi S, Farmer I, Guest S, Ribas R, Weigel MT, et al. Effectiveness and molecular interactions of the clinically active mTORC1 inhibitor everolimus in combination with tamoxifen or letrozole *in vitro* and *in vivo*. Breast Cancer Res 2012;14:R132.
31. Di Leo A, Jerusalem G, Petruzelka L, Torres R, Bondarenko IN, Khasanov R, et al. Results of the CONFIRM phase III trial comparing fulvestrant 250 mg with fulvestrant 500 mg in postmenopausal women with estrogen receptor-positive advanced breast cancer. J Clin Oncol 2010;28:4594–600.
32. Ignatiadis M, Sotiriou C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. Nat Rev Clin Oncol 2013;10:494–506.
33. Stone A, Valdes-Mora F, Gee JM, Farrow L, McClelland RA, Fiegl H, et al. Tamoxifen-induced epigenetic silencing of oestrogen-regulated genes in anti-hormone resistant breast cancer. PLoS ONE 2012;7:e40466.
34. Magnani L, Stoeck A, Zhang X, Lanczky A, Mirabella AC, Wang TL, et al. Genome-wide reprogramming of the chromatin landscape underlies endocrine therapy resistance in breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:E1490–9.
35. Jozwik KM, Carroll JS. Pioneer factors in hormone-dependent cancers. Nat Rev Cancer 2012;12:381–5.
36. Magnani L, Ballantyne EB, Zhang X, Lupien M. PBX1 genomic pioneer function drives ERalpha signaling underlying progression in breast cancer. PLoS Genet 2011;7:e1002368.
37. Mehta RJ, Jain RK, Leung S, Choo J, Nielsen T, Huntsman D, et al. FOXA1 is an independent prognostic marker for ER-positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2012;131:881–90.
38. Theodorou V, Stark R, Menon S, Carroll JS. GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility. Genome Res 2013;23:12–22.
39. Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, Holmes KA, Ali HR, Dunning MJ, et al. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. Nature 2012;481:389–93.
40. Mohammed H, D'Santos C, Serandour AA, Ali HR, Brown GD, Atkins A, et al. Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. Cell Rep 2013;3:342–9.
41. Hervouet E, Cartron PF, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. Epigenetics 2013;8:237–45.
42. Zhou Y, Yau C, Gray JW, Chew K, Dairkee SH, Moore DH, et al. Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. BMC Cancer 2007; 7:59.
43. Kalet BT, Anglin SR, Handschy A, O'Donoghue LE, Halsey C, Chubb L, et al. Transcription factor Ets1 cooperates with estrogen receptor alpha to stimulate estradiol-dependent growth in breast cancer cells and tumors. PLoS ONE 2013;8:e68815.
44. Masri S, Phung S, Wang X, Wu X, Yuan YC, Wagman L, et al. Genome-wide analysis of aromatase inhibitor-resistant, tamoxifen-resistant, and long-term estrogen-deprived cells reveals a role for estrogen receptor. Cancer Res 2008;68:4910–8.
45. Mihaly Z, Kormos M, Lanczky A, Dank M, Budczies J, Szasz MA, et al. A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2013;140:219–32.
46. Miller WR, Larionov A. Changes in expression of oestrogen regulated and proliferation genes with neoadjuvant treatment highlight heterogeneity of clinical resistance to the aromatase inhibitor, letrozole. Breast Cancer Res 2010;12:R52.
47. Hutcheson IR, Goddard L, Barrow D, McClelland RA, Francies HE, Knowlden JM, et al. Fulvestrant-induced expression of ErbB3 and ErbB4 receptors sensitizes oestrogen receptor-positive breast cancer cells to heregulin beta1. Breast Cancer Res 2011; 13:R29.
48. Becker M, Sommer A, Kratzschmar JR, Seidel H, Pohlenz HD, Fichtner I. Distinct gene expression patterns in a tamoxifen-sensitive human mammary carcinoma xenograft and its tamoxifen-resistant subline MaCa 3366/TAM. Mol Cancer Ther 2005;4:151–68.
49. Roberts CG, Millar EK, O'Toole SA, McNeil CM, Lehrbach GM, Pinese M, et al. Identification of PUMA as an estrogen target gene that mediates the apoptotic response to tamoxifen in human breast cancer cells and predicts patient outcome and tamoxifen responsiveness in breast cancer. Oncogene 2011;30:3186–97.
50. Musgrove EA, Sergio CM, Loi S, Inman CK, Anderson LR, Alles MC, et al. Identification of functional networks of estrogen- and c-Myc-responsive genes and their relationship to response to tamoxifen therapy in breast cancer. PLoS ONE 2008;3:e2987.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on August 11, 2014. © 2014 American Association for Cancer Research.

VII. DISCUSSION GENERALE

La résistance aux traitements endocriniens est une question clinique et biologique majeure en cancérologie mammaire. La définition de l'hormonorésistance est essentiellement clinique[5], et la quasi-totalité des paramètres histo-biologiques analysés en routine comme les marqueurs de prolifération, ou les signatures génomiques, sont avant tout pronostiques. Il n'a pas été possible à partir des cohortes cliniques de mettre en évidence un profil de sensibilité incontesté à une modalité d'HT donnée. Il est néanmoins avéré que le récepteur aux œstrogènes en particulier sous sa forme REα joue un rôle central dans la sensibilité à l'HT. En clinique, le niveau d'expression du REα, et la co-expression du RP, sont fortement associés à l'efficacité des différentes modalités d'HT[77]. L'existence, ou l'enrichissement en mutations *d'ESR1* au niveau de domaines critiques (*hinge, LBD*) a été récemment suggéré comme mécanisme possible d'hormonorésistance à la phase avancée[74, 75]. Les travaux précliniques essentiellement menées sur des lignées cellulaires luminales (MCF-7, T47D, ZR-75-1) éventuellement associées à des xénogreffes murines conventionnelles, ont permis de lister tout un ensemble de paramètres biologiques associés à l'hormonorésistance et impliqués dans la quasi-totalité des grandes fonctions cellulaires. L'activation de la prolifération cellulaire par activation de la voie PIK3CA a été particulièrement étudiée, et a mené à la commercialisation de l'évérolimus, inhibiteur de mTORC1 indiqué dans les cancers du sein RE+ résistants aux IA non stéroïdiens[122, 168]. Nous ne disposons néanmoins pas non plus de facteurs prédictifs validés d'efficacité de l'évérolimus[169].

Dans ce contexte de question clinique cruciale et de manque de modèles précliniques pertinents[135, 170], nous avons développé des modèles de xénogreffes dérivées de patientes (PDX), en implantant des fragments de tumeurs fraîches et non prétraitées dans le coussinet graisseux interscapulaire de souris nude. La disposition orthotopique est attestée par l'anatomie des glandes mammaires murines[171] (figure 41).

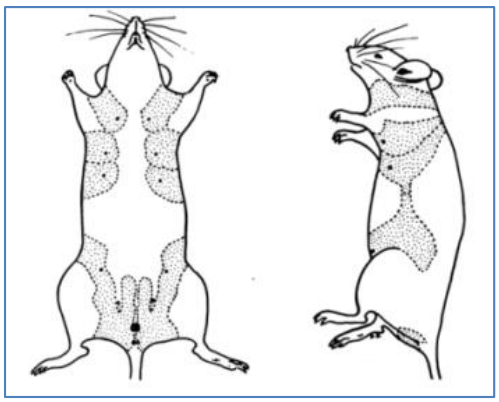


Figure 41. Localisation anatomique des glandes mammaires murines (en grisé). D'après la réf 171.

La valeur biologique et prédictive des PDX a été évaluée par plusieurs équipes dans le monde, depuis l'observation

partagée que les modèles génétiquement modifiés (GEMMs), même considérés comme supérieurs aux xénogreffes conventionnelles dans leur capacité de modélisation tumorale[172, 173], n'apportaient pas toujours une qualité d'évaluation préclinique suffisante[173, 174].

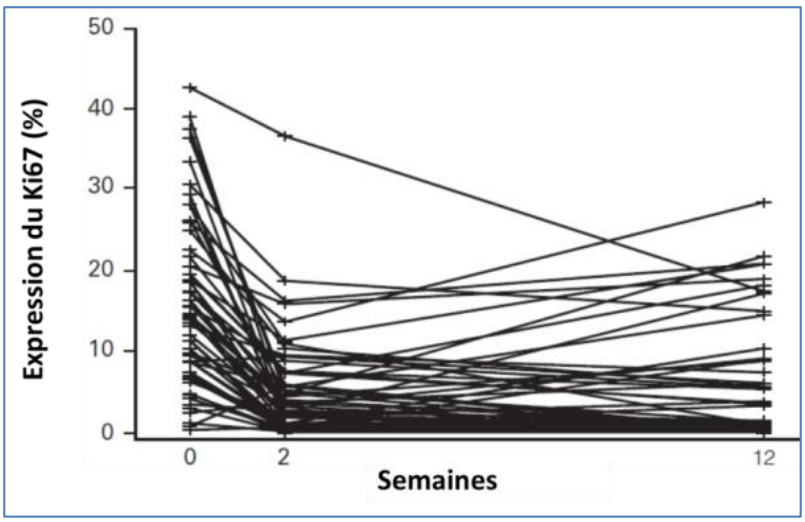
Nous avons démontré qu'il était possible de développer des PDX luminales issues de tumeurs fraîches et non prétraitées, sans dissociation ni humanisation préalable du site d'implantation[175]. Ces PDX récapitulent les aspects morphologiques, architecturaux, immunohistochimiques et génomiques des tumeurs d'origine, avec une grande stabilité temporelle. Chacune présente un profil original d'hormonosensibilité, et de manière notable, l'évolution clinique des patientes dont la tumeur a été greffée semble suivre le même profil. Ainsi, les patientes (non ménopausées au diagnostic) ayant donné les PDX HBCx-3 et une PDX plus récente dénommée HBCx-53, qui sont intrinsèquement résistantes au tamoxifène, ont rechuté sous tamoxifène adjuvant, alors que toutes les autres patientes restent en rémission complète après plusieurs années de suivi (voir en annexe 5). La lente évolution des cancers du sein luminaux et la lenteur de la prise de greffe rend malheureusement actuellement impossible l'utilisation des PDX comme outil de prédiction individuel comme cela a été suggéré dans d'autres modèles tumoraux à croissance rapide comme les adénocarcinomes pancréatiques[176]. L'objectif central de ce travail était de développer et d'étudier des modèles de PDX devenus résistants aux diverses modalités d'hormonothérapie utilisées en pratique clinique. A partir de deux modèles de PDX stabilisés après plusieurs passages, nous avons réussi à sélectionner quatre tumeurs résistantes à une ou plusieurs modalités d'HT. Les informations générées par l'analyse de ces quatre tumeurs sont multiples et méritent d'être discutées point par point.

Le **premier enseignement** important apporté par l'étude des 4 PDX résistantes **est l'observation de la conservation de l'expression du RE** dans toutes les situations, mesurée par IHC et qRT-PCR. Les études cliniques néoadjuvantes ont souligné l'importance de la variation du niveau d'expression du RE sous traitement, sa baisse étant associée à un moins bon pronostic, tout en n'observant quasiment jamais d'extinction[57]. Nous n'avons pas observé cette baisse d'expression, ni en IHC (figure 31) ni en qRT-PCR (données non montrées). Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus à la phase métastatique : l'expression du RE est très majoritairement conservée dans le tissu métastatique[177, 178], au contraire de celle du RP dont nous discuterons *infra* la possible signification. Nous n'avons pas non plus mis en évidence de mutation d'*ESR1* dans les points chauds décrits dans les formes métastatiques[74, 75]. Ce résultat est à nuancer compte tenu de la technique de séquençage utilisée, et du caractère peut-être pas assez « avancé » des PDX même sélectionnées. Ainsi, le RE restant exprimé sous sa forme normale dans les PDX résistantes, et restant la cible cardinale et unique des traitements endocriniens[36, 47, 48], il

nous est apparu nécessaire d'évaluer sa fonctionnalité dans ces modèles. L'approche supervisée a mis en évidence de profondes modifications de l'expression de gènes classiquement RE-dépendants (RP, IGF1R, pS2/TFF1, MYB). La diminution de l'expression du RP, patente dans trois des PDX résistantes (HBCx-22 TamR, HBCx-34 TamR et HBCx-34 OvaR), est particulièrement intéressante. Le statut du RP est le plus fréquemment variable dans les séries de biopsies de métastases de CS luminal avec près de 40% de perte d'expression[178]. Un faible niveau d'expression dans la tumeur primitive a été associé à un moins pronostic[179], même si le bénéfice du tamoxifène semble conservé à ce stade[52]. Le rôle particulier du RP a été récemment réapprécié : au-delà d'être un gène RE inductible, RP est une protéine associée à REα et module son comportement[68]. La progestérone permettrait de rediriger la transcription liée au RE, avec des effets anti-prolifératifs associés à un profil transcriptionnel de bon pronostic. Ces effets contribueraient à expliquer l'efficacité clinique régulièrement observée avec les progestatifs y compris à la phase très avancée[180]. Le RP est ainsi qualifié de « rhéostat » du RE[68] et l'appréciation de son expression semble indispensable à l'évaluation de l'hormonosensibilité.

Le second enseignement est l'absence de signature unifiée d'hormonorésistance, les profils de résistance aux différents traitements et les profils biologiques associés étant spécifiques aussi bien du contexte tumoral que de la pression thérapeutique. Ces éléments spécifiques de chaque situation viennent enrichir le tableau déjà complexe de l'hormonorésistance et généralement présenté de manière globalisante dérivant de travaux *in vitro*[44, 77, 80]. De manière remarquable, les approches menées à partir d'expériences cliniques ont permis de confirmer la nature individuelle des altérations biologiques associées à l'hormonorésistance. Le groupe de M. Ellis a ainsi montré par séquençage pangénomique des tumeurs primitives de 77 patientes traitées par IA en situation néoadjuvante que l'absence de réponse au traitement pouvait être associée à des mutations spécifiques de *PIK3CA, MAP3K1, MAP2K4, TP53, RB1, RUNX1, MALAT1, ERBB2, DDR1, DDR2, CSF1R, PDGFRA, AKT1* et *AKT2*[181]. Il est notable que ces gènes sont impliqués dans la plupart des grandes voies biologiques incriminées dans l'hormonorésistance, et même si certains sont accessibles à un ciblage thérapeutique (notion de « *druggable target* »), l'addiction oncogénique vraie reste difficile à démontrer[168], ce qui doit en partie pouvoir rendre compte des résultats cliniques finalement décevants obtenus par les thérapies ciblées en situation d'hormonorésistance[109, 111, 164, 167]. Cette approche individuelle basée sur des données cliniques avait été précédée toujours en situation néoadjuvante par l'évaluation de biomarqueurs intermédiaires de réponse comme le Ki67, sous l'impulsion du groupe de M. Dowsett[58]. Les courbes de variation de l'expression du Ki67 obtenues sous anastrozole préopératoire soulignent également le caractère individuel de la réponse au traitement (figure 42).

Figure 42. Variations individuelles du Ki67 à 2 et 12 semaines de traitement par anastrozole. Chaque courbe représente une patiente. On observe une tendance générale à la décroissance précoce de l'expression du Ki67 à 2 semaines de traitement, avec des variations beaucoup plus marquée au décours d'une patiente à l'autre. D'après Réf 58.



L'analyse du profil d'expression des PDX résistantes est aussi porteuse d'enseignements. Le profil génomique (CGHa et SNP6.0) est remarquablement stable mais il existe de fortes variations du profil d'expression (puce Affymetrix GeneChip Human 1.1 ST). Il n'a pas été possible de mettre en évidence un profil biologique cohérent à partir des 20 gènes communs aux 4 signatures (figure 37 et table 10). Les gènes les plus touchés par les modifications d'expression diffèrent notablement d'un modèle de PDX résistant à l'autre, à l'exception des gènes codant pour les histones H2 et H3 dans les modèles HBCx-22 TamR et OvaR (voir tables en annexe 2). L'histone H3 est impliquée dans le pronostic des cancers du sein luminaux. L'analyse combinée de plusieurs jeux de données publiques accessibles sur le site BreastMark[182] (au 12 octobre 2015) associe en analyse univariée une expression élevée de HIST1H3C à un pronostic défavorable dans les cancers du sein luminaux (figure 43). La restriction de l'analyse à un sous-ensemble de 366 patientes avec une tumeur de sous-type luminal B et traitées par tamoxifène confirme cette tendance avec un hazard ratio pour la rechute à 1.447 (p=0,001827) tendant à conférer une valeur prédictive à l'expression de HIST1H3C.

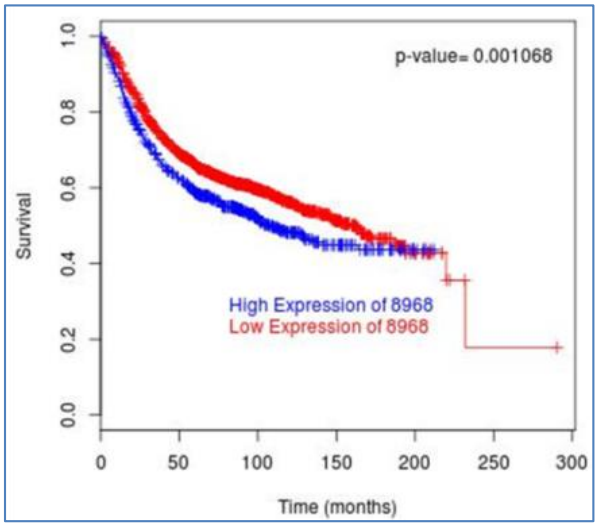


Figure 43. Pronostic (survie sans rechute) des cancers du sein luminaux en fonction de l'expression de HIST1H3C. Données obtenues à partir de 2274 patientes RE+ sur le site BreastMark[182]. Hazard ratio pour la rechute=1,25.

Notons toutefois que ces résultats ne sont pas confirmés par l'analyse menée à partir de deux autres sites d'analyse de données publiques[183, 184]. L'histone H3 semble néanmoins particulièrement associée au remodelage de la chromatine observé dans les cancers du sein luminaux devenus hormonorésistants. Un des principaux facteurs pionniers du REα, FOXA1, se lie de manière préférentielle aux régions enrichies en histone 3 mono- ou diméthylée en lysine 4 (H3K4me1 et H3K4me2)[86]. Cette action a aussi été démontrée pour d'autres facteurs pionniers tels PBX1, TLE1, et AP2γ qui ont la capacité d'interagir avec ces modifications épigénétiques de manière à maintenir ouverte la chromatine et faciliter la liaison du REα[185]. Nous avons également analysé les variations d'expression de ces facteurs pionniers, et montré là encore le caractère individuel des variations liées à l'hormonorésistance.

Les modifications du profil d'expression génique sous hormonothérapie ont aussi été évaluées dans la littérature, à partir de modèles *in vitro*, *in vivo* et de données cliniques. L'étude des modèles de lignées dites LTED (*long term estrogen deprivation*) ou exposées au tamoxifène confirme nos observations telles le maintien de l'expression du RE et la baisse de l'expression de gènes canoniques tels pS2 et RP via un mécanisme épigénétique[186, 187]. Une approche similaire à celle que nous avons développé sur les PDX a permis de créer plusieurs lignées cellulaires dérivées de MCF-7 et résistantes à diverses modalités d'HT, et caractérisées par un des profils d'expression génique spécifiques et peu chevauchants[186]. La notion de reprogrammation biologique du RE a ainsi pu être établie dans le cadre

de la résistance acquise par les lignées LTED, soulignant l'activation de gènes cibles non canoniques et l'implication des voies de signalisation EGFR/ERBB/AKT[188]. Ce type de résultat a pu être reproduit *in vivo* à partir de xénogreffes de la lignée luminale couramment utilisée ZR-75-1, avec ébauche de signature de résistance reposant essentiellement sur le cycle cellulaire (*CCNA2*, *CDKN3*, *MKI67*,…) et la voie RE classique (*TFF1*, *TFF3*, …)[189].

L'approche clinique a essentiellement reposé sur le modèle adjuvant/préopératoire[59] (voir supra I.3 et figure 11) ce qui est conceptuellement très différent des travaux sur les lignées LTED ou sur les PDX résistantes telles que nous les avons développées. Compte tenu de la difficulté d'accès aux prélèvements de maladie avancée devenue résistante, l'analyse dynamique des variations d'expression génique sous HT préopératoire (quasi exclusivement par un IA) a porté sur des tumeurs primitives non préalablement exposées et traitées sur un temps court. Les travaux initiaux ont mis l'accent sur l'importance de l'activation des voies de biosynthèse dans la résistance précoce avec en particulier un haut niveau d'expression des protéines ribosomales[60], de manière associée à l'élévation de l'expression de gènes de prolifération (*ASPM*, *MCM4*)[62].

Nos données suggèrent de plus que les caractéristiques phénotypiques (profil de résistance : table 9 et figures 38-39) et biologiques (chapitre V.3) de la résistance à l'HT diffèrent selon la modalité thérapeutique préalable. Ces observations viennent compléter la description obtenue à partir de données préopératoires. Le groupe de M. Dowsett a par exemple montré chez 103 patientes que la réponse biologique initiale au fulvestrant (n=22) et à la suppression oestrogénique par anastrozole (n=81) était caractérisée par une variation d'expression différentielle de 28 gènes et 40 catégories GO[190]. Les fonctions de cycle cellulaire et de survie et mort cellulaire semblent à nouveau particulièrement affectées par le fulvestrant. La sensibilité et la résistance aux traitements endocriniens semblent ainsi comporter des éléments spécifiques à chaque traitement. Il existe donc une convergence entre données cliniques (essentiellement obtenues à partir de tumeurs primitives non prétraitées) et les premières données générées à partir de nos PDX devenues résistantes sous traitement, qui souligne la nature individuelle et non généralisable des altérations biologiques associées à la résistance.

Nos résultats suggèrent également que **l'activation de la voie PI3K/mTOR n'est pas impliquée dans la résistance à l'HT dans ces modèles**. Les deux séries de PDX étudiées, HBCx-22 et HBCx-34 et leurs dérivés résistants, présentent une activation de la voie PI3K/Akt/mTOR attribuée à des mécanismes différents mais avec exactement les mêmes profils de prolifération élevée et d'expression élevée de P-S6. Cette absence d'association entre activation de la voie PI3K et hormonorésistance doit être

analysée de manière fine, compte tenu des discordances avec les travaux *in vitro* suggérant cette association et qui ont conduit au développement de l'évérolimus[122, 125, 126]. La sous-unité catalytique PIK3CA fait l'objet de mutations fréquemment observées dans les cancers du sein luminaux et considérées comme responsables d'une activation de la voie[119, 127, 128]. Or, et de manière très rarement commentée, les lignées cellulaires luminales les plus utilisées comme modèles *in vitro* hormonosensibles présentent toutes une mutation soit de *PIK3CA* (MCF-7, T47D), soit de *PTEN* (ZR-75-1)[191]. Les données cliniques viennent confirmer cette absence d'association. En effet, aucune corrélation entre mutation de PIK3CA et réponse aux IA n'a pu être établie en situation néoadjuvante[192, 193]. De même, l'existence de mutations de PIK3CA n'est pas non plus corrélée au pronostic à long terme de patientes traitées par une hormonothérapie adjuvante, que ce soit du tamoxifène ou un IA, et sur la base aussi bien de données rétrospectives que d'essais prospectifs randomisés[129, 192, 194, 195]. L'activation de la voie PI3K est aussi évaluée par l'analyse de l'expression des protéines effectrices terminales et de leurs formes phosphorylées, en général par IHC. Les résultats cliniques suggèrent paradoxalement qu'une expression élevée de 4E-BP1, P-4E-BP1, et P-p70S6K est associée à un moins bon pronostic, mais de manière indépendante d'un éventuel traitement par tamoxifène[196, 197]. L'ensemble de ces données, soutenues par les observations menées sur nos modèles de PDX, doivent faire considérer avec précaution l'ensemble des modèles *in vitro* et le lien réel existant entre échappement ou résistance à l'hormonothérapie et activation de la voie PI3K.

Ces difficultés d'analyse de la voie PI3K et du lien entre caractère « activé » et hormonorésistance ont également été explorées de manière pharmacodynamique grâce aux PDX. Nous avons confirmé sur nos modèles le mode d'action des deux drogues de substitution possibles en cas d'échappement à l'HT selon les référentiels cliniques en vigueur, le fulvestrant et l'évérolimus[5], et tenté d'évaluer sur les modèles sensibles et résistants l'efficacité de l'évérolimus en monothérapie comparée à son association à diverses modalités d'HT et à l'HT seule. **Nous montrons qu'il ne semble pas exister de synergie entre hormonothérapie et évérolimus, ni en situation sensible, ni en situation de résistance**, en particulier avec le tamoxifène ou la déprivation oestrogénique qui sont les combinaisons qui ont été évaluées en clinique[166, 167]. Il est à noter que les essais cliniques n'ont jamais comparé les combinaisons évérolimus-hormonothérapie à l'évérolimus seul, ne permettant donc pas non plus de conclure à une éventuelle synergie. L'étude initiale de phase II menée chez des patientes plus avancées suggérait une efficacité de l'évérolimus en monothérapie potentiellement similaire à celles des combinaisons[198]. Cette étude, de même que les études menées en situation néoadjuvante, n'ont pas permis d'isoler d'éventuels facteurs prédictifs d'efficacité de l'évérolimus, que ce soit le statut mutationnel de PIK3CA[110, 199] ou le niveau d'expression des protéines de la voie (PTEN, P-AKT)[198]. En

situation avancée, les premières analyses ancillaires de l'étude pivotale Boléro-2 basées sur une analyse NGS de 182 oncogènes n'ont pas montré de corrélation avec l'efficacité de l'évérolimus (Hortobagyi et al, ASCO 2013, *Late Breaking Abstract* LBA 509 ; non publié). L'analyse translationnelle de l'étude TAMRAD suggère en revanche un lien entre activation de mTORC1 indépendante d'Akt et activité de la combinaison tamoxifène-évérolimus[200]. Ce résultat se trouve renforcé par nos observations sur la PDX HBCx-34 qui présente une activation de la voie indépendante de la phosphorylation d'Akt (figure 34) : le variant résistant HBCx-34 TamR est sensible à l'évérolimus ou au fulvestrant en monothérapie, et la combinaison des deux évoque fortement une **synergie fulvestrant-évérolimus** (figures 39-40) qui est confirmée sur le plan pharmacodynamique (table 13). Nous apportons ici de futures pistes d'exploration des diverses modalités d'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR et de leur impact sur l'hormonorésistance et la prédiction thérapeutique.

L'ensemble des travaux présentés ici comportent certaines **limites** qu'il convient également de signaler. Le développement des PDX a connu un essor rapide et international depuis quelques années, et leurs avantages/inconvénients actuellement reconnus sont résumés dans la table 16, basée sur des revues publiées après le début du présent travail. Brièvement, et en comparaison avec les historiques lignées cellulaires et xénogreffes dérivées de ces lignées, il est admis que les PDX sont les modèles actuellement les plus proches des tumeurs humaines et présentent une remarquable stabilité histologique, architecturale, génomique et protéique. Les PDX sont néanmoins porteuses de biais majeurs qu'il convient de considérer dans l'interprétation des données. Il existe un biais de prise de greffe vers les tumeurs proliférantes et/ou de haut grade, rendant impossible une représentative exhaustive des types de cancers. De manière corrélée, le succès d'établissement d'une PDX est un facteur de mauvais pronostic. Pour certains auteurs les PDX reflètent davantage la maladie avancée.

Auteur	Année	"Pros"	"Cons"
Siolas*[145]	2013	"miment" les tumeurs humaines surtout en situation orthotopique Similarité histologique, génomique (SNP, CNV) Meilleurs prédicteurs de réponse et découverte de biomarqueurs	Immunodéficience des souris receveuses (NOD/SCID ou nude) Rendent peu compte de la variabilité de chaque cancer Perte du stroma humain Périodes de latence et équipe spécialisée Faibles taux de prise sélectionnant les formes agressives
Landis**[201]	2013	Récapitulent les profils histologiques, moléculaires, thérapeutiques Certains modèles ont un potentiel métastatique Exploration des cellules souches	Incertitude sur les interactions avec le stroma murin Immunodéficience des souris receveuses Définition des objectifs d'évaluation thérapeutique en cours de définition (recommandations ARRIVE)
Lum*[202]	2014	Maintien de l'histologie, du profil génomique et de ses variations, y compris lors des greffes successives	Difficulté de l'implantation orthotopique Potentiel et adressage métastatique incertains Valeur thérapeutique prédictive à valider
Hoffman*[156]	2015	Intérêt des greffes orthotopiques pour étudier le potentiel métastatique	
Cassidy*[155]	2015	Maintien de l'architecture tumorale	Incertitudes sur les interactions avec le stroma et la réponse immune Difficulté à reproduire l'hétérogénéité du microenvironnement tumoral Composition clonale des tumeurs greffées et stables inconnue
Aparicio**[144]	2015	Reflète le pronostic et le potentiel métastatique d'une tumeur donnée Meilleure compréhension de la réponse aux traitements	Remplacement du stroma humain par le stroma murin Pression de sélection clonale initiale inconnue
Whittle**[146]	2015	Stabilité génomique Stabilité de l'expression protéique	Biais de greffe vers les tumeurs de haut grade/triple négative/luminales B

Table 16. Avantages et limites des PDX. *revue générale. **revue consacrée au cancer du sein

Le potentiel métastatique des xénogreffes reste cependant faible en dehors de certaines implantations orthotopiques techniquement plus difficiles. Ceci témoigne également d'une autre limite majeure, l'incertitude sur les interactions avec le stroma murin et la réponse immune dans des souris immunodéficientes, et la difficulté à reproduire l'hétérogénéité du microenvironnement tumoral. Une des applications principales est leur utilisation comme outil de prédiction thérapeutique associé à l'étude de biomarqueurs, qui sont très prometteuses[142]. Dans le cadre des cancers du sein luminaux, la limitation des PDX aux tumeurs luminales B/proliférantes n'est pas un obstacle à leur utilisation : ces tumeurs sont de mauvais pronostic (au contraire des tumeurs luminales A) et nécessitent des modèles d'étude et de tests thérapeutiques précliniques validés.

Nous n'avons développé et exploité des tumeurs résistantes qu'à partir de 2 PDX luminales B, ce qui ne rend pas compte de la diversité des cancers luminaux. Au total, le laboratoire a développé 34 xénogreffes luminales originales (voir infra « Perspectives »). Il convient de souligner que la composition clonale des tumeurs greffées et stables reste inconnue, de même que la pression de sélection clonale initiale. Nous n'avons à ce jour pas entrepris d'analyse par génomique haut débit en dehors du transcriptome. Les seules analyses de séquence menées ont été la recherche de mutations connues des points chauds les gènes *PIK3CA, PIK3R1, ESR1*. Le débat sur la représentativité clinique des modèles de PDX issues de tumeurs primitives fraîches (maladie précoce grave ou maladie avancée ?) reste ouvert, et l'absence de mise en évidence de mutation d'*ESR1* dans nos modèles contribue à considérer ces PDX comme modèles de maladie avancée au moment de la première rechute. On ne peut pas exclure l'existence de mutations à fréquence allélique très faible et non captée par un séquençage standard, ce qui n'est pas contradictoire avec leur représentativité de cette situation clinique[75].

En résumé, nous avons développé, validé et exploité des modèles de PDX de cancers du sein luminaux, dont certains rendus résistants aux diverses modalités d'hormonothérapie utilisée en clinique courante. Ces modèles sont informatifs sur les mécanismes d'hormonorésistance qui semblent spécifiques de chaque tumeur et chaque traitement, via une reprogrammation transcriptionnelle majeure du RE, et cependant une tendance commune à impliquer de grandes fonctions cellulaires telles la prolifération, le cycle cellulaire, la survie et la mort cellulaire. Ces PDX peuvent servir d'outil de test thérapeutique préclinique avec analyse de biomarqueurs, et permettent de suggérer que la résistance à l'hormonothérapie n'est pas nécessairement liée à l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR.

Nous espérons que l'établissement et la caractérisation de ces PDX luminales sensibles et résistantes à l'HT générera plusieurs axes de recherche. Le laboratoire a développé actuellement 34 xénogreffes luminales originales, qui ne sont pas toutes au même stade d'étude comme indiqué dans la figure 44.

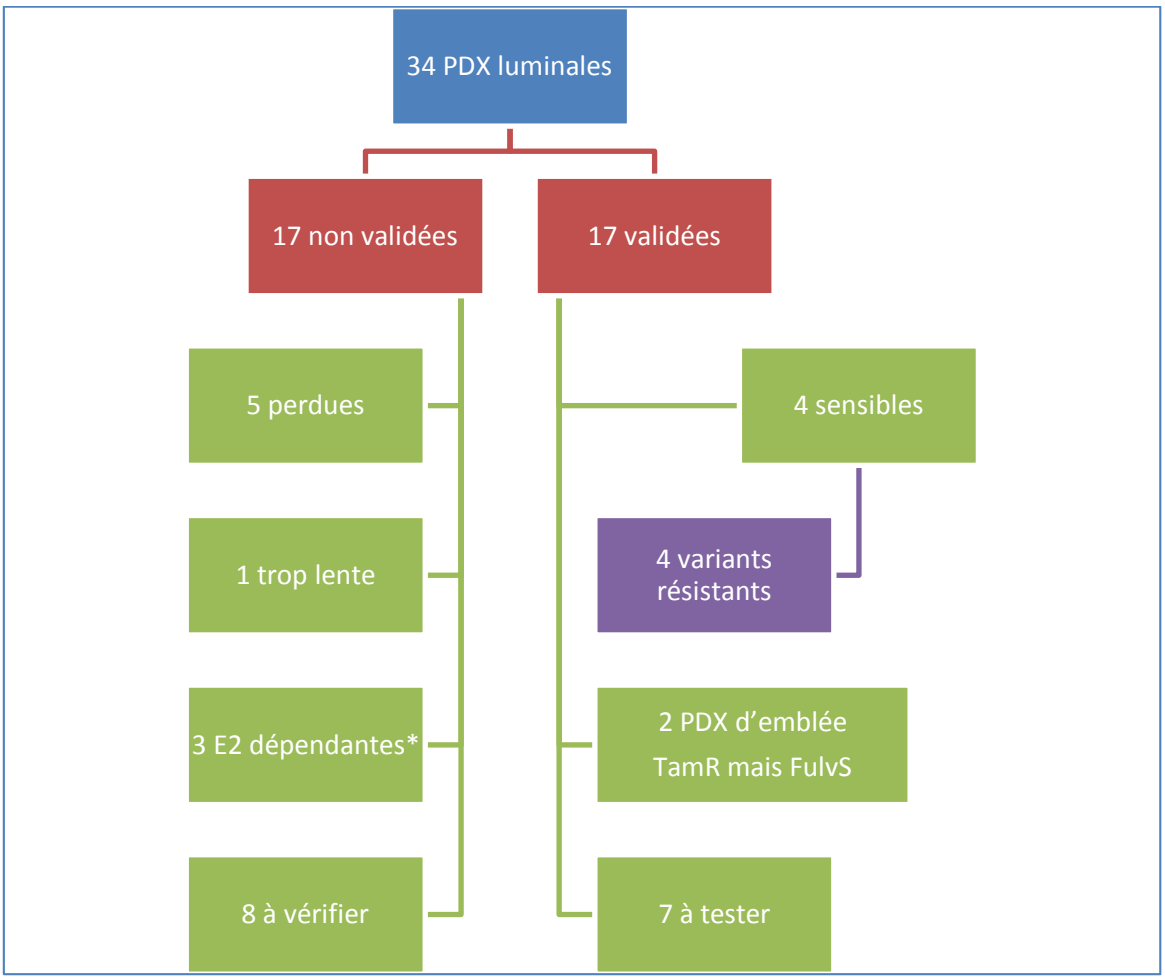


Figure 44. Développement des PDX luminales. *E2 dépendante : aucune croissance autonome ; FulvS : sensible au fulvestrant.

La caractérisation (génomique, thérapeutique) est en cours et permettra d'évaluer l'utilité de ces PDX. Nous comptons également développer des modèles résistants de deuxième génération, soit résistant au fulvestrant, soit résistants aux thérapies ciblées utilisées ou testées en cas d'hormonorésistance. La table 17 indique les PDX résistantes déjà élaborées, de première génération (issues d'une PDX d'origine, qui sont les modèles étudiés dans ce travail) et de deuxième génération (issues de PDX résistantes de première génération) qui doivent rendre compte des situations d'échappement aux

traitements administrés en situation d'hormonorésistance, que ce soit le fulvestrant ou une combinaison comportant une thérapie ciblée.

PDX Parentale	**HBCx-22**		
1ère génération	**TAM R**	**OVA R**	FULV R
2nde génération		RADTAM R	
		RADFULV R	
PDX Parentale	**HBCx-34**		
1ère génération	**TAM R**	OVA R	
2nde génération	RAD R		
	RADTAM R		
PDX Parentale	**HBCx-3 TAM R**		
PDX Parentale	**HBCx-53 TAM R**		
1ère génération	RADTAM R		

Table 17. Générations de PDX résistantes (en caractères gras les modèles validés). RAD = évérolimus.

L'ensemble de ces modèles fait l'objet de collaborations académiques et industrielles. La fréquence de l'hormonorésistance et l'élargissement rapide des possibilités de ciblage thérapeutique dans cette situation (figure 45) soulignent l'importance d'être en capacité de décrire et modéliser l'hormonorésistance et ces diverses options de ciblage thérapeutique, et la résistance à ces dernières.

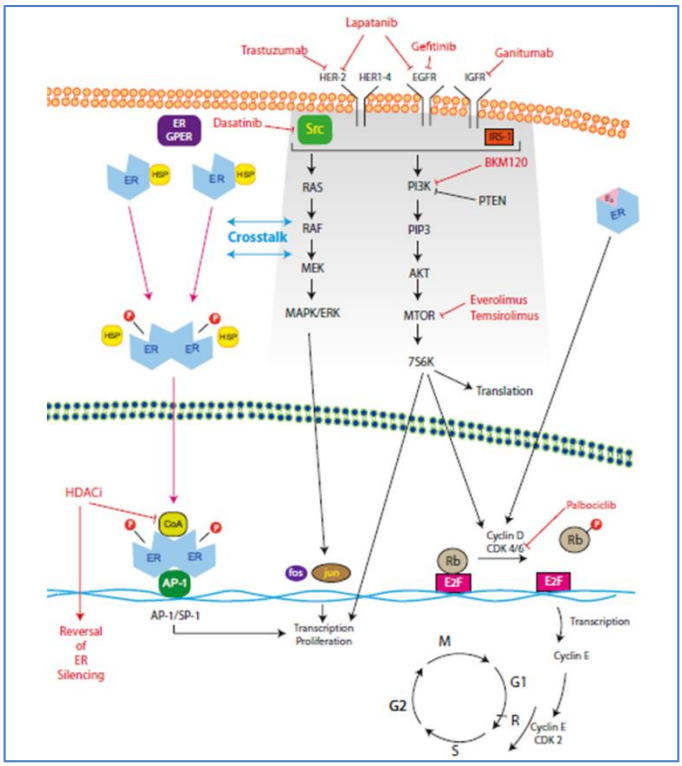


Figure 45. Résistance et perspectives thérapeutiques [112]

Au-delà de la poursuite du développement et de l'étude des modèles résistants, nous avons commencé à définir plusieurs voies de recherche qui peuvent être résumées comme suit :

1. Etude du profil de liaison du RE. Le groupe de J. Carroll a démontré l'association entre profil de liaison du RE et pronostic du CS au stade précoce[203]. Les premiers échantillons de PDX ont été adressés à son laboratoire et les premières données de faisabilité des analyses ChipSeq sur les PDX sont en cours d'évaluation.
2. Analyses génomiques haut débit. Les collaborations industrielles en cours et éventuellement académiques (C. Caldas) devraient permettre de générer les profils exome et RNASeq des PDX sensibles et résistantes.
3. Développement de modèles *in vitro* 2D ou 3D à partir des PDX. L'objectif est de disposer de modèles plus maniables et plus rapides que les PDX, possédant les mêmes caractéristiques biologiques et de sensibilité thérapeutique. Nous avons dans un premier temps tenté de développer des sphères sur le modèle colique à partir de la PDX HBCx-22 et de ses dérivés résistants. Les sphères se développent sans difficulté majeure, mais la réponse aux traitements hormonaux est inévaluable sur ces modèles. Nous projetons donc de développer des lignées cellulaires selon plusieurs techniques, qu'il conviendra dans un premier de valider.

4. L'étude de l'interaction RE et voies non génomiques fait l'objet d'une collaboration d'E. Marangoni avec l'équipe de M. Le Romancer (Centre Léon Bérard, Lyon).
5. L'étude de la voie PI3K fait également l'objet de projets qui complèteront les descriptions acquises sur les xénogreffes :
    a. Analyse fonctionnelle par PLA (*proximity ligation assay*) : une collaboration est en discussion avec le groupe de S. Vagner (Institut Curie) qui a étudié le rôle des facteurs d'initiation de l'élongation dans la résistance aux thérapies ciblées[204].
    b. Analyse par séquençage ciblée d'une cohorte clinique de patientes présentant un cancer du sein RE+ devenu hormonorésistant et traitées par évérolimus.
6. Les données générées par l'analyse transcriptomique n'ont pas été totalement exploitées. Un rapprochement avec l'équipe bioinformatique de l'Institut Curie (U 900) est en cours. Nous disposons notamment de plusieurs jeux de données publiques cliniques

Au total, nous espérons disposer d'un ensemble de modèles précliniques *in vivo* et *in vitro* caractérisés de manière extensive, devant nous aider à poursuivre la description des mécanismes d'hormonorésistance et développer le rationnel des futures options thérapeutiques (figure 45), en lien avec des données cliniques acquises à la phase précoce comme à la phase avancée.

ANNEXES

1. CLASSIFICATION TNM

7eme édition (2010)

TUMEUR PRIMAIRE (T)
Tx : La tumeur primitive ne peut pas être évaluée
T0 : La tumeur primitive n'est pas palpable
Tis : Carcinome in situ
Tis (DCIS) : Carcinome canalaire in situ
Tis (CLIS) : Carcinome lobulaire in situ
Tis (Paget) : Maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente
T1 : Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
T1mic : Microinvasion ≤ 1mm dans sa plus grande dimension
T1a : 1 mm < microinvasion ≤ 5 mm dans sa plus grande dimension
T1b : 5 mm < microinvasion ≤ 10 mm dans sa plus grande dimension
T1c : 10 mm < microinvasion ≤ 20 mm dans sa plus grande dimension
T2 : 20 mm < tumeur ≤ 50 mm dans sa plus grande dimension
T3 : Tumeur > 50 mm dans sa plus grande dimension
T4 : Tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b)
T4a : Extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral
T4b : Œdème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau du même sein
T4c : T4a + T4b
T4d : Cancer inflammatoire

GANGLIONS REGIONAUX (N)
Nx : L'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué (par exemple déjà enlevés chirurgicalement ou non disponibles pour l'analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement)
N0 : Absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées
N0 (i-) : Absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, étude immunohistochimique négative (IHC)
N0 (i+) : Absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, IHC positive avec des amas cellulaires ≤ 0,2 mm (considéré comme N-)
N1mi : Micro métastases > 0,2 mm (ou > 200 cellules) et ≤ 2 mm
N1 : Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
N1a : Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires
N1b : Envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
N1c : Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique (N1a + N1b)
N2 : Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire
N2a : Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire > 2 mm

N2b : Envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire
N3 : Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires, envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux
N3a : Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires (avec au moins un amas cellulaire > 2 mm ou envahissement des ganglions sous-claviculaires
N3b : Envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
N3c : Envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

METASTASES (M)
Mx : Renseignements insuffisants statuer sur la présence ou non de métastases à distance
M0 : Absence de métastase à distance
M1 : Présence de métastase(s) à distance

ypTNM pour l'évaluation du pTNM réalisé après traitement néoadjuvant
pN(sn) pour les ganglions sentinelles

2. TRANSCRIPTOME

HBCx-22 TamR			
Gene	Direction	fold change	p
HIST1H3I	up	33,87	7,76E-08
PCDH10	up	17,49	4,65E-06
KRT6A	up	10,6	6,42E-05
HIST1H2BB	up	10,55	6,09E-08
LBP	up	8,81	5,96E-03
S100A8	up	8,42	1,20E-04
CDH18	up	7,79	4,00E-05
DSG3	up	7,31	1,37E-04
HIST1H3C	up	7,31	1,40E-06
C1S // EMG1	up	7,17	1,44E-04
MAGEA4	down	26,18	8,36E-09
NPY1R	down	22,12	3,90E-03
CA10	down	11,66	6,84E-03
PLS3	down	6,41	3,93E-07
SDC2	down	6,33	2,15E-05
CES3	down	5,52	6,01E-07
MYEF2	down	5,33	1,02E-03
SLITRK6	down	5,31	2,72E-03
C11orf63	down	5,27	1,45E-09
KRT23	down	4,97	3,71E-05

HBCx-22 OvaR			
Gene	Direction	fold change	p
HLA-DPA1	up	9,07	1,44E-03
HIST1H3C	up	8,91	9,83E-07
HIST1H2BB	up	7,49	1,98E-07
PDZK1	up	6,47	1,94E-03
PADI3	up	5,85	2,00E-05
SEZ6L2	up	5,77	1,24E-04
S100A8	up	5,56	1,80E-03
CD40	up	5,06	1,63E-04
---	up	4,61	2,30E-03
APOD	up	4,61	1,59E-02
MAGEA4	down	12,88	3,51E-07
GTSF1	down	4,34	3,49E-02
PTPRM	down	3,75	1,46E-07
CCNA1	down	3,74	3,16E-03
C20orf85	down	3,65	8,82E-03
CDC20B	down	3,64	2,12E-03
PKP1	down	3,6	2,04E-04
C10orf82	down	3,44	1,64E-05
SPDYC	down	3,05	2,63E-04
PLS3	down	3,00	2,72E-03

HBCx-34 TamR			
Gene	Direction	fold change	p
AKAP12	up	15,85	6,48E-03
UGT2B4	up	15,66	3,52E-05
CD81	up	5,57	3,86E-05
PEG10	up	5,4	1,23E-04
NLGN4X	up	4,63	8,58E-07
SOCS2	up	4,62	3,42E-03
UPK1A	up	4,59	2,53E-02
LRP1B	up	4,32	3,89E-02
DEGS2	up	4,16	3,85E-05
SLC37A2	up	4,04	9,32E-03
UCHL1	down	32,56	1,55E-08
IGSF1	down	11,97	3,66E-05
FAM5C	down	10,7	2,19E-04
BHMT2	down	9,29	1,60E-06
IL20	down	9,02	6,12E-05
LINC00238	down	9,01	1,71E-07
RAMP3	down	8,52	3,60E-03
APOD	down	8,51	2,22E-04
MLLT11	down	8,47	1,01E-06
NPY1R	down	8,36	1,53E-05

HBCx-34 OvaR			
Gene	Direction	fold change	p
CASP14	up	12,61	3,38E-06
SLITRK6	up	8,26	2,19E-04
LRP1B	up	6,63	4,36E-05
EDNRA	up	6,18	3,70E-05
SLC30A8	up	5,06	6,12E-03
ATP8A2	up	4,93	3,04E-03
ACSL5	up	4,7	1,17E-04
MUCL1	up	4,51	3,72E-03
ZPLD1	up	4,46	6,40E-05
CEACAM6	up	4,34	2,69E-02
HOXB2	down	14,03	2,81E-06
IL20	down	8,89	2,03E-05
GREB1	down	7,7	8,96E-07
IGSF1	down	7,69	1,20E-04
SDC2	down	7,00	2,98E-04
ALB	down	6,88	1,13E-02
MAOA	down	6,23	1,97E-05
ASIC2	down	4,56	3,59E-05
HOXB4	down	4,56	6,41E-04
MLLT11	down	4,15	6,17E-05

3. PRESENTATIONS ET POSTERS

PRÉSENTATION ORALE EN CONGRÈS

Establishment and Characterization of Human Luminal Breast cancer Xenografts. **Cottu P**, Assayag F, De Plater L, Elbaz C, Karboul N, Marangoni E, Guyader Ch, Boudou-Rouquette P, Fontaine J-J, Gentien D, Vincent-Salomon A, Reyal F, de Cremoux P, Decaudin, D. San Antonio Breast Cancer Symposium, 2010.

CONFÉRENCES INVITÉES

Breakthrough Breast Cancer Research Center (Mitch Dowsett's Lab) : 2011 et 2015

Cancer Research UK Cambridge Institute (Carlos Caldas' Lab) : 2013

Groupe d'Etude et de Recherche sur les Mastopathies : 2013

Institut Curie Chromatin Dynamics Lab (Geneviève Almouzni's Lab) : 2014

Ecole Doctorale E418 (Retraite Roscoff) : 2014

PRÉSENTATIONS AFFICHÉES

AACR 2010
Molecular characterization of human breast cancer xenografts reveals a strong genomic and gene expression stability. Fabien Reyal, Charlotte Guyader, Charles Decraene, Carlo Lucchesi, Nathalie Auger, Franck Assayag, Ludmilla DePlater, David Gentien, Marie-France Poupon, **Paul Cottu**, Patricia De Cremoux, Anne Vincent-Salomon, Sergio Roman-Roman, Olivier Delattre, Didier Decaudin, Elisabetta Marangoni. Abstract # 3275

AACR 2011
Primary breast cancer xenografts maintain the molecular profiles of corresponding patients' tumors and recapitulate a part of stroma microenvironment. Fabien Reyal, Charlotte Guyader, Charles Decraene, Carlo Lucchesi, Nathalie Auger, Franck Assayag, Ludmilla De Plater, David Gentien, Marie-France Poupon, **Paul Cottu**, Patricia De Cremoux, Anne Vincent-Salomon, Sergio Roman-Roman, Olivier Delattre, Didier Decaudin, Elisabetta Marangoni. Abstract #1603

AACR 2012
Reversal of resistance to endocrine therapy by mTOR pathway targeting in a panel of patient derived breast cancer xenografts. **Paul H. Cottu**, Franck Assayag, Olfa Chouchane-Mlik, Fabien Reyal, Patricia

De Cremoux, David Gentien, Sophie Chateau-Joubert, Anne Vincent-Salomon, Marie-France Poupon, Didier Decaudin, Elisabetta Marangoni. Institut Curie, Paris, France, Hospital Saint Louis, Paris, France, Ecole Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France. Late-Breaking Poster Session

Mastospheres as a new 3D ex vivo breast cancer microtumors for preclinical drug testing. Sophie Richon, **Paul Cottu**, Louis-Bastien Weiswald, Jean-Marc Guinebretiere, Elisabetta Marangoni, Franck Assayag, Aurelie Thuleau, Dalila Labiod, Didier Decaudin, Dominique Bellet, Virginie Dangles-Marie. Faculté Pharmacie Paris Descartes, Paris, France, Institut Curie, Paris, France. Late-Breaking Poster Session

AACR-NCI-EORTC 2012
Preclinical Testing of Everolimus in Combination with Standard Endocrine Treatments in Hormone-resistant Patient-derived Luminal Breast Cancer Xenografts. E. Marangoni, T. Bagarre, F. Assayag, S. Chateau-Joubert, J.J. Fontaine, K. Slimane, I. Bièche, D. Decaudin, A. Vincent-Salomon, **Cottu P**

AACR 2013
Endocrine resistant luminal breast cancer xenografts are powerful models for the analysis of sensitivity to endocrine and everolimus treatments. **Paul H. Cottu**, Thomas Bagarre, Jean-Jacques Fontaine, Franck Assayag, Sophie Richon, Sophie Chateau-Joubert, Aurélie Thuleau, Patricia de Cremoux, Khemaies Slimane, Didier Decaudin, Anne Vincent-Salomon, Ivan Bièche, Elisabetta Marangoni

AACR-NCI-EORTC 2013
Establishment of luminal breast cancer patient-derived xenografts with acquired resistance to both hormonotherapy and everolimus. Rania El Botty, **Paul Cottu**, Franck Assayag1, Pierre de la Grange, David Gentien, Aurélie Thuleau, Sophie Vacher, Sophie Chateau-Joubert, Ivan Bièche, Elisabetta Marangoni

SABCS 2013
Identification of resistance-specific gene expression signatures in a breast cancer patient-derived xenograft with acquired resistance to different endocrine therapies. **Paul H Cottu**, Ivan Bièche, Pierre de la Grange, David Gentien, Franck Assayag, Aurélie Thuleau, Rania El-Botty, Sophie Chateau-Joubert, Michel Huerre, Rana Hatem, Sophie Richon, Khemaies Slimane, Elisabetta Marangoni.

Roscoff 2015
Retraite Ecole Doctorale E418 : résumé des travaux

4. ARTICLES PUBLIES EN COLLABORATION

1. de Plater L, Laugé A, Guyader C, Poupon MF, Assayag F, de Cremoux P, Vincent-Salomon A, Stoppa-Lyonnet D, Sigal-Zafrani B, Fontaine JJ, Brough R, Lord CJ, Ashworth A, **Cottu P**, Decaudin D, Marangoni E. Establishment and characterisation of a new breast cancer xenograft obtained from a woman carrying a germline BRCA2 mutation. Br J Cancer. 2010 Oct 12;103(8):1192-200

2. Reyal F, Guyader C, Decraene C, Lucchesi C, Auger N, Assayag F, De Plater L, Gentien D, Poupon MF, **Cottu P**, De Cremoux P, Gestraud P, Vincent-Salomon A, Fontaine JJ, Roman-Roman S, Delattre O, Decaudin D, Marangoni E. Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. Breast Cancer Res. 2012 Jan 16;14(1):R11

3. Weiswald LB, Richon S, Massonnet G, Guinebretière JM, Vacher S, Laurendeau I, **Cottu P**, Marangoni E, Nemati F, Validire P, Bellet D, Bièche I, Dangles-Marie V. A short-term colorectal cancer sphere culture as a relevant tool for human cancer biology investigation. Br J Cancer. 2013 Apr 30;108(8):1720-31

British Journal of Cancer (2010) 103, 1192 – 1200
© 2010 Cancer Research UK All rights reserved 0007 – 0920/10
www.bjcancer.com

Translational Therapeutics

Establishment and characterisation of a new breast cancer xenograft obtained from a woman carrying a germline *BRCA2* mutation

L de Plater[1], A Laugé[2], C Guyader[1], M-F Poupon[1], F Assayag[1], P de Cremoux[2], A Vincent-Salomon[2,3], D Stoppa-Lyonnet[2,3,4], B Sigal-Zafrani[2], J-J Fontaine[5], R Brough[6], CJ Lord[6], A Ashworth[6], P Cottu[1,7], D Decaudin[1,7] and E Marangoni[*,1]

[1]Preclinical Investigation Unit, Institut Curie – Translational Research Department, Hôpital St Louis, Quadrilatère historique, Porte 13, 1, Ave Claude Vellefaux, Paris 75010, France; [2]Department of Tumor Biology, Institut Curie, Paris, France; [3]INSERM U830, Institut Curie, Paris, France; [4]University Paris Descartes, Paris, France; [5]National Veterinary School of Maisons Alfort, Maisons-Alfort, France; [6]Gene Function Laboratory, The Breakthrough Breast Cancer Research Centre, The Institute of Cancer Research, London SW3 6JB, UK; [7]Department of Medical Oncology, Institut Curie, Paris, France

BACKGROUND: The *BRCA2* gene is responsible for a high number of hereditary breast and ovarian cancers, and studies of the BRCA2 biological functions are limited by the lack of models that resemble the patient's tumour features. The aim of this study was to establish and characterise a new human breast carcinoma xenograft obtained from a woman carrying a germline *BRCA2* mutation.
METHODS: A transplantable xenograft was obtained by grafting a breast cancer sample into nude mice. The biological and genetic profiles of the xenograft were compared with that of the patient's tumour using histology, immunohistochemistry (IHC), *BRCA2* sequencing, comparative genomic hybridisation (CGH), and qRT–PCR. Tumour response to standard chemotherapies was evaluated.
RESULTS: Histological profile identified the tumour as a basal-like triple-negative breast cancer. Targeted *BRCA2* DNA sequencing of the xenograft showed the presence of the mutation previously identified in the carrier. Comparative genomic hybridisation array profiles of the primary tumour and the xenograft revealed a high number of similar genetic alterations. The therapeutic assessment of the xenograft showed sensitivity to anthracyclin-based chemotherapy and resistance to docetaxel. The xenograft was also highly sensitive to radiotherapy and cisplatin-based treatments.
CONCLUSIONS: This study describes a new human breast cancer xenograft obtained from a *BRCA2*-mutated patient. This xenograft provides a new model for the pre-clinical drug development and for the exploration of the drug response biological basis.
British Journal of Cancer (2010) **103,** 1192 – 1200. doi:10.1038/sj.bjc.6605900 www.bjcancer.com
Published online 28 September 2010
© 2010 Cancer Research UK

Keywords: BRCA2 mutation; human breast cancer xenograft; preclinical model

Germline *BRCA2* mutations in female carriers confer a cumulative breast cancer risk at age 70 years of 49% (95% CI: 40–57%), an ovarian cancer risk of 18% (95% CI: 13–23%), and a moderate increased risk of pancreatic cancer (Chen and Parmigiani, 2007).

Although the available evidence is not sufficient to decisively conclude that the clinical outcome of women with *BRCA1/2*-associated breast cancer differs significantly from those of women with sporadic tumours, *BRCA1*-associated breast cancer often manifests adverse outcome features.

Establishment of pre-clinical models, which accurately reflect the genetic and phenotypic features of primary tumours, and their response to treatment, is an important step in identifying novel therapeutic targets and testing new treatment modalities. New strategies may take advantage of the specific DNA repair defects inherent in *BRCA*-deficient cells, such as the defect in homologous recombination. In fact, most of the insights into the functions of the BRCA2 protein have included key insights from studies of mice by the use of gene targeting and from studies of altered mouse embryonic cells (Evers and Jonkers, 2006).

BRCA2 has a key role in DNA double-strand break repair and cell-cycle control. BRCA2-related defects are associated with chromosomal abnormalities, a hallmark of the genomic instability that could foster tumourigenesis. Moreover, BRCA2 participates in the regulation of mitosis and cytokinesis that contribute to numerical chromosomal stability.

Although conventional, non-conditional, mouse mutants might be used to model familial forms of cancer, they do not mimic sporadic tumourigenesis because the initiating mutation is present in all cells of the body, including those that constitute the tumour microenvironment.

Moreover, embryonic lethality and development of non-epithelial tumours are another important limitation of genetically mutated *Brca2* mice. Some murine *Brca2* mutant mammary tumour models develop mammary tumours with histopathological features that are significantly different to their human counterparts. Although some studies report a strikingly similar histopathology in *BRCA1* null breast tumours from mice and

*Correspondence: Dr E Marangoni; E-mail: Elisabetta.Marangoni@curie.fr
Received 30 April 2010; revised 30 July 2010; accepted 3 August 2010; published online 28 September 2010

Reyal et al. Breast Cancer Research 2012, 14:R11
http://breast-cancer-research.com/content/14/1/R11

Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts

Fabien Reyal[1†], Charlotte Guyader[2†], Charles Decraene[2,3], Carlo Lucchesi[4], Nathalie Auger[2], Franck Assayag[2], Ludmilla De Plater[2], David Gentien[5], Marie-France Poupon[2], Paul Cottu[2,6], Patricia De Cremoux[7], Pierre Gestraud[8], Anne Vincent-Salomon[7], Jean-Jacques Fontaine[9], Sergio Roman-Roman[2], Olivier Delattre[4], Didier Decaudin[2,6] and Elisabetta Marangoni[2*]

Abstract

Introduction: Identification of new therapeutic agents for breast cancer (BC) requires preclinical models that reproduce the molecular characteristics of their respective clinical tumors. In this work, we analyzed the genomic and gene expression profiles of human BC xenografts and the corresponding patient tumors.

Methods: Eighteen BC xenografts were obtained by grafting tumor fragments from patients into Swiss nude mice. Molecular characterization of patient tumors and xenografts was performed by DNA copy number analysis and gene expression analysis using Affymetrix Microarrays.

Results: Comparison analysis showed that 14/18 pairs of tumors shared more than 56% of copy number alterations (CNA). Unsupervised hierarchical clustering analysis showed that 16/18 pairs segregated together, confirming the similarity between tumor pairs. Analysis of recurrent CNA changes between patient tumors and xenografts showed losses in 176 chromosomal regions and gains in 202 chromosomal regions. Gene expression profile analysis showed that less than 5% of genes had recurrent variations between patient tumors and their respective xenografts; these genes largely corresponded to human stromal compartment genes. Finally, analysis of different passages of the same tumor showed that sequential mouse-to-mouse tumor grafts did not affect genomic rearrangements or gene expression profiles, suggesting genetic stability of these models over time.

Conclusions: This panel of human BC xenografts maintains the overall genomic and gene expression profile of the corresponding patient tumors and remains stable throughout sequential in vivo generations. The observed genomic profile and gene expression differences appear to be due to the loss of human stromal genes. These xenografts, therefore, represent a validated model for preclinical investigation of new therapeutic agents.

Keywords: Breast cancer, xenograft, genomic and expression profiles

Introduction

Breast cancer (BC) is the most commonly diagnosed cancer and remains the leading cause of worldwide cancer-related death in women [1]. A better understanding of BC biology is essential in order to identify new targeted therapies and tumors with molecular profiles that will respond to the targeted treatment. Gene expression profiling of invasive BC has defined three main tumor subtypes with very specific features (Luminal, Basal, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)) [2]. It is now common knowledge that the pathologic characteristics, array comparative genomic hybridization (aCGH) profiles, gene and miRNA expression profiles and activated pathways are radically different among these subtypes, supporting the view that BC is a disease composed of very different and independent molecular subgroups. These subtypes have also been shown to differ in terms of clinical presentation (that is, differences in axillary lymph node involvement, local and regional recurrence, metastatic patterns and overall prognosis), and in their sensitivity to systemic treatment [3].

* Correspondence: elisabetta.marangoni@curie.fr
† Contributed equally
[2]Translational Research Department, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France
Full list of author information is available at the end of the article

©2012 Reyal et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

FULL PAPER

BJC

British Journal of Cancer (2013) 108, 1720–1731 | doi: 10.1038/bjc.2013.132

Keywords: colorectal cancer; colospheres; three-dimension; *ex vivo* model

A short-term colorectal cancer sphere culture as a relevant tool for human cancer biology investigation

L-B Weiswald[1,2,12], S Richon[1,3], G Massonnet[1,4], J-M Guinebretière[5], S Vacher[6], I Laurendeau[3,7], P Cottu[4,8], E Marangoni[4], F Nemati[4], P Validire[9], D Bellet[2,10], I Bièche[3,6,7] and V Dangles-Marie*[,1,4,11]

[1]IFR71 Sciences du Médicament, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 Avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris, France; [2]Laboratoire d'Oncobiologie, Hôpital René Huguenin, Institut Curie, 35 Rue Dailly, F-92210 St Cloud, France; [3]IMTCE, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 Avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris, France; [4]Laboratoire d'Investigation Préclinique, Département de Transfert, Centre de Recherche, Institut Curie, 26 Rue d'Ulm, F-75005 Paris, France; [5]Service de Pathologie, Hôpital René Huguenin, Institut Curie, 35 Rue Dailly, F-92210 St Cloud, France; [6]Laboratoire d'Oncogénétique, Hôpital René Huguenin, Institut Curie, 35 Rue Dailly, F-92210 St Cloud, France; [7]UMR745 INSERM, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 Avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris, France; [8]Département d'Oncologie Médicale, Institut Curie, 26 Rue d'Ulm, F-75005 Paris, France; [9]Département d'Anatomie Pathologique, Institut Mutualiste Montsouris, 42 Boulevard Jourdan, F-75014 Paris, France; [10]UMR 8151 CNRS—U1022 Inserm, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 Avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris, France and [11]U932, Centre de Recherche, Institut Curie, 26 Rue d'Ulm, F-75005 Paris, France

Background: *Ex vivo* colospheres have been previously characterised as a colorectal cancer (CRC) well-rounded multicellular model, exclusively formed by carcinoma cells, and derived from fresh CRC tissue after mechanical dissociation. The ability to form colospheres was correlated with tumour aggressiveness. Their three-dimensional conformation prompted us to further investigate their potential interest as a preclinical cancer tool.

Methods: Patient-derived CRC xenografts were used to produce numerous colospheres. Mechanism of formation was elucidated by confocal microscopy. Expression analysis of a panel of 64 selected cancer-related genes by real-time qRT–PCR and hierarchical clustering allowed comparison of colospheres with parent xenografts. *In vitro* and *in vivo* assays were performed for migration and chemosensitivity studies.

Results: Colospheres, formed by tissue remodelling and compaction, remained viable several weeks in floating conditions, escaping anoikis through their strong cell–cell interactions. Colospheres matched the gene expression profile of the parent xenograft tissue. Colosphere-forming cells migrated in collagen I matrix and metastasised when subrenally implanted in *nude* mice. Besides, the colosphere responses to 5-fluorouracil and irinotecan, two standard drugs in CRC, reproduced those of the *in vivo* original xenografts.

Conclusion: Colospheres closely mimic biological characteristics of *in vivo* CRC tumours. Consequently, they would be relevant *ex vivo* CRC models.

*Correspondence: Dr V Dangles-Marie; E-mail: virginie.dangles-marie@curie.fr
[12]Current address: Division of Gastroenterology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada, Genome Sciences Centre, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, British Columbia, Canada V6T124.

Received 12 November 2012; revised 1 March 2013; accepted 5 March 2013; published online 28 March 2013

© 2013 Cancer Research UK. All rights reserved 0007 – 0920/13

5. SUIVI A LONG TERME DES PATIENTES

Cette table rapporte les données de suivi à long terme des patientes dont la tumeur initiale a permis de générer une PDX.

HBCx	Age au diagnostic	TNM initial	Traitement initial	Devenir
3*	54	T1N2	Tamoxifène	Rechute locale à 7 mois M+ os à 9 ans Décès à 12 ans
22	46	T2N1	Tamoxifène	RC à 8 ans
34	37	T1N0	Decapeptyl	RC à 7 ans
53*	32	T3N2	Tamoxifène	M+ foie à 18 mois
74	54	T2NxM1	Létrozole	M+ diffuse d'emblée Progression à 9 mois de létrozole

M+ : métastase
RC : rémission complète
*PDX d'emblée résistantes au tamoxifène

BIBLIOGRAPHIE

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin 65:5–29, 2015

2. Clemons M, Goss P: Estrogens and the risk of breast cancer. New Eng J Med 344:276–285, 2001

3. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, et al: Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. Ann Oncol 26 Suppl 5:v8–v30, 2015

4. Coates a S, Winer EP, Goldhirsch A, et al: Tailoring therapies - improving the management of early breast cancer: St GallenInternational Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Ann Oncol 26:1533–1546, 2015

5. Cardoso F, Costa a, Norton L, et al: ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2)†. Ann Oncol 25:1871–88, 2014

6. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group: Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. Lancet 386:1341–1352, 2015

7. Cameron D, Brown J, Dent R, et al: Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 14:933–42, 2013

8. 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 (London, England) 382:1021–8, 2013

9. Miles DW, Dieras V, Cortes J, et al: First-line bevacizumab in combination with chemotherapy for HER2-negative metastatic breast cancer: pooled and subgroup analyses of data from 2447 patients. Ann Oncol 24:2773–2780, 2013

10. Riemsma R, Forbes C a, Kessels a, et al: Systematic review of aromatase inhibitors in the first-line treatment for hormone sensitive advanced or metastatic breast cancer. Breast Cancer Res Treat 123:9–24, 2010

11. Chia S, Gradishar W, Mauriac L, et al: Double-blind, randomized placebo controlled trial of fulvestrant compared with exemestane after prior nonsteroidal aromatase inhibitor therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive, advanced breast cancer: results from EFECT. J Clin Oncol 26:1664–70, 2008

12. Bergh J, Jönsson P-E, Lidbrink EK, et al: FACT: an open-label randomized phase III study of fulvestrant and anastrozole in combination compared with anastrozole alone as first-line therapy for patients with receptor-positive postmenopausal breast cancer. J Clin Oncol 30:1919–25, 2012

13. Mehta RS, Barlow WE, Albain KS, et al: Combination anastrozole and fulvestrant in metastatic breast cancer. N Engl J Med 367:435–44, 2012

14. 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. J Clin Oncol 31:3997–4013, 2013

15. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al: Molecular portraits of human breast tumours. Nature 533:747–752, 2000

16. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci 98:10869–10874, 2001

17. Guiu S, Michiels S, Andre F, et al: Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. Ann Oncol 23:2997–3006, 2012

18. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, et al: Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. Lancet Oncol 11:174–83, 2010

19. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al: Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst 101:736–50, 2009

20. 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 16:5222–5232, 2010

21. Burstein HJ, Temin S, Anderson H, et al: Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. J Clin Oncol 32:1–16, 2014

22. Vaz-Luis I, Ottesen R a, Hughes ME, et al: Impact of hormone receptor status on patterns of recurrence and clinical outcomes among patients with human epidermal growth factor-2-positive breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network: a prospective cohort study. Breast Cancer Res 14:R129, 2012

23. Cutuli B, Dalenc F, Cottu PH, et al: Impact of screening on clinicopathological features and treatment for invasive breast cancer: Results of two national surveys. Cancer Radiother 19:295–302, 2015

24. Barnard ME, Boeke CE, Tamimi RM: Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. Biochim Biophys Acta 1856:73–85, 2015

25. Ignatiadis M, Sotiriou C: Luminal breast cancer: from biology to treatment. Nat Rev Clin Oncol 10:494–506, 2013

26. Carracedo A, Salido M, Corominas JM, et al: Are ER+PR+ and ER+PR- breast tumors genetically different? A CGH array study. Cancer Genet 205:138–46, 2012

27. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al: Signatures of mutational processes in human cancer. Nature 500:415–21, 2013

28. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, et al: Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. Cell 149:979–93, 2012

29. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al: Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. Nature 502:333–9, 2013

30. Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, et al: Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. Nat Genet 45:1127–1133, 2013

31. Folkerd EJ, Dowsett M: Influence of Sex Hormones on Cancer Progression. J Clin Oncol 28:4038–4044, 2010

32. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å: Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 29:557–568, 2015

33. Thomas C, Gustafsson J-Å: The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. Nat Rev Cancer 11:597–608, 2011

34. Jordan VC: Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. Eur J Cancer 44:30–8, 2008

35. ATAC Trialists' Group: Results of the ATAC (Arimidex , Tamoxifen , Alone or in Combination) trial after completion of 5 years ' adjuvant. Lancet (London, England) 365:60–62, 2005

36. Davies C, Godwin J, Gray R, et al: Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. Lancet 378:771–84, 2011

37. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, et al: Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. J Clin Oncol 28:509–18, 2010

38. Cuzick J, Sestak I, Baum M, et al: Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncol 11:1135–41, 2010

39. Colleoni M, Giobbie-Hurder A, Regan MM, et al: Analyses adjusting for selective crossover show improved overall survival with adjuvant letrozole compared with tamoxifen in the BIG 1-98 study. J Clin Oncol 29:1117–24, 2011

40. Jakesz R, Greil R, Gnant M, et al: Extended adjuvant therapy with anastrozole among postmenopausal breast cancer patients: results from the randomized Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 6a. J Natl Cancer Inst 99:1845–53, 2007

41. Saphner BT, Tormey DC, Gray R: Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer After Primary Therapy. J Clin Oncol 14:2738–2746, 1996

42. Zhang XH-F, Giuliano M, Trivedi M V, et al: Metastasis dormancy in estrogen receptor-positive breast cancer. Clin Cancer Res 19:6389–97, 2013

43. Goss PE, Chambers AF: Does tumour dormancy offer a therapeutic target? Nat Rev Cancer 10:871–7, 2010

44. Osborne CK, Schiff R: Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. Annu Rev Med 62:233–47, 2011

45. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, et al: Estrogen Receptor Status by Immunohistochemistry Is Superior to the Ligand-Binding Assay for Predicting Response to Adjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer. J Clin Oncol 17:1474–1481, 1999

46. Dowsett M, Allred C, Knox J, et al: Relationship Between Quantitative Estrogen and Progesterone Receptor Expression and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2) Status With Recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination Trial. J Clin Oncol 26:1059–1065, 2008

47. Yi M, Huo L, Koenig KB, et al: Which threshold for ER positivity? a retrospective study based on 9639 patients. Ann Oncol 25:1004–1011, 2014

48. Iwamoto T, Booser D, Valero V, et al: Estrogen Receptor (ER) mRNA and ER-Related Gene Expression in Breast Cancers That Are 1% to 10% ER-Positive by Immunohistochemistry. J Clin Oncol 30:729–734, 2012

49. Finn RS, Press MF, Dering J, et al: Quantitative ER and PgR assessment as predictors of benefit from lapatinib in postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. Clin Cancer Res 20:736–43, 2014

50. Viale G, Regan MM, Dell'Orto P, et al: Which patients benefit most from adjuvant aromatase inhibitors? Results using a composite measure of prognostic risk in the BIG 1-98 randomized trial. Ann Oncol 22:2201–7, 2011

51. Prat A, Parker JS, Fan C, et al: Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. Ann Oncol 23:2866–2873, 2012

52. Davies C, Pan H, Godwin J, et al: Articles 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 6736, 2012

53. Petrelli F, Coinu A, Cabiddu M, et al: Five or more years of adjuvant endocrine therapy in breast cancer: a meta-analysis of published randomised trials. Breast Cancer Res Treat 140:233–240, 2013

54. Leal F, Liutti VT, Antunes dos Santos VC, et al: Neoadjuvant endocrine therapy for resectable breast cancer: A systematic review and meta-analysis. The Breast 24:406–412, 2015

55. Von Minckwitz G, Schmitt WD, Loibl S, et al: Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. Clin Cancer Res 19:4521–31, 2013

56. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al: Short-Term Changes in Ki-67 during Neoadjuvant Treatment of Primary Breast Cancer with Anastrozole or Tamoxifen Alone or Combined Correlate with Recurrence-Free Survival Short-Term Changes in Ki-67 during Neoadjuvant Treatment of Primary Breast Cancer wit. Clin Cancer Res 11:951s–958s, 2005

57. Ellis MJ, Tao Y, Luo J, et al: Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. J Natl Cancer Inst 100:1380–1388, 2008

58. Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, et al: Biomarker changes during neoadjuvant anastrozole, tamoxifen, or the combination: influence of hormonal status and HER-2 in breast cancer--a study from the IMPACT trialists. J Clin Oncol 23:2477–92, 2005

59. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, et al: Randomized phase II neoadjuvant comparison between letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based int. J Clin Oncol 29:2342–9, 2011

60. Miller WR, Larionov A, Renshaw L, et al: Gene expression profiles differentiating between breast cancers clinically responsive or resistant to letrozole. J Clin Oncol 27:1382–7, 2009

61. Dunbier AK, Ghazoui Z, Anderson H, et al: Molecular Profiling of Aromatase Inhibitor-Treated Postmenopausal Breast Tumors Identifies Immune-Related Correlates of Resistance. Clin Cancer Res 19:2775–2786, 2013

62. Turnbull AK, Arthur LM, Renshaw L, et al: Accurate Prediction and Validation of Response to Endocrine Therapy in Breast Cancer. J Clin Oncol 33:2270–8, 2015

63. Ufen M-P, Kohne CH, Wischneswky M, et al: Metastatic breast cancer: are we treating the same patients as in the past? Ann Oncol 25:95–100, 2013

64. Bishop AJ, Ensor J, Moulder SL, et al: Prognosis for patients with metastatic breast cancer who achieve a no-evidence-of-disease status after systemic or local therapy. Cancer DOI: 10.1002/cncr.29681, 2015

65. Frasor J, Danes JM, Komm B, et al: Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. Endocrinology 144:4562–74, 2003

66. Elledge R, Green S, Pugh R, et al: Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immunohistochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. Int J cancer 89:111–117, 2000

67. Ravdin PM, Green S, Dorr T, et al: Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. J Clin Oncol1 10:1284–1291, 1992

68. Mohammed H, Russell IA, Stark R, et al: Progesterone receptor modulates ERα action in breast cancer. Nature 523:313–317, 2015

69. Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, et al: Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. Nucleic Acids Res 10:7895–7903, 1982

70. Mathelin C, Tomasetto C, Rio M: Trefoil factor 1 (pS2/TFF1), a peptide with numerous functions. Bull Cancer2 92:773–781, 2005

71. Amiry N, Kong X, Muniraj N, et al: Trefoil factor 1 (pS2/TFF1), a peptide with numerous functions. Endocrinology 150:4473–4483, 2009

72. Balfe P, McCann A, McGoldrick A, et al: Estrogen receptor alpha and beta profiling in human breast cancer. Eur J Surg Oncol 30:469–474, 2004

73. Honma N, Horii R, Iwase T, et al: Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. J Clin Oncol 26:3727–3734, 2008

74. Barone I, Brusco L, Fuqua S a W: Estrogen receptor mutations and changes in downstream gene expression and signaling. Clin Cancer Res 16:2702–8, 2010

75. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, et al: ESR1 mutations-a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. Nat Rev Clin Oncol 12:573–83, 2015

76. The Cancer Genome Atlas: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature 490:61–70, 2012

77. Musgrove E a, Sutherland RL: Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. Nat Rev Cancer 9:631–43, 2009

78. Li S, Shen D, Shao J, et al: Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. Cell Rep 4:1116–30, 2013

79. Wang Z, Zhang X, Shen P, et al: A variant of estrogen receptor-{alpha}, hER-{alpha}36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 103:9063–9068, 2006

80. Massarweh S, Schiff R: Unraveling the mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: new therapeutic opportunities. Clin Cancer Res 13:1950–4, 2007

81. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, et al: Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. Endocr Rev 32:597–622, 2011

82. Lahusen T, Henke RT, Kagan BL, et al: in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 116:225–237, 2010

83. Lonard DM, Lanz RB, O'Malley BW: Nuclear receptor coregulators and human disease. Endocr Rev 28:575–87, 2007

84. Jozwik KM, Carroll JS: Pioneer factors in hormone-dependent cancers. Nat Rev Cancer 12:381–385, 2012

85. Kouros-Mehr H, Bechis SK, Slorach EM, et al: GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. Cancer Cell 13:141–52, 2008

86. Hurtado A, Holmes K a, Ross-Innes CS, et al: FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response. Nat Genet 43:27–33, 2011

87. Jiang Y-Z, Yu K-D, Zuo W-J, et al: GATA3 mutations define a unique subtype of luminal-like breast cancer with improved survival. Cancer 120:1329–1337, 2014

88. Stearns V: Active Tamoxifen Metabolite Plasma Concentrations After Coadministration of Tamoxifen and the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Paroxetine. CancerSpectrum Knowl Environ 95:1758–1764, 2003

89. Borges S, Desta Z, Li L, et al: Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. Clin Pharmacol Ther 80:61–74, 2006

90. Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, et al: Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. J Clin Oncol 23:9312–8, 2005

91. Beverage JN, Sissung TM, Sion AMYM, et al: CYP2D6 Polymorphisms and the Impact on Tamoxifen Therapy. Metab Clin Exp 96:2224–2231, 2007

92. Nowell S, Ahn J, Rae J, et al: Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 91:249–258, 2005

93. Lim H-S, Ju Lee H, Seok Lee K, et al: Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. J Clin Oncol 25:3837–45, 2007

94. Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, et al: Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. J Clin Oncol 25:5187–93, 2007

95. Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, et al: The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. Breast Cancer Res Treat 101:113–21, 2007

96. Cuzick J, Sestak I, Cella D, et al: Treatment-emergent endocrine symptoms and the risk of breast cancer recurrence: a retrospective analysis of the ATAC trial. Lancet Oncol 9:1143–8, 2008

97. Wegman P, Vainikka L, Stål O, et al: Genotype of metabolic enzymes and the benefit of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. Breast Cancer Res 7:R284–90, 2005

98. Dezentjé V, van Schaik R, Vletter-Bogaartz J, et al: CYP2D6 genotype in relation to tamoxifen efficacy in a Dutch cohort of the tamoxifen exemestane adjuvant multinational (TEAM) trial. Breast Cancer Res Treat 140:363–373, 2013

99. Regan MM, Leyland-Jones B, Bouzyk M, et al: CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. J Natl Cancer Inst 104:441–51, 2012

100. Goetz MP, Suman VJ, Hoskin TL, et al: CYP2D6 Metabolism and Patient Outcome in the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial (ABCSG) 8. Clin Cancer Res 19:500–507, 2012

101. Wang L, Ellsworth K a., Moon I, et al: Functional Genetic Polymorphisms in the Aromatase Gene CYP19 Vary the Response of Breast Cancer Patients to Neoadjuvant Therapy with Aromatase Inhibitors. Cancer Res 70:319–328, 2010

102. Colomer R, Monzo M, Tusquets I, et al: A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. Clin Cancer Res 14:811–6, 2008

103. Pietras RJ, Márquez-Garbán DC: Membrane-associated estrogen receptor signaling pathways in human cancers. Clin Cancer Res 13:4672–6, 2007

104. Van Agthoven T, Sieuwerts AM, Meijer-van Gelder ME, et al: Relevance of breast cancer antiestrogen resistance genes in human breast cancer progression and tamoxifen resistance. J Clin Oncol 27:542–9, 2009

105. Dati C, Antoniotti S, Taverna D, et al: Inhibition of c-erbB-2 oncogene expression by estrogens in human breast cancer cells. Oncogene 5:1001–1006, 1990

106. Thrane S, Lykkesfeldt AE, Larsen MS, et al: Estrogen receptor α is the major driving factor for growth in tamoxifen-resistant breast cancer and supported by HER/ERK signaling. Breast Cancer Res Treat 139:71–80, 2013

107. Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK, et al: Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. FEBS Lett 567:243–7, 2004

108. Hurtado A, Holmes K a, Geistlinger TR, et al: Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. Nature 456:663–6, 2008

109. Johnston S, Pippen J, Pivot X, et al: Lapatinib Combined With Letrozole Versus Letrozole and Placebo As First-Line Therapy for Postmenopausal Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. J Clin Oncol 27:5538–5546, 2009

110. Baselga J, Semiglazov V, van Dam P, et al: Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. J Clin Oncol 27:2630–7, 2009

111. Burstein HJ, Cirrincione CT, Barry WT, et al: Endocrine therapy with or without inhibition of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor 2: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of fulvestrant with or without lapatinib for postmenopausal women. J Clin Oncol 32:3959–66, 2014

112. Ziauddin MF, Hua D, Tang S-C: Emerging strategies to overcome resistance to endocrine therapy for breast cancer. Cancer Metastasis Rev 33:791–807, 2014

113. Deblois G, Hall J a, Perry M-C, et al: Genome-wide identification of direct target genes implicates estrogen-related receptor alpha as a determinant of breast cancer heterogeneity. Cancer Res 69:6149–57, 2009

114. Heck S, Rom J, Thewes V, et al: Estrogen-related receptor alpha expression and function is associated with the transcriptional coregulator AIB1 in breast carcinoma. Cancer Res 69:5186–93, 2009

115. Thewes V, Simon R, Schroeter P, et al: Reprogramming of the ERRα and ERα Target Gene Landscape Triggers Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. Cancer Res 75 :720–731, 2015

116. Chalhoub N, Baker SJ: PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. Annu Rev Pathol 4:127–150, 2009

117. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM: mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. Nat Rev Mol Cell Biol 12:21–35, 2011

118. Menon S, Manning BD: Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. Oncogene 27:S43–S51, 2009

119. Liu S, Knapp S, Ahmed AA: The Structural Basis of PI3K Cancer Mutations : From Mechanism to Therapy The Structural Basis of PI3K Cancer Mutations : From Mechanism to Therapy. Cancer Res 74:641–646, 2014

120. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ: PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. Nat Rev Cancer 15:7–24, 2015

121. Hanahan D, Weinberg R a: Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144:646–74, 2011

122. Patani N, Martin L-A: Understanding response and resistance to oestrogen deprivation in ER-positive breast cancer. Mol Cell Endocrinol 382:683–94, 2014

123. Murphy LC, Seekallu S V, Watson PH: Clinical significance of estrogen receptor phosphorylation. Endocr Relat Cancer 18:R1–14, 2011

124. Bayliss J, Hilger A, Vishnu P, et al: Reversal of the estrogen receptor negative phenotype in breast cancer and restoration of antiestrogen response. Clin Cancer Res 13:7029–36, 2007

125. Frogne T, Jepsen JS, Larsen SS, et al: Antiestrogen-resistant human breast cancer cells require activated protein kinase B/Akt for growth. Endocr Relat Cancer 12:599–614, 2005

126. Miller TW, Hennessy BT, González-angulo AM, et al: Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor – positive human breast cancer. J clin invest 120:2406–2413, 2010

127. Bachman K, Argani P, Samuels Y, et al: The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. Cancer Biol Ther 3:772–775, 2004

128. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, et al: An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. Cancer Res 68:6084–91, 2008

129. Sabine VS, Crozier C, Brookes CL, et al: Mutational analysis of PI3K/AKT signaling pathway in tamoxifen exemestane adjuvant multinational pathology study. J Clin Oncol 32:2951–8, 2014

130. Zardavas D, Phillips WA, Loi S: PIK3CA mutations in breast cancer : reconciling findings from preclinical and clinical data. Breast Cancer Res 16:201–210, 2014

131. Koren S, Reavie L, do Couto JP, et al: PIK3CAH1047R induces multipotency and multi-lineage mammary tumours. Nature 525:114–118, 2015

132. Van Keymeulen A, Lee MY, Ousset M, et al: Reactivation of multipotency by oncogenic PIK3CA induces breast tumour heterogeneity. Nature 525:119–123, 2015

133. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, et al: PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. Clin Cancer Res 15:5049–59, 2009

134. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, et al: Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. Clin Cancer Res 13:6064–9, 2007

135. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, et al: Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. Am J Pathol 170:793–804, 2007

136. Creighton CJ, Massarweh S, Huang S, et al: Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. Cancer Res 68:7493–501, 2008

137. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, et al: A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. Clin Cancer Res 13:3989–98, 2007

138. Bergamaschi A, Hjortland GO, Triulzi T, et al: Molecular profiling and characterization of luminal-like and basal-like in vivo breast cancer xenograft models. Mol Oncol 3:469–482, 2009

139. Kabos P, Finlay-Schultz J, Li C, et al: Patient-derived luminal breast cancer xenografts retain hormone receptor heterogeneity and help define unique estrogen-dependent gene signatures. Breast Cancer Res Treat 135:415–432, 2012

140. Petrillo L a, Wolf DM, Kapoun AM, et al: Xenografts faithfully recapitulate breast cancer-specific gene expression patterns of parent primary breast tumors. Breast Cancer Res Treat 135:913–22, 2012

141. DeRose YS, Wang G, Lin Y-C, et al: Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. Nat Med 17:1514–20, 2011

142. Marangoni E, Poupon M-F: Patient-derived tumour xenografts as models for breast cancer drug development. Curr Opin Oncol 26:556–561, 2014

143. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, et al: Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. Nat Rev Clin Oncol 9:338–50, 2012

144. Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL: Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. Nat Rev Cancer 15:311–316, 2015

145. Siolas D, Hannon GJ: Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. Cancer Res 73:5315–9, 2013

146. Whittle JR, Lewis MT, Lindeman GJ, et al: Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. Breast Cancer Res 17:17, 2015

147. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al: Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biol 8:e1000412, 2010

148. De Cremoux P, Bieche I, Tran-Perennou C, et al: Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Endocr Relat Cancer 11:489–495, 2004

149. De Cremoux P, Tran-Perennou C, Elie C, et al: Quantitation of estradiol receptors alpha and beta and progesterone receptors in human breast tumors by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Correlation with protein assays. Biochem Pharmacol 64:507–515, 2002

150. De Plater L, Laugé A, Guyader C, et al: Establishment and characterisation of a new breast cancer xenograft obtained from a woman carrying a germline BRCA2 mutation. Br J Cancer 103:1192–200, 2010

151. Hupé P, Stransky N, Thiery J-P, et al: Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions. Bioinformatics 20:3413–22, 2004

152. La Rosa P, Viara E, Hupé P, et al: VAMP: visualization and analysis of array-CGH, transcriptome and other molecular profiles. Bioinformatics 22:2066–73, 2006

153. McLaughlin L, Dickmann LJ, Wolf CR, et al: Functional expression and comparative characterization of nine murine cytochromes P450 by fluorescent inhibition screening. Drug Metab Dispos 36:1322–31, 2008

154. Reyal F, Guyader C, Decraene C, et al: Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. Breast Cancer Res 14:R11, 2012

155. Cassidy JW, Caldas C, Bruna A: Maintaining Tumor Heterogeneity in Patient-Derived Tumor Xenografts. Cancer Res 2963–2969, 2015

156. Hoffman RM: Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. Nat Rev Cancer 15:451–452, 2015

157. Cheung LWT, Hennessy BT, Li J, et al: High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. Cancer Discov 1:170–85, 2011

158. Cheung LWT, Yu S, Zhang D, et al: Naturally occurring neomorphic PIK3R1 mutations activate the MAPK pathway, dictating therapeutic response to MAPK pathway inhibitors. Cancer Cell 26:479–94, 2014

159. Amirouchene-Angelozzi N, Nemati F, Gentien D, et al: Establishment of novel cell lines recapitulating the genetic landscape of uveal melanoma and preclinical validation of mTOR as a therapeutic target. Mol Oncol 8:1508–1520, 2014

160. Tuefferd M, Bondt A De, Wyngaert I Van Den, et al: Genome-Wide Copy Number Alterations Detection in Fresh Frozen and Matched FFPE Samples Using SNP 6 . 0 Arrays. Genes Chromosom Cancer 964:957–964, 2008

161. Theodorou V, Stark R, Menon S, et al: GATA3 acts upstream of FOXA1 in mediating ESR1 binding by shaping enhancer accessibility. Genome Res 23:12–22, 2013

162. Magnani L, Ballantyne EB, Zhang X, et al: PBX1 Genomic Pioneer Function Drives ERα Signaling Underlying Progression in Breast Cancer. PLoS Genet 7:e1002368, 2011

163. Mohammed H, D'Santos C, Serandour A a, et al: Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. Cell Rep 3:342–9, 2013

164. Piccart M, Hortobagyi GN, Campone M, et al: Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2. Ann Oncol 25:2357–2362, 2014

165. Beck JT, Hortobagyi GN, Campone M, et al: Everolimus plus exemestane as first-line therapy in HR^+, $HER2^-$ advanced breast cancer in BOLERO-2. Breast Cancer Res Treat 143:459–67, 2014

166. Baselga J, Campone M, Piccart M, et al: Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. N Engl J Med 366:520–9, 2012

167. Bachelot T, Bourgier C, Cropet C, et al: Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study. J Clin Oncol 30:2718–24, 2012

168. Ma CX, Reinert T, Chmielewska I, et al: Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. Nat Rev Cancer 15:261–275, 2015

169. Hurvitz S a, Kalous O, Conklin D, et al: In vitro activity of the mTOR inhibitor everolimus, in a large panel of breast cancer cell lines and analysis for predictors of response. Breast Cancer Res Treat 149:669–80, 2015

170. Vargo-Gogola T, Rosen JM: Modelling breast cancer: one size does not fit all. Nat Rev Cancer 7:659–72, 2007

171. Murphy E: Characteristic Tumors, in Biology of the Laboratory Mouse; EL Green Ed, Mc Graw Hill, New-York. 1966, p Chapter 27

172. McIntyre RE, van der Weyden L, Adams DJ: Cancer gene discovery in the mouse. Curr Opin Genet Dev 22:14–20, 2012

173. Van Miltenburg MH, Jonkers J: Using genetically engineered mouse models to validate candidate cancer genes and test new therapeutic approaches. Curr Opin Genet Dev 22:21–7, 2012

174. Blyth K, Morton JP, Sansom OJ: The right time, the right place: will targeting human cancer-associated mutations to the mouse provide the perfect preclinical model? Curr Opin Genet Dev 22:28–35, 2012

175. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Bertucci F, et al: ALDH1-positive cancer stem cells predict engraftment of primary breast tumors and are governed by a common stem cell program. Cancer Res 73:7290–300, 2013

176. Hidalgo M, Bruckheimer E, Rajeshkumar N V, et al: A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer. Mol Cancer Ther 10:1311–6, 2011

177. Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, et al: A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. Eur J Cancer 50:277–289, 2014

178. Amir E, Clemons M, Purdie C a., et al: Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: Pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies. Cancer Treat Rev 38:708–714, 2012

179. Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, et al: Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. Breast Cancer Res 16:R65, 2014

180. Bines J, Dienstmann R, Obadia RM, et al: Activity of megestrol acetate in postmenopausal women with advanced breast cancer after nonsteroidal aromatase inhibitor failure: a phase II trial. Ann Oncol 25:831–6, 2014

181. Ellis MJ, Ding L, Shen D, et al: Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. Nature 486:353–60, 2012

182. Madden SF, Clarke C, Gaule P, et al: BreastMark: An Integrated Approach to Mining Publicly Available Transcriptomic Datasets Relating to Breast Cancer Outcome. Breast Cancer Res 15:R52, 2013

183. Györffy B, Lanczky A, Eklund A, et al: An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. Breast Cancer Res Treat 123:725–731, 2010

184. Mizuno H, Kitada K, Nakai K, et al: PrognoScan: a new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. BMC Med Genomics 2:18, 2009

185. Magnani L, Stoeck A, Zhang X, et al: Genome-wide reprogramming of the chromatin landscape underlies endocrine therapy resistance in breast cancer. Proc Natl Acad Sci 110:E1490–E1499, 2013

186. Masri S, Phung S, Wang X, et al: Genome-wide analysis of aromatase inhibitor-resistant, tamoxifen-resistant, and long-term estrogen-deprived cells reveals a role for estrogen receptor. Cancer Res 68:4910–8, 2008

187. Stone A, Valdés-Mora F, Gee JMW, et al: Tamoxifen-Induced Epigenetic Silencing of Oestrogen-Regulated Genes in Anti-Hormone Resistant Breast Cancer. PLoS One 7:e40466, 2012

188. Aguilar H, Solé X, Bonifaci N, et al: Biological reprogramming in acquired resistance to endocrine therapy of breast cancer. Oncogene 29:6071–6083, 2010

189. Taylor KJ, Sims AH, Liang L, et al: Dynamic changes in gene expression in vivo predict prognosis of tamoxifen-treated patients with breast cancer. Breast Cancer Res 12:R39, 2010

190. Patani N, Dunbier AK, Anderson H, et al: Differences in the transcriptional response to fulvestrant and estrogen deprivation in ER-positive breast cancer. Clin Cancer Res 20:3962–73, 2014

191. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JH a, et al: Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. Mol Cancer Res 5:195–201, 2007

192. Ellis MJ, Lin L, Crowder R, et al: Phosphatidyl-inositol-3-kinase alpha catalytic subunit mutation and response to neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. Breast Cancer Res Treat 119:379–390, 2011

193. López-Knowles E, Segal C V, Gao Q, et al: Relationship of PIK3CA mutation and pathway activity with antiproliferative response to aromatase inhibition. Breast Cancer Res 16:R68, 2014

194. Beelen K, Opdam M, Severson TM, et al: PIK3CA mutations, phosphatase and tensin homolog, human epidermal growth factor receptor 2, and insulin-like growth factor 1 receptor and adjuvant tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. Breast Cancer Res 16:R13, 2014

195. Loi S, Haibe-kains B, Majjaj S, et al: PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor – positive breast cancer. Proc Natl Acad Sci 107:10208–10213, 2010

196. Karlsson E, Pérez-Tenorio G, Amin R, et al: The mTOR effectors 4EBP1 and S6K2 are frequently coexpressed, and associated with a poor prognosis and endocrine resistance in breast cancer: a retrospective study including patients from the randomised Stockholm tamoxifen trials. Breast Cancer Res 15:R96, 2013

197. Meric-Bernstam F, Chen H, Akcakanat A, et al: Aberrations in translational regulation are associated with poor prognosis in hormone receptor-positive breast cancer. Breast Cancer Res 14:R138, 2012

198. Ellard SL, Clemons M, Gelmon K a, et al: Randomized phase II study comparing two schedules of everolimus in patients with recurrent/metastatic breast cancer: NCIC Clinical Trials Group IND.163. J Clin Oncol 27:4536–41, 2009

199. Loi S, Michiels S, Baselga J, et al: PIK3CA genotype and a PIK3CA mutation-related gene signature and response to everolimus and letrozole in estrogen receptor positive breast cancer. PLoS One 8:e53292, 2013

200. Treilleux I, Arnedos M, Cropet C, et al: Translational studies within the TAMRAD randomized GINECO trial: evidence for mTORC1 activation marker as a predictive factor for everolimus efficacy in advanced breast cancer. Ann Oncol 26:120–125, 2014

201. Landis MD, Lehmann BD, Pietenpol JA, et al: Patient-derived breast tumor xenografts facilitating personalized cancer therapy. Breast Cancer Res 15:201–209, 2013

202. Lum D, Matsen C, Welm A, et al: Human Primary Tumorgraft Models: Comparisons with Traditional Oncology Pre-Clinical Models and The Clinical Relevance and Utility of Primary Tumorgrafts in Basic and Translational Oncology Research. Curr Protoc Pharmacol Unit 14–22, 2012

203. Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, et al: with clinical outcome in breast cancer. Nature 481:389–393, 2012

204. Zindy P, Bergé Y, Allal B, et al: Formation of the eIF4F translation-initiation complex determines sensitivity to anticancer drugs targeting the EGFR and HER2 receptors. Cancer Res 71:4068–73, 2011