



**HAL**  
open science

# Contribution à l'étude des mécanismes de sensibilité aux traitements antiandrogènes dans les cancers du sein moléculaires apocrines

Thomas Grellety

## ► To cite this version:

Thomas Grellety. Contribution à l'étude des mécanismes de sensibilité aux traitements antiandrogènes dans les cancers du sein moléculaires apocrines. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0088 . tel-01895914

**HAL Id: tel-01895914**

**<https://theses.hal.science/tel-01895914>**

Submitted on 15 Oct 2018

**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.



Thèse présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

**Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé**

**Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie**

Présentée et soutenue publiquement

Le 25 Juin 2018

**Par Mr Thomas GRELLETY**

Né le 17 février 1986 à Périgueux

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MECANISMES DE SENSIBILITE  
AUX TRAITEMENTS ANTI-ANDROGENES  
DANS LES CANCERS DU SEIN MOLECULAIRES APOCRINES**

Membre du Jury

**Professeur Martin TEICHMANN  
Professeur Florence DALENC  
Docteur Jacqueline LEHMANN-CHE  
Professeur William JACOT  
Docteur Christine VARON  
Professeur Hervé BONNEFOI**

**Examineur, Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse**



Thèse présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

**Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé**

**Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie**

Présentée et soutenue publiquement

Le 25 Juin 2018

**Par Mr Thomas GRELLETY**

Né le 17 février 1986 à Périgueux

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MECANISMES DE SENSIBILITE  
AUX TRAITEMENTS ANTI-ANDROGENES  
DANS LES CANCERS DU SEIN MOLECULAIRES APOCRINES**

Membre du Jury

**Professeur Martin TEICHMANN  
Professeur Florence DALENC  
Docteur Jacqueline LEHMANN-CHE  
Professeur William JACOT  
Docteur Christine VARON  
Professeur Hervé BONNEFOI**

**Examineur, Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse**



## RESUME

---

### **Contribution à l'étude des mécanismes de sensibilité aux traitements anti-androgènes dans les cancers du sein moléculaires apocrines**

Les cancers moléculaires apocrines sont un sous-groupe de cancer du sein caractérisé par l'expression du récepteur aux androgènes (RA), l'absence du récepteur aux œstrogènes (RE) et l'expression paradoxale de nombreux gènes typiquement exprimés dans les tumeurs RE positives. Une proportion significative de ces patientes va récidiver sous forme de métastases dont la prise en charge repose sur des traitements non spécifiques (chimiothérapies). En préclinique, la lignée cellulaire MDA-MB-453 a été identifiée comme ayant un profil transcriptomique similaire à ce sous-groupe tumoral. En clinique, les essais réalisés dans ce sous-groupe tumoral avec différents anti-androgènes, dont l'abiratérone (inhibiteur de la synthèse des androgènes), retrouvent un bénéfice clinique chez environ 25% des patientes. L'objectif de cette thèse est d'améliorer les connaissances et les prises en charge thérapeutiques spécifiques de ces tumeurs.

Nos données précliniques comparatives montrent que l'ODM-201, nouvel anti-androgène, ne présente pas une efficacité supérieure par rapport aux anti-androgènes déjà étudiés. Afin de contourner les limites des lignées cellulaires identifiées dans ce premier projet, nous avons démontré la nécessité de développer de nouveaux modèles : les *Patient-Derived-Xenograft* orthotopiques. Notre deuxième projet est en faveur d'une meilleure sélection des patientes à traiter par abiratérone notamment basé sur des caractéristiques immunohistochimiques apocrines. Chez les patientes ne présentant pas ces caractéristiques, nous avons isolé *CHEK1* comme une cible d'intérêt en combinaison thérapeutique pour majorer les taux de réponse de l'abiratérone en monothérapie.

### **Mots clés**

Cancer du sein ; tumeurs moléculaires apocrines ; récepteurs aux androgènes ; anti-androgènes ; acétate d'abiratérone ; inhibiteurs de Chk1

## SUMMARY

---

### **Insight into sensitivity mechanisms to antiandrogens in molecular apocrine breast carcinoma**

Molecular apocrine cancers are a subgroup of breast cancer characterized by the expression of the androgen receptor (AR), the absence of the estrogen receptor (ER) and the paradoxical expression of many genes typically expressed in ER positive tumors. A significant proportion of these patients will recur in the form of metastases whose management is based on non-specific treatments (chemotherapy). In preclinical study, the MDA-MB-453 cell line was identified as having a transcriptomic profile similar to this tumor subgroup. Clinical trials in this tumor subgroup testing different antiandrogens, including abiraterone (inhibitor of androgen synthesis), found a clinical benefit in about 25% of patients. The aim of this thesis is to improve the knowledge and the specific therapeutic management of these tumors.

Our comparative preclinical data show that ODM-201, a new anti-androgen, does not show superior efficacy compared to previously studied anti-androgens. In order to circumvent the limits of cell lines provided by this first project, we have shown the need to develop new models: orthotopic Patient-Derived-Xenograft. Our second project favors a better selection of patients to be treated with abiraterone, especially based on apocrine immunohistochemical characteristics. In patients without these characteristics, we isolated *CHEK1* as a target of interest in combination therapy to increase response rates of abiraterone monotherapy.

### **Keywords**

Breast cancer; molecular apocrine tumor; androgen receptor; anti-androgen; abiraterone acetate; Chk1 inhibitor

**Thèse préparée dans l'unité INSERM U1218 ACTION,**

Dirigée par le Pr Pierre Soubeyran,

**Au sein de l'équipe *Oncogénèse Mammaire et Leucémique (MLO)*,**

Coordonnée par le Pr François-Xavier Mahon,

**Sur le site de l'Institut Bergonié,**

Centre de Lutte Contre le Cancer (CLCC) de la Nouvelle-Aquitaine,  
229 cours de l'Argonne, 33000 Bordeaux, France.

*A tous ceux qui m'ont soutenu,*

*A Marie,*

*A Gabriel.*

*« Quand il est dur d'avancer, ce sont les durs qui avancent »  
John Fitzgerald Kennedy*

*“Fluctuat nec mergitur”*

## REMERCIEMENTS

---

Mr le Professeur Hervé Bonnefoi,  
Vous m'avez confié ce travail, nos échanges l'ont construit dans sa structure et dans sa finalité,  
Je vous remercie de la confiance dont vous m'avez honoré.

Mr le Professeur François-Xavier Mahon,  
Pour votre aide organisationnelle, scientifique et logistique nécessaire au bon déroulé de ma thèse, je souhaite vous remercier,  
J'ai bénéficié de la justesse de vos conseils et vous assure de ma gratitude.

Elodie et Julie, mes camarades de route dans cette aventure,  
Merci de votre aide, depuis le début et jusqu'aux derniers jours,  
Et plus particulièrement de votre soutien dans les périodes agitées.

A l'équipe de l'Unité U1218 basée sur l'Institut Bergonié ou sur le site de Carrère,  
Merci de votre soutien au quotidien et de vos conseils avisés.

Bruno, nos discussions ont permis d'aboutir à la structuration de mes travaux, à leurs publications et à la soutenance de cette thèse,  
Merci de ta disponibilité et sympathie, je te suis respectueusement reconnaissant.

A l'équipe de biopathologie de l'Institut Bergonié, pour l'expertise, la réflexion commune, l'aide logistique, la disponibilité et la sympathie,  
Gaetan, Valérie, soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Audrey, merci de m'avoir conseillé et aidé comme tu l'avais déjà si bien fait dans l'encadrement de mon Master 2,  
Je tiens à souligner ta disponibilité, ta gentillesse et ton intérêt à mon égard,  
Sois gratifié de toute ma reconnaissance.

Je souhaite remercier les Professeurs Pierre Soubeyran et Antoine Italiano pour leurs conseils et aides précieuses.

Mesdames et Messieurs les membres du jury, je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de consacrer du temps à relire et critiquer mes travaux.

A l'équipe médicale de l'Institut Bergonié,  
Vous m'avez soutenu pendant cette période éloignée de la clinique,  
Je vous remercie tous et particulièrement mes internes Mathieu et Matthieu, Mikaël, Laura, merci de m'accompagner dans ce bail commun d'un magnifique bureau sans fenêtre !

Camille, Louis, pour votre écoute et présence inconditionnelle, je vous témoigne ici ma profonde amitié.

A Marie, plus qu'une femme, une raison de vivre, une lumière quotidienne de tous les instants,  
Tu es simplement tout pour moi,

A notre tendre Gabriel, ma vraie réussite, tu changes chaque jour un peu plus et me rends tellement fier,  
Ne grandit pas trop trop vite et garde ainsi ta belle insouciance,

A ma famille,  
Pour votre soutien au quotidien et pour avoir compris les raisons de certains sacrifices et leurs conséquences,

A mes amis,  
Pour les moments de détente nécessaires, les bons repas, les franches rigolades, les courses à pieds... tous ces moments de détente ô combien précieux.

# Sommaire

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUME .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>SUMMARY .....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>REMERCIEMENTS .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>SOMMAIRE .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>                                  | <b>12</b> |
| <b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>                                       | <b>14</b> |
| <b>TABLE DES ANNEXES .....</b>                                       | <b>16</b> |
| <b>ABREVIATIONS .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>PREAMBULE.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>INTRODUCTION .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>Chapitre 1 .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>Les cancers du sein .....</b>                                     | <b>25</b> |
| <b>1. Epidémiologie .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>2. Classifications des cancers du sein .....</b>                  | <b>27</b> |
| A. Classification histopathologique .....                            | 27        |
| B. Classification moléculaire .....                                  | 29        |
| <b>Chapitre 2.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>Les tumeurs moléculaires apocrines.....</b>                       | <b>33</b> |
| <b>1. Individualisation du sous-groupe moléculaire apocrine.....</b> | <b>34</b> |
| A. L'étude princeps de Farmer et al.....                             | 34        |
| B. Validation ultérieure du sous-groupe moléculaire apocrine.....    | 36        |
| C. Corrélation immunohistochimique .....                             | 37        |
| <b>2. Le récepteur aux androgènes.....</b>                           | <b>40</b> |
| A. Les caractéristiques du RA .....                                  | 40        |
| a. Description du RA.....  | 40        |
| b. Activité de facteur de transcription.....                         | 42        |
| c. Activation du RA par les androgènes : les ligands du RA.....      | 43        |
| d. Régulation du RA.....   | 45        |
| B. RA et cancer de prostate : androgéno-dépendance.....              | 47        |
| C. RA et cancer du sein .....  | 48        |
| a. Place et rôle du RA dans le sein normal et pathologique .....     | 48        |
| b. Prévalence et rôle pronostic du RA dans les cancers du sein ..... | 50        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3. Caractéristiques des tumeurs moléculaires apocrines.....</b>                | <b>54</b> |
| A. Caractéristiques histopathologiques.....                                       | 55        |
| a. Lésions apocrines mammaires .....  | 55        |
| b. Spécificités anatomopathologiques .....  | 59        |
| B. Caractéristique biologique des tumeurs moléculaires apocrines.....             | 62        |
| a. Caractéristiques transcriptomiques et génomiques .....                         | 62        |
| Prépondérance transcriptomique des voies du métabolisme et des androgènes .....   | 62        |
| La place d'HER2 .....   | 63        |
| Profil génomique .....  | 64        |
| b. Caractéristiques biologiques et voies de signalisation impliquées.....         | 65        |
| C. Caractéristiques cliniques et radiologiques .....                              | 67        |
| a. Pronostic des tumeurs moléculaires apocrines.....                              | 68        |
| Pronostic général du sous-groupe moléculaire apocrine.....                        | 68        |
| Pronostic spécifique des tumeurs moléculaires apocrines HER2 non-amplifiées ..... | 71        |
| b. Chimiosensibilité des tumeurs moléculaires apocrines.....                      | 73        |
| <b>4. Modèles d'étude préclinique.....</b>  | <b>75</b> |
| A. La lignée cellulaire MDA-MB-453.....   | 75        |
| a. Description de la lignée MDA-MB-453.....                                       | 75        |
| b. Limites de la lignée MDA-MB-453 .....  | 77        |
| B. Autres lignées cellulaires moléculaires apocrines .....                        | 79        |
| <b>Chapitre 3.....</b>  | <b>81</b> |
| <b>Prise en charge thérapeutique des tumeurs moléculaires apocrines .....</b>     | <b>81</b> |
| <b>1. Les traitements anti-androgènes dans les cancers de la prostate.....</b>    | <b>82</b> |
| A. Généralités.....   | 82        |
| B. Traitements anti-androgènes de nouvelle génération .....                       | 85        |
| a. Acétate d'abiratérone.....   | 85        |
| b. Enzalutamide.....  | 86        |
| c. ODM-201 .....  | 87        |
| Caractéristiques et mécanismes d'action .....                                     | 87        |
| Développement préclinique .....   | 88        |
| Spécificité de l'ODM-201 par rapport aux autres anti-androgènes .....             | 88        |
| Développement clinique .....  | 89        |
| C. Résistance aux anti-androgènes.....  | 90        |
| <b>2. Données précliniques sur modèles moléculaires apocrines.....</b>            | <b>92</b> |
| <b>3. Données cliniques relatives aux tumeurs moléculaires apocrines.....</b>     | <b>94</b> |
| A. Bicalutamide.....  | 95        |
| B. Enzalutamide.....  | 95        |
| C. Acétate d'abiratérone .....  | 97        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Chapitre 4</b> .....   | <b>100</b> |
| <b>Chk1 et mécanismes de réparations des dommages à l'ADN</b> .....   | <b>100</b> |
| <b>1. Mécanismes de réparations des dommages à l'ADN</b> .....  | <b>101</b> |
| A. Généralités.....   | 101        |
| B. Rôle de Chk1.....  | 103        |
| <b>2. Chk1 et cancer</b> .....  | <b>105</b> |
| A. Généralités.....   | 105        |
| B. Chk1 et cancer du sein.....  | 107        |
| <br>  |            |
| <b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....  | <b>110</b> |
| <br>  |            |
| <b>PUBLICATIONS</b> .....   | <b>112</b> |
| <br>  |            |
| <b>Projet 1</b> .....   | <b>114</b> |
| <br>  |            |
| <b>Modèles de tumeurs moléculaires apocrines et Etude d'un nouvel anti-androgène, l'ODM-201</b> .....   | <b>114</b> |
| <br>  |            |
| <b>Résumé des travaux effectués</b> .....   | <b>115</b> |
| 1. Contexte.....  | 115        |
| 2. Résultats .....  | 116        |
| <br>  |            |
| <b>Rapport de collaboration avec le laboratoire BAYER</b> .....   | <b>118</b> |
| Grellety T, Cardinaud B, Bonnefoi H.....  | 118.       |
| <i>Preclinical in vitro analysis of ODM-201 (darolutamide) using MDA-MB-453 cell line as a model for molecular apocrine breast cancer.</i> .....          | 118.       |
| <br>  |            |
| <b>Résultats (suite)</b> .....  | <b>136</b> |
| <br>  |            |
| <b>Article 1</b> .....  | <b>137</b> |
| Richard E, Grellety T, velasco V, MacGrogan G, Bonnefoi H and Iggo R.....   | 137.       |
| <i>The mammary ducts create a favourable microenvironment for xenografting of luminal and molecular apocrine breast tumours.</i> .....                    | 137.       |
| <i>J Pathol, 240:256-261. 2016</i> .....  | 137.       |
| <br>  |            |
| <b>Résultats (suite)</b> .....  | <b>153</b> |
| <br>  |            |
| <b>Projet 2</b> .....   | <b>156</b> |
| <br>  |            |
| <b>Etude ancillaire de l'essai clinique UCBG 12-1 : Recherche de facteurs prédictifs de réponse à l'abiratérone et recherche de cibles thérapeutiques</b> | <b>156</b> |
| <br>  |            |
| <b>Résumé des travaux effectués</b> .....   | <b>157</b> |
| 1. Contexte.....  | 157        |
| 2. Résultats .....  | 158        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Article 2</b> .....   | <b>159</b> |
| Grellety T, MacGrogan G, Chakiba C, Kind M and Bonnefoi H.....   | 159.       |
| <i>Long term complete response of an androgen receptor-positive triple-negative metastatic breast cancer to abiraterone acetate.</i> ..... | 159.       |
| <i>JCO Precision Oncology, 2018</i> .....  | 159        |
| <b>Résultats (suite)</b> .....   | <b>166</b> |
| <b>Article 3</b> .....   | <b>168</b> |
| Grellety T, Callens C, Richard E, Briaux A, Velasco V, Pulido M, Gncalves A, Gestraud P, MacGrogan G, Bonnefoi H and Cardinaud B.....      | 168.       |
| Enhancing abiraterone acetate efficacy in androgen receptor-positive triple negative breast cancer: Chk1 as a potential target .....       | 168.       |
| <i>Clinical cancer Research, Under Review (CCR 18-1469)</i> .....  | 168.       |
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....  | <b>218</b> |
| La lignée MDA-MB-453 : un modèle classique mais limité .....   | 222        |
| Vers de nouveaux modèles précliniques spécifiques .....  | 228        |
| L'ODM-201: un antagoniste du RA à l'activité proche de l'enzalutamide .....  | 233        |
| Traitements anti-androgènes : des questions malgré les réponses observées .....  | 240        |
| Améliorer l'identification clinico-pathologique des tumeurs MA .....   | 245        |
| Prédire la réponse à l'abiratérone : le RA a un rôle prédictif limité .....  | 248        |
| Prédire la réponse à l'abiratérone : caractéristiques IHC apocrines et profil génomique.....   | 250        |
| Prédire la réponse à l'abiratérone : autres pistes de recherche de facteurs prédictifs .....   | 254        |
| Améliorer les taux de réponse à l'abiratérone : cibler la voie de signalisation PI3K   | 261        |
| Améliorer les taux de réponse à l'abiratérone: rationnel pour cibler les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN .....               | 263        |
| Améliorer les taux de réponse à l'abiratérone: Combinaison avec un inhibiteur de Chk1 .....  | 267        |
| <b>CONCLUSION</b> .....  | <b>273</b> |
| <b>REFERENCES</b> .....  | <b>275</b> |
| <b>ANNEXES</b> .....   | <b>300</b> |

## Table des illustrations

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 1.</b> Clusters de gènes d'intérêt isolant les tumeurs moléculaires apocrines...  | 35  |
| <b>Figure 2.</b> Fréquence relative des sous-groupes de cancer du sein selon la définition IHC usuelle en pratique clinique et la définition transcriptomique de Farmer et al. ...  | 39  |
| <b>Figure 3.</b> Structure du récepteur aux androgènes : gène et protéine.....  | 42  |
| <b>Figure 4.</b> Voies de biosynthèse des hormones stéroïdes communes entre cancer du sein et de la prostate mettant en lumière la place centrale des androgènes. ....  | 45  |
| <b>Figure 5.</b> Proportion de cancer du sein exprimant les récepteurs androgènes ( $\geq 10\%$ ) en IHC par sous-groupes définis selon le statut des récepteurs hormonaux et de HER2.....  | 51  |
| <b>Figure 6.</b> Coupes histologiques d'un carcinome infiltrant apocrine mammaire. ....   | 58  |
| <b>Figure 7.</b> Courbe de survie sans rechute (locale ou à distance) issue de la cohorte de l'étude EORTC 10994 (165). ....  | 70  |
| <b>Figure 8.</b> Courbe de survie globale issue de la cohorte de l'étude EORTC 10994 (165). ....  | 71  |
| <b>Figure 9.</b> Morphologie de la lignée MDA-MB-453. ....  | 76  |
| <b>Figure 10.</b> Fréquence des mutations du gène <i>RA</i> . ....  | 78  |
| <b>Figure 11.</b> Morphologie de la lignée SUM185PE. ....   | 80  |
| <b>Figure 12.</b> Voie de synthèse des androgènes et traitement anti-androgènes dans le cancer de la prostate. ....   | 84  |
| <b>Figure 13.</b> Structure de l'ODM-201. ....  | 88  |
| <b>Figure 14.</b> Cibles et rôles des points de contrôle du cycle cellulaire en réaction à des dommages à l'ADN.....  | 102 |
| <b>Figure 15.</b> Action centrale de Chk1 comme point de contrôle du cycle cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN. ....   | 104 |
| <b>Figure 16.</b> Suivi de croissance de la prise de greffe de la lignée MDA-MB-453. ...  | 154 |
| <b>Figure 17.</b> Immunohistochimie comparative entre lignée MDA-MB-453 cultivée <i>in vitro</i> et tumeurs <i>in vivo</i> au sacrifice après 8 semaines de greffe intracanalair versus coussinet graisseux ( <i>fat pad</i> )..... | 155 |
| <b>Figure 18.</b> Proposition de sous-segmentation des tumeurs moléculaires apocrines HER2 non-amplifiées basée sur les caractéristiques prédictives potentielles de réponse à l'abiratérone. ....                                  | 253 |
| <b>Figure 19.</b> Proposition d'un potentiel essai thérapeutique faisant suite aux résultats précliniques issus de la cohorte de l'essai abiratérone, UBGC12-1. ....  | 272 |

## Liste des tableaux

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 1.</b> Classification OMS des carcinomes mammaires invasifs. ....  | 27  |
| <b>Tableau 2.</b> Sous-type de cancer du sein défini par des marqueurs immunohistochimiques (RE, RP, RA, HER2, KI67) et/ou par FISH (HER2) et leurs implications thérapeutiques générales. .... | 29  |
| <b>Tableau 3.</b> Classification moléculaire des cancers du sein selon Farmer et al. utilisée dans cette thèse et les corrléations immunohistochimiques. ....                                   | 37  |
| <b>Tableau 4.</b> Caractéristiques de l'ODM-201. ....   | 87  |
| <b>Tableau 5.</b> Valeurs d'IC50 par tests de transactivation du RA. ....   | 89  |
| <b>Tableau 6.</b> Principaux résultats des essais cliniques évaluant un anti-androgène dans les tumeurs moléculaires apocrines HER2 non-amplifiées. ....  | 94  |
| <b>Tableau 7.</b> Essais cliniques en cours dans les cancers du sein moléculaires apocrines selon le statut HER2. ....  | 99  |
| <b>Tableau 8.</b> Inhibiteurs de Chk1 disponibles en préclinique et leurs spécificités d'action sur Chk1. ....  | 106 |
| <b>Tableau 9.</b> Performance de différents seuils d'expression du RA en IHC pour discriminer les patientes en fonction de leurs réponses. ....   | 249 |

## Table des annexes

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>Annexe 1.</b> <i>Compound Request Form</i> /Formulaire de demande de collaboration avec le laboratoire BAYER HealthCare concernant l'ODM-201.....   | 301 |
| <b>Annexe 2.</b> Contrat de recherche avec le laboratoire BAYER HealthCare concernant l'ODM-201. ....  | 309 |
| <b>Annexe 3.</b> Consentement de recherche biomédicale de l'Institut Bergonié. ....  | 310 |
| <b>Annexe 4.</b> Protocole de prélèvement tumoral sur pièce opératoire en vue d'établissement d'un <i>Patient Derived Xenograft</i> (PDX). ....  | 311 |
| <b>Annexe 5.</b> Contrat relatif à la réalisation de recherche ancillaire biologique à partir du matériel de l'essai UCBG12-1 entre UNICANCER (Promoteur) et l'Institut Bergonié (Plateforme)..... | 314 |
| <b>Annexe 6.</b> Contrat relatif à la réalisation de recherche ancillaire biologique à partir du matériel de l'essai UCBG12-1 entre UNICANCER (Promoteur) et l'Institut Curie (Plateforme).....    | 316 |
| <b>Annexe 7.</b> <i>Material Transfer Agreement</i> avec le laboratoire Genentech concernant le GDC-0575 (MTA ID: OR-216276). ....   | 318 |

# Abréviations

---

AMM : Autorisation de mise sur le marché

CGH: *Comparative genomic hybridization* / Hybridation génomique comparative

CHIP-Seq : *Chromatin immunoprecipitation and sequencing* / Immunoprécipitation de chromatine et séquençage

CRPC: *Castration resistant prostate cancer* / Cancer de prostate résistant à la castration

CYP17 : Cytochrome P450 17

DHT : Dihydrotestostérone

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DDR: *DNA Damage Repair* / Réparation des dommages à l'ADN

DBD : Domaine de liaison à l'ADN (du RA)

EORTC : *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*

FFPE : *Formalin-fixed paraffin-embedded*

FISH : *Fluorescence in situ hybridization* / Hybridation in-situ en fluorescence

GnRH : *Gonadotropin Releasing Hormone* / Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

HSP : Heat Shock Protein

IAC : Carcinome invasif apocrine

IC50 : Concentration inhibitrice médiane

IHC : Immunohistochimie

LAR : *Luminal androgen receptor*

LBD : *Ligand Binding Domain* / Domaine de liaison à l'ADN (du RA)

LH : Luteinizing hormone / Hormone lutéinisante

LHRH : *Luteinizing Hormone Releasing Hormone* / Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

MA : Moléculaire apocrine (tumeur)

MPA : acétate de médroxyprogestérone

NGS : *Next generation sequencing* / Séquençage de nouvelle génération

NTD : Domaine de transactivation N-terminal (du RA)

OMS : Organisation mondiale de la santé

OR : Odd ratio

PDX : *Patient derived xenograft*/ Xénogreffe dérivée de patient

RA : Récepteurs aux androgènes

RE : Récepteurs aux oestrogènes

RP : Récepteurs à la progestérone

SVF : Sérum de veau fœtal

SSP : Survie sans progression

TNBC : *Triple negative breast cancer* / Cancer du sein triple négatif

UCBG : *French Breast Cancer Intergroup*

VPP : Valeur predictive positive

# Préambule

---

Le cancer du sein est le plus fréquent et le plus meurtrier des cancers chez la femme avec plus de 54000 nouveaux cas en 2015 en France. Le taux de survie à 5 ans est de 87%. Derrière ces chiffres se cachent une hétérogénéité de maladie récemment explorée et exploitée sur le plan thérapeutique.

Le premier traitement de ces cancers reste la chirurgie qui est le seul traitement ayant une réelle capacité curative pour les tumeurs localisées. L'amélioration des techniques chirurgicales a permis une réduction de la morbidité avec l'abandon des techniques systématiques d'ablation radicale du sein (dite de Halsted) aussi appelée technique monobloc consistant en l'ablation du sein, des muscles sous-jacents et des ganglions lymphatiques axillaires. Ce changement des pratiques concorde avec l'apparition de la cancérologie comme discipline médicale. Les premiers cancérologues ont en effet réalisé le constat simple que malgré une exérèse large, certaines patientes récidivent à distance prouvant la capacité de mobilité des cellules tumorales pour former des métastases. C'est ainsi qu'a commencé à se développer d'autres types de thérapeutiques comme la chimiothérapie et la radiothérapie pour compléter l'action de la chirurgie. Ce constat médical est toujours d'actualité aujourd'hui, car malgré des taux de survie améliorés, les patientes devenant métastatiques ne guérissent pas de leur maladie.

La compréhension des mécanismes physiopathologiques a notamment abouti à la révolution des traitements anti-hormonaux, dont le tamoxifène, découvert dans les années 1960 pour les cancers du sein exprimant les récepteurs aux hormones œstrogènes et/ou progestérone. L'identification de ce sous-groupe de cancer du sein sur un marqueur prédictif de réponse à un traitement spécifique a bouleversé la prise en charge des cancers du sein et permis de mettre en lumière la diversité tumorale se cachant derrière l'entité 'cancer du sein'. La même démarche a été reproduite suite à la mise en évidence du pronostic péjoratif associé à la surexpression d'*ERBB2*, récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase dans les tumeurs du sous-groupe communément appelé HER2-amplifié. Cette découverte majeure du Dr Salmon à la fin des années 1980, fut rapidement suivie du développement d'un traitement ciblé, le trastuzumab avec une efficacité ayant révolutionné la prise en charge de ces patientes.

Les années 2000 ont été marquées par la segmentation moléculaire des cancers du sein grâce aux analyses transcriptomiques. Ainsi, en plus des groupes luminaux, exprimant les récepteurs aux hormones et du groupe HER2-amplifié, est apparu un sous-groupe de pronostic sombre, sans thérapie ciblée et lui-même hétérogène, les tumeurs triple négatives. Celles-ci souffrent d'emblée d'être décrites par des arguments négatifs, en miroir des groupes luminaux et HER2-amplifié (récepteurs œstrogènes et progestérone négatifs et HER2 non-amplifié). Longtemps, la prise en charge de ces tumeurs a été réalisée par défaut de thérapies spécifiques, avec comme seule arme la chimiothérapie. La découverte récente de sous-segments dans ce groupe tumoral a été possible grâce aux avancées technologiques biologiques permettant d'isoler des profils transcriptomiques différents. Notre équipe a isolé en 2005 un sous-groupe appartenant, en partie, à ces tumeurs dites triple négatives. Ce sous-groupe est souvent résumé au sein des tumeurs triple négatives par l'expression d'un autre récepteur hormonal stéroïdien, le récepteur aux androgènes. Ces tumeurs dites moléculaires apocrines n'ont depuis révélé qu'une partie de leurs physiopathologies mais déjà ont pu faire l'objet d'essais cliniques de thérapies spécifiques. Ainsi des traitements anti-androgènes ont été utilisés sur un raisonnement analogue aux cancers de prostate avancés androgéno-dépendants. Le bénéfice des anti-androgènes est néanmoins limité à 20-30% des tumeurs moléculaires apocrines mettant en lumière le manque de compréhension actuel ainsi que la possible hétérogénéité de ce sous-groupe.

Dans ce travail, nous avons cherché à combler ces manques avec pour objectif de mieux caractériser les mécanismes de sensibilité des traitements anti-androgènes dans ces tumeurs moléculaires apocrines. Notre objectif est ainsi d'améliorer l'efficacité des prises en charge spécifiques de cette maladie. Partant du constat actuel que les tumeurs moléculaires apocrines représentent environ 10% de l'ensemble des cancers du sein et qu'une femme sur 8 à 10 développera un cancer du sein au cours de sa vie, nous pouvons facilement estimer l'importance d'améliorer les prises en charge dans ce sous-groupe tumoral.

# Introduction

---

## **Chapitre 1**

### **Les cancers du sein**

Les cancers du sein représentent un enjeu majeur de santé publique du fait de leur fréquence. Alors que l'hétérogénéité clinique est connue depuis de nombreuses décennies, la découverte récente d'une grande hétérogénéité biologique, suite aux analyses d'expression transcriptomique, a révolutionné la compréhension et les prises en charge des cancers du sein.

## 1. Epidémiologie

Le cancer du sein est la principale cause de cancer féminin en Europe avec 463 000 nouveaux cas estimés en 2012 représentant 28,8% des cancers féminins. Ce cancer est responsable de 131 200 décès (estimation) en 2012 (1). Une femme sur 8 à 10 sera touchée par le cancer du sein au cours de sa vie (2). L'incidence du cancer du sein augmente de façon significative après 45 ans bien que la mortalité augmente plus franchement après 50 ans.

Son incidence est associée au mode de vie occidental et est majorée dans les pays dit développés, possédant une économie avancée. Un dépistage organisé a été mis en place en France et dans de nombreux pays (3). Il s'adresse aux patientes à risque non-élevé, c'est à dire hors histoire familiale évocatrice de cancer héréditaire. Le dépistage recommandé consiste en une mammographie tous les 2 ans pour les femmes âgées de 50 à 74 ans avec un bénéfice relatif du dépistage organisé en termes de réduction de la mortalité spécifique (4). Les cancers héréditaires représentent pour leur part environ 10% de l'ensemble des cancers du sein et les femmes porteuses de mutation germinale notamment des gènes BRCA bénéficient d'un suivi plus rapproché et plus complet (5). Le cancer du sein est un enjeu majeur de santé publique du fait notamment de sa fréquence et de son évolution sous forme métastatique dans un nombre non négligeable de cas.

## 2. Classifications des cancers du sein

Différentes classifications ont été proposées sur la base d'observations cliniques et épidémiologiques de l'hétérogénéité des cancers du sein dans leurs présentations et leurs réponses aux traitements.

### A. Classification histopathologique

La 4ème édition de la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (*Classification of Tumors of the Breast, 4th edition*) a été publiée en 2012, et recouvre l'ensemble des lésions cancéreuses et précancéreuses mammaires (tableau 1) (6). Les premières descriptions phénotypiques microscopiques des cancers du sein ont permis d'isoler deux types histologiques les plus fréquents : les carcinomes infiltrants de type non spécifique et les carcinomes lobulaires infiltrants ainsi que d'autres sous types plus rares.

| Classification  | Fréquence |
|---|-----------|
| <b>Carcinome invasif de type non-spécifique (NST)</b> | 70-75%    |
| <b>Carcinome lobulaire invasif</b>                    | 10-15%    |
| <b>Autres</b>   | 15%       |
| Carcinome tubuleux                                    |           |
| Carcinome cribriforme                                 |           |
| Carcinome mucineux                                    |           |
| Carcinome médullaire                                  |           |
| <b>Carcinome apocrine</b>                             | ≈1%       |

**Tableau 1. Classification OMS des carcinomes mammaires invasifs.**

Quatrième Édition de l'OMS, adapté de (7). Liste non exhaustive des formes histologiques 'autres'.

Les carcinomes avec différenciation apocrine ou carcinome apocrine invasif sont un sous-type histologique rare de cancer du sein avec une incidence allant de moins de 1% à 4% (8). Ils présentent les mêmes caractéristiques d'expansion architecturale que les carcinomes invasifs de type non spécifique. Leurs spécificités résident dans les caractéristiques morphologiques de leurs cellules qui possèdent un cytoplasme granulaire éosinophile abondant et des nucléoles proéminents.

En pratique clinique, le type histologique OMS est complété par une classification basée sur des biomarqueurs immunohistochimiques (IHC) de différents récepteurs stéroïdes, aux estrogènes (RE), à la progestérone (RP) ainsi que transmembranaire avec le récepteur HER2. Ces biomarqueurs isolent ainsi les tumeurs récepteurs hormonaux positives (RE +, RP+/-) ou tumeurs lumorales, les tumeurs HER2-amplifiées et les tumeurs triple négatives ou basales (RE-, RP-, HER2 non amplifié). Le tableau 2 reprend ces groupes dont les définitions consensuelles sont utilisées en pratique clinique courante. Le RA est reporté de manière indicative mais n'intervient pas dans l'identification de ces sous-groupes. Les implications thérapeutiques à un stade localisé présentées dans ce tableau sont internationalement acceptées (9).

| Sous-groupe            | RA                 | RE/RP                | HER2 amplifié | Ki67   | Traitement                                       |
|------------------------|--------------------|----------------------|---------------|--------|--|
| <b>Luminal A</b>       | Positif ou négatif | Au moins 1 positif   | Non           | Faible | Hormonothérapie seule                            |
| <b>Luminal B</b>       | Positif ou négatif | Au moins 1 positif   | Oui ou Non    | Elevé  | Hormonothérapie +/- chimiothérapie +/- anti-HER2 |
| <b>HER2 positive</b>   | Positif ou négatif | Positifs ou négatifs | Oui           | -      | Chimiothérapie + anti-HER2                       |
| <b>Triple negative</b> | Négatif            | Négatifs             | Non           | -      | Chimiothérapie                                   |

**Tableau 2. Sous-type de cancer du sein défini par des marqueurs immunohistochimiques (RE, RP, RA, HER2, KI67) et/ou par FISH (HER2) et leurs implications thérapeutiques générales.**

RA : récepteurs aux androgènes ; RE : récepteurs aux œstrogènes ; RP : récepteurs à la progestérone ; KI67 : index de prolifération.

Ce deuxième niveau de classification permet une différenciation prédictive de réponse au traitement concordante avec la disponibilité de traitements tels que l'hormonothérapie et les thérapies ciblées anti-HER2. Ces récepteurs sont des facteurs pronostics et prédictifs (10,11), mais ne décrivent pas en totalité la biologie tumorale sous-jacente de ces cancers. En effet, cette biologie tumorale ne peut probablement pas être réduite à l'expression ou à la surexpression de quelques récepteurs.

## B. Classification moléculaire

Les avancées technologiques ont permis d'approfondir la dissection des cancers du sein par l'apport des données génomiques et transcriptomiques. Ces dernières ont conduit à discriminer les tumeurs mammaires en sous-groupes ouvrant la voie à une

adaptation thérapeutique en fonction des caractéristiques retrouvées. Plusieurs tests génomiques peuvent actuellement être utilisés pour classer les cancers du sein en sous-groupes dit « moléculaires ».

Au début des années 2000, des explorations transcriptomiques de tumeurs mammaires ont été réalisées sur un grand nombre de gènes potentiellement impliqués dans l'oncogenèse, dans le contrôle de la croissance cellulaire, dans la différenciation cellulaire et dans la mort cellulaire. Perou et al. (12) ont identifié 3 groupes moléculaires distincts en utilisant une analyse par clustering hiérarchique non supervisée. Ils ont ainsi défini les sous-groupes suivants : luminal (par la suite réparti en deux sous-groupes, luminal A et B), HER2 enrichi (HER2+) et basal-like. En 2001, Sorlie et al. (13) ont corrélé ces sous-groupes moléculaires de cancer du sein à des données de survie. Ces groupes présentent des caractéristiques différentes en termes d'incidence, de présentation clinique, de pronostic et de réponse au traitement (13–15).

Ces groupes tumoraux correspondent schématiquement aux groupes définis en IHC (tableau 2). Ainsi, en pratique courante les marqueurs immunohistochimiques, RE, RP et HER2, se substituent et résument les données transcriptomiques pour identifier les différents types de cancers du sein dans une visée théranostique.

Parker et al. (16) ont par la suite développé le modèle PAM50, un test d'expression multigénique ou signature d'expression de 50 gènes. Celui-ci permet d'identifier, avec un test simplifié, les 4 sous-types intrinsèques moléculaires de cancer du sein de Perou et Sorlie (luminaux A/B, enrichi HER2 et basal-like). Ce test a été mis au point pour refléter la biologie associée aux voies de signalisation des récepteurs aux estrogènes et d'HER2. Il inclut également des gènes de prolifération et des marqueurs spécifiques au sous-type basal. Cette signature permet d'identifier les sous-types de cancer du sein avec une valeur pronostic fine en plus des facteurs cliniques et anatomopathologiques classiquement utilisés dans les cancers localisés. Cet test a notamment été validé dans les populations de patientes incluses dans les essais transATAC et ABCSG-8 (17,18). Malgré ces résultats, les travaux de Prat et Perou mettent en évidence l'importance de maintenir les classifications clinicopathologiques en plus des informations fournies par la classification moléculaire intrinsèque de cette signature (19). Ils rappellent qu'une meilleure

compréhension des caractéristiques de la biologie tumorale (par analyse transcriptomique) vise à aider le clinicien dans sa décision d'un traitement le plus approprié pour chaque patient sans remplacer les données clinicopathologiques.

Les classifications moléculaires présentent deux limites principales.

La première concerne les tumeurs de type basal qui se superposent en pratique aux tumeurs triple négatives en IHC à savoir n'exprimant pas les récepteurs estrogènes, progestérones et HER2 (20). Ces tumeurs représentent 10 à 15% des cancers du sein (21–23) et sont caractérisées par une prolifération importante et un grade histologique élevé (principalement grade III) (24). Jusqu'à ce jour, les tentatives de classification ayant pour but de déterminer un sous-groupe de tumeurs triple négatives répondant à une thérapie ciblée spécifique n'ont pas abouti à une autorisation de mise sur le marché (22,25). Ceci sera bientôt le cas pour les tumeurs portant une mutation des gènes BRCA, impliquées dans les cancers du sein héréditaires avec les traitements anti-PARP (26). Cette absence peut être expliquée par l'hétérogénéité génétique de ce sous-groupe basal démontrée par Turner et al. en s'appuyant sur le profil de *comparative genomic hybridization* (CGH) de ces tumeurs (21). L'équipe de Lehmann et al. (27) a elle analysé la variation de l'expression transcriptomique de 587 tumeurs triple négatives (TNBC) et réussi à isoler de cette hétérogénéité six sous-types: basal-like 1 et 2, immunomodulatrice, mésenchymateux, mésenchymateux stem-like ainsi qu'un sous-type luminal-récepteur androgène (*Luminal Androgen Receptor*, LAR). Ce dernier sous-groupe se compose de tumeurs caractérisées par une expression transcriptomique de gènes du profil luminal et de gènes du spectre du récepteur aux androgènes (RA). Cette classification repose sur un modèle composé de 2188 gènes qui a récemment pu être simplifié à 101 gènes avec un pouvoir de discrimination des différents sous-groupes identique (28). La réalité de ces sous-groupes, notamment du sous-groupe LAR a été confirmée dans une analyse récente (29). Les LAR y représentent 16% des TNBC.

La deuxième limite majeure des classifications moléculaires est le positionnement des tumeurs HER2-amplifiées. Dans les études de puce d'expression transcriptomique précédemment décrites, de nombreuses tumeurs amplifiées pour HER2 en IHC et/ou FISH se situent en dehors du sous-groupe transcriptomique

HER2. De plus, certaines tumeurs de ce sous-groupe ne surexpriment pas HER2 en IHC. Ainsi, il a été montré que 50% des tumeurs considérées HER2 amplifiées en pathologie ne sont pas retrouvées dans le sous-groupe moléculaire HER2 (30). Ces données démontrent que l'amplification de HER2 ne représente pas un phénotype homogène suffisant pour former un sous-groupe moléculaire unique et distinct. Ceci est en contradiction avec la pratique clinique dans laquelle les tumeurs HER2 amplifiées peuvent bénéficier de traitements ciblés spécifiques efficaces (31).

Ceci met en lumière la limite de la corrélation entre groupe moléculaire et caractéristiques clinico-pathologiques permettant l'attribution d'un traitement spécifique. Ces études de classification moléculaires n'ont ainsi pas modifié les grandes lignes des recommandations nationales et internationales telles que celles de Saint-Gallen (9) dans lesquelles les données clinico-biologiques restent le socle de la pratique clinique dans l'objectif d'attribution thérapeutique. Néanmoins, ces recommandations d'experts internationaux ont convenu qu'un certain nombre de signatures d'expression peuvent avoir un rôle pronostique additionnel pour guider l'indication ou non de traitement adjuvant tel que la chimiothérapie (limitée aux tumeurs lumineales localisées sans envahissement ganglionnaire) (9). Ceci illustre la capacité collaborative des outils clinico-pathologique et transcriptomique pour guider au mieux les traitements de manière personnalisée.

## **Chapitre 2**

### **Les tumeurs moléculaires apocrines**

Farmer et al. (32) ont isolé en 2005 un sous-groupe indépendant de cancer du sein qui a été nommé tumeurs moléculaires apocrines (MA). Ces tumeurs moléculaires apocrines présentent un profil d'expression transcriptomique avec une prépondérance de la signalisation androgénique ainsi que certaines caractéristiques morphologiques histologiques des tumeurs apocrines invasives.

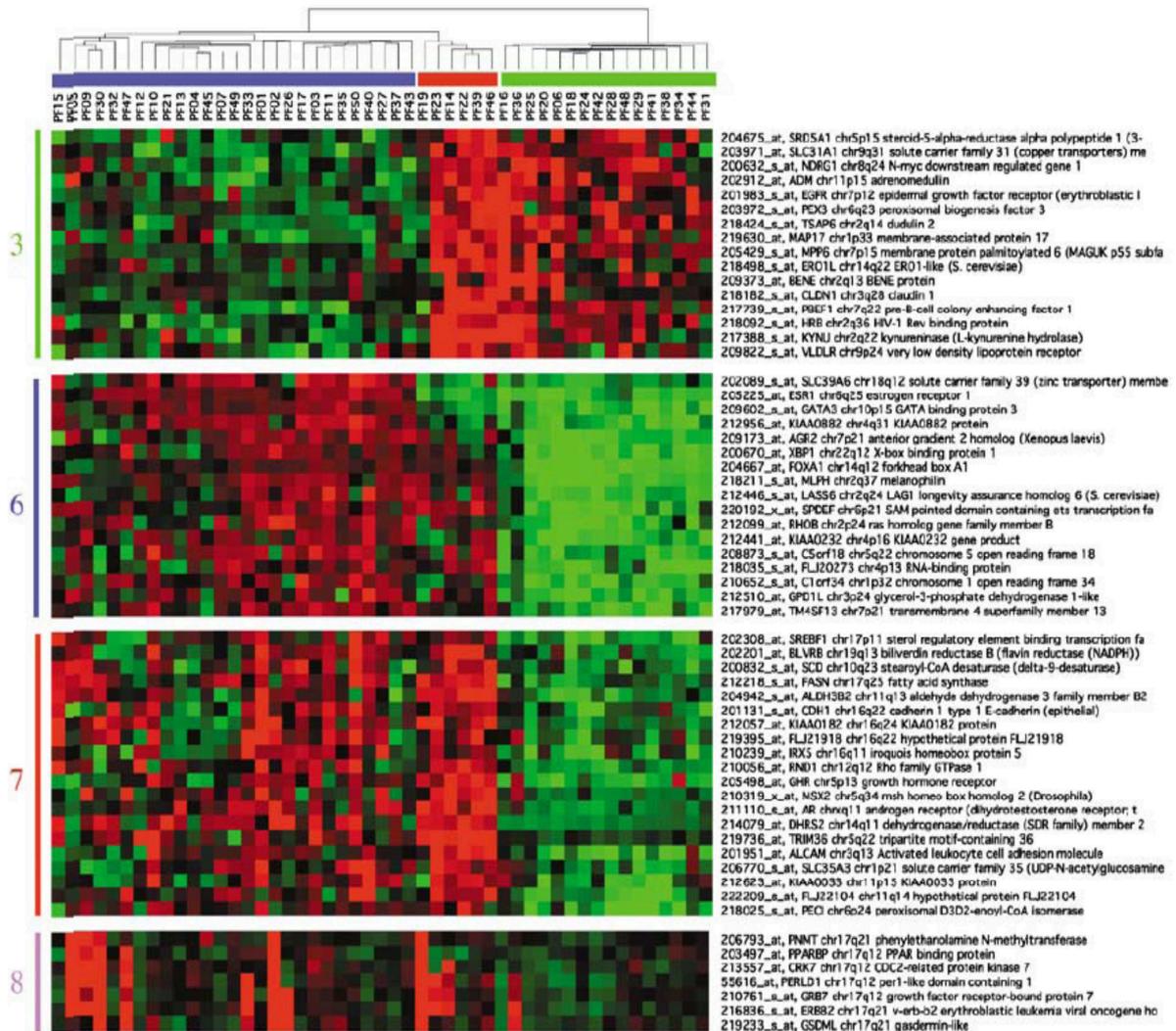
## 1. Individualisation du sous-groupe moléculaire apocrine

### A. L'étude princeps de Farmer et al.

Ce sous-groupe de cancer du sein a été identifié par une analyse transcriptomique non supervisée de 49 tumeurs mammaires en 2005 (32) (figure 1). Dans cette étude, un panel de transcripts plus large a été utilisé par rapport aux travaux de classification transcriptomique antérieurs (rapportés dans le chapitre précédent).

Un des points majeurs et novateurs de cette classification est la disparition du sous-groupe HER2 tel que jusqu'alors rapporté (12,13,15). Les cancers du sein dans cette classification se répartissent en trois sous-groupes : luminal, basal et moléculaire apocrine (32). Les tumeurs HER2 amplifiées se répartissent dans les sous-groupes luminal et moléculaire apocrine. Le sous-groupe moléculaire apocrine comprend des tumeurs avec un profil d'expression distinct des tumeurs basales mais de manière identique à ces dernières n'expriment pas le gène du récepteur aux oestrogènes, *ESR1*. De manière surprenante les tumeurs moléculaires apocrines expriment néanmoins certains gènes du cluster luminal en commun avec les tumeurs lumineuses ; à la différence des tumeurs basales. Les tumeurs moléculaires apocrines, également à la différence des basales, présentent une expression forte du récepteur aux androgènes et de gènes de la voie des androgènes.

La dénomination de ce sous-groupe tumoral 'moléculaire apocrine' a été proposée par l'équipe de Farmer et Iggo (32) du fait de caractéristiques phénotypiques morphologiques apocrines, proche de la définition histologique des carcinomes apocrines infiltrants (33).



**Figure 1. Clusters de gènes d'intérêt isolant les tumeurs moléculaires apocrines.**

Adapté de Farmer et al., *Oncogene* (32). Chaque colonne correspond à une tumeur. En violet, tumeurs du groupe luminal ; en rouge, du groupe moléculaire apocrine ; en vert, du groupe basal. Chaque transcript étudié est représenté en ligne. Le cluster 6 regroupe des gènes luminaux, le cluster 7 des gènes apocrines et le cluster 8 des gènes de l'amplicon HER2.

## B. Validation ultérieure du sous-groupe moléculaire apocrine

Le sous-groupe LAR (*luminal androgen receptor*) de tumeurs triple négatives décrit par Lehmann et al. (27) correspond aux tumeurs HER2 non-amplifiées du sous-groupe moléculaire apocrine de Farmer et al. (32).

Lehmann et Pietenpol ont montré (dans une cohorte de 374 TNBC) que les LAR sont principalement composés de tumeurs classées 'HER2' (74%) mais également 'luminales' selon la classification moléculaire intrinsèque PAM50 (34). Ceci a été confirmé depuis par une autre équipe (35). Il faut noter par ailleurs que les tumeurs identifiées comme LAR ne correspondent pas au profil des tumeurs classées 'basales' selon la classification PAM50 (34). Ce profil PAM50 isole clairement le sous-groupe LAR du reste des tumeurs triple négatives qui correspond au sous-groupe moléculaire apocrine dans sa fraction non-amplifiée pour HER2. En effet, ces études renforcent la description initiale de Farmer et al. (32) d'un sous-groupe moléculaire apocrine caractérisé par l'expression de gènes luminaux sans expression du RE et une prépondérance d'HER2 (avec ou sans présence d'amplification) (figure 1).

Doane et al. en 2006 ont confirmé cette classification de Farmer et al. (32) en identifiant deux sous-classes de tumeurs RE négatives, dont l'une semblant plus proche des tumeurs RE+ (36). Ce dernier point les différencie des tumeurs du sous-type basal (36). Ce sous-groupe à expression transcriptomique proche mais distinct des tumeurs lumineales correspond au sous-groupe moléculaire apocrine de Farmer et al. (32) et partiellement au sous-groupe LAR de Lehmann et al. (pour les tumeurs HER2 non-amplifiées) (27).

Guedj et al. (37) en 2012 ont également confirmé (sur une cohorte de 355 tumeurs) l'existence des trois sous-groupes moléculaires dont le sous-groupe moléculaire apocrine initialement identifiés par Farmer et al. (32). Une corrélation entre sous-groupes tumoraux identifiés par analyse transcriptomique et données cliniques et biologiques de plusieurs centaines de tumeurs a été décrite par cette équipe (37) renforçant ainsi l'existence d'un tel sous-groupe moléculaire apocrine. Ces résultats ont depuis été confirmés par une méta-analyse de différentes cohortes d'analyses transcriptomiques par Sanga et al. (38).

### C. Corrélation immunohistochimique

Ces tumeurs, moléculaires apocrines, sont caractérisées sur un plan transcriptomique par un profil proche mais distinct des tumeurs lumineales, sans expression du gène du RE, avec une expression du gène du RA et avec une activation de la voie des androgènes. Ceci se traduit sur le plan immunohistochimique par une identification possible reposant sur un RE négatif et un RA positif quel que soit le statut de HER2.

Les sous-groupes moléculaires selon Farmer peuvent être ainsi être corrélés à l'expression des récepteurs hormonaux stéroïdiens : tumeurs lumineales (RE+, RA+), basales (RE-, RA-) et apocrines moléculaires (RE-, RA+). La distinction de ces trois sous-groupes est rapportée dans le tableau 3. Les tumeurs HER2 amplifiées se répartissent dans les sous-groupes luminal et moléculaire apocrine.

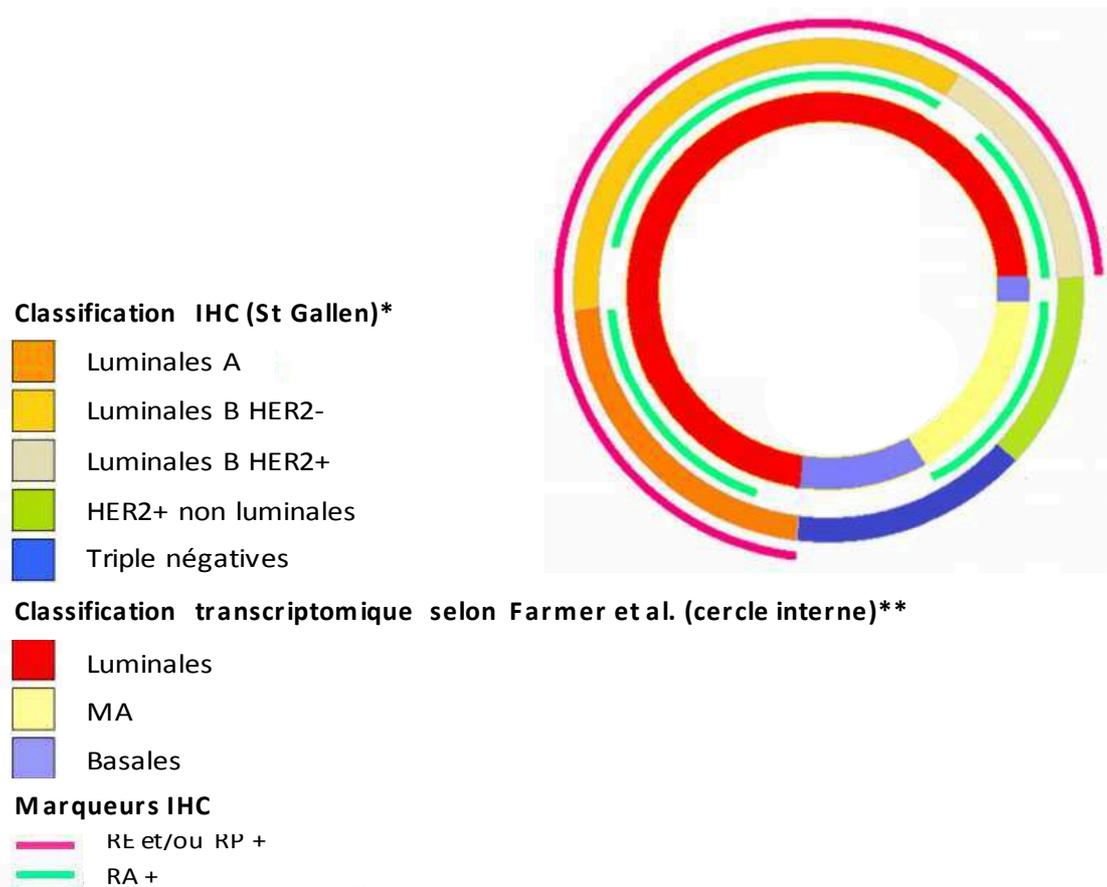
| Sous-groupe                      |                 | RA                 | RE/RP              | HER2 amplifié |
|----------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|---------------|
| <b>Luminal</b>                   |                 | Positif ou négatif | Au moins 1 positif | Oui ou Non    |
| <b>Moléculaire apocrine (MA)</b> | <b>MA HER2-</b> | Positif            | Négatifs           | Non           |
|                                  | <b>MA HER2+</b> | Positif            | Négatifs           | Oui           |
| <b>Basal</b>                     |                 | Négatif            | Négatifs           | Non           |

**Tableau 3. Classification moléculaire des cancers du sein selon Farmer et al. utilisée dans cette thèse et les corrléations immunohistochimiques.**

Classification adaptée de Farmer et al., *Oncogene* (32). RA : récepteurs aux androgènes ; RE : récepteurs aux œstrogènes ; RP : récepteurs à la progestérone ; HER2- : non amplifié ; HER2+ : amplifié.

La corrélation entre les trois sous-groupes transcriptomiques de Farmer et al. (32) et les groupes consensuels immunohistochimiques, représentés sur la figure 2, permet de visualiser la fréquence de chacun des sous-groupes.

La prévalence des cancers moléculaires apocrines sur la base des études transcriptomiques est de 8 à 11% de l'ensemble des cancers du sein localisé (32,37). Ce sous-groupe tumoral représente donc une entité relativement fréquente en pratique clinique courante. Considérant qu'environ 50000 femmes sont diagnostiquées avec un cancer du sein chaque année en France (39), environ 5000 sont des cancers moléculaires apocrines dont au moins 1 500 sont HER2-négatifs. Les travaux présentés dans cette thèse s'intéressent spécifiquement aux tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives.



**Figure 2. Fréquence relative des sous-groupes de cancer du sein selon la définition IHC usuelle en pratique clinique et la définition transcriptomique de Farmer et al.**

Adapté de Lakis S et al., *The Breast* (40). (\*) : classification IHC, reprenant les recommandations thérapeutiques de Saint Gallen (9) ; et (\*\*) : définition en trois groupes transcriptomiques selon Farmer et al. (32). MA : moléculaires apocrines. Basales : triple négatives RA-négatives.

## 2. Le récepteur aux androgènes

L'implication du récepteur aux androgènes dans la pathologie mammaire est connue depuis les années 1940 (41). La description du sous-groupe moléculaire apocrine par Farmer et al. en 2005 a provoqué un regain d'intérêt dans les cancers du sein pour ce récepteur d'hormones stéroïdes (32). En effet, le RA y occupe une place centrale.

Le récepteur aux androgènes (RA) (*NR3C4, nuclear receptor subfamily 3, group C, gene 4*) appartient au groupe des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdes avec le récepteur aux œstrogènes (RE), le récepteur aux glucocorticoïdes (RG), le récepteur à la progestérone (RP) et le récepteur des minéralocorticoïdes (RM) (42,43).

Les récepteurs hormonaux stéroïdiens (RHS) sont multiples mais possèdent une structure proche (44). Les RHS agissent de manière spécifiques selon le type cellulaire pour réguler de nombreux processus physiologiques, comme le métabolisme des glucides, le métabolisme lipidique, l'inflammation, mais également des processus pathologiques comme le cancer ou encore les maladies cardiovasculaires (45,46). Les hormones stéroïdes exercent la plus grande partie de leurs effets biologiques via leurs récepteurs, par une activité de régulation de gènes cibles (47,48). Le récepteur aux androgènes a ainsi une activité de facteur de transcription. Les RHS transmettent un signal aux gènes cibles en interagissant avec des séquences d'ADN spécifiques appelées *Élément de Réponse* mais également en interagissant avec diverses protéines co-régulatrices, co-activateurs et/ou co-represseurs (44,49,50).

### A. Les caractéristiques du RA

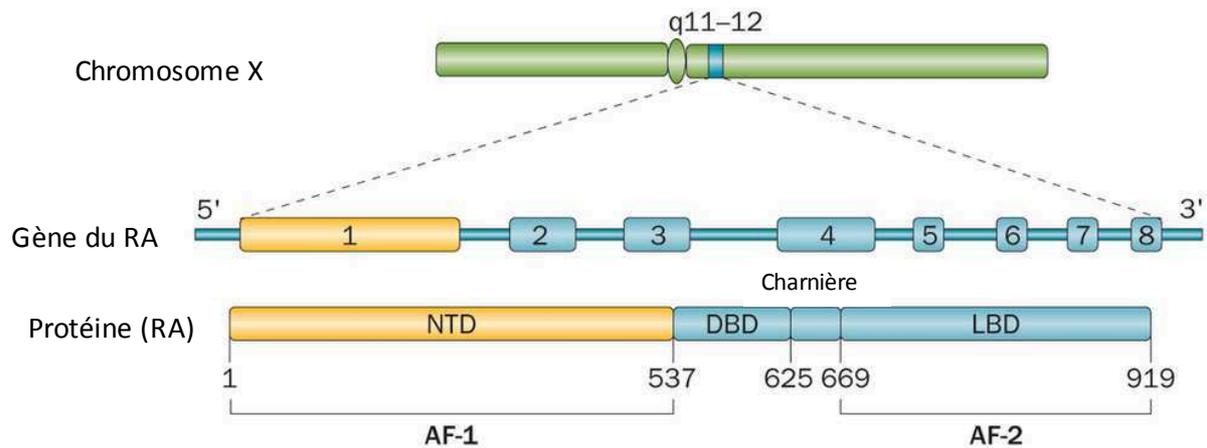
#### a. Description du RA

Comme décrit précédemment, le RA et ses voies de signalisation semblent centrales dans le sous-groupe de tumeurs moléculaires apocrines. Le gène du récepteur aux

androgènes est situé sur le bras long du chromosome X en position 12 (Xq12) et code pour un facteur de transcription activé par un ligand. Il possède 8 exons et 7 introns (51). Le gène du RA code pour une protéine de 110 kDa composée de 919 acides aminés (52). La protéine codante possède 2757 nucléotides.

Il existe deux variants d'épissage prépondérants du transcrit qui codent pour deux isoformes : la forme A de 87 kDa et la forme B de 110 kDa. Il est constitué de 3 domaines fonctionnels distincts: un domaine de transactivation N-terminal (NTD) (résidus 1–537), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) (résidus 537–625), une région charnière (résidus 625–669) et un domaine de liaison au ligand (LBD) (résidus 669–919) (53).

Ces trois domaines sont nécessaires pour la fonctionnalité du récepteur. Le DBD est un domaine très conservé qui lie le RA aux régions promotrices et *enhancer* des gènes RA-régulés par liaison directe à l'ADN pour permettre l'activation des fonctions des domaines NTD et LBD afin de stimuler la transcription de ces gènes. Le sous-domaine du NTD, *activation function 1* (AF1, résidus 142–485) est intrinséquement actif (54), tandis que le sous-domaine *activation function 2* (AF2) du domaine LBD a une activation ligand dépendante (55) (Figure 3).



**Figure 3. Structure du récepteur aux androgènes : gène et protéine.**

Adapté de Lorente D, et al. Nature Reviews Urology, 2015 (56). AF, Fonction d'activation; AR, récepteur aux androgènes; DBD, domaine de liaison à l'ADN; LBD, domaine de liaison au ligand; NTD, domaine de transactivation N-terminal.

### ***b. Activité de facteur de transcription***

En l'absence de ligand, le RA est localisé dans le cytoplasme, complexé avec des protéines chaperonnes, comme les HSP90 et 70 (*Heat Shock Protein*) qui le maintiennent dans une conformation stable, inactive présentant une haute affinité pour le ligand.

En tant que facteur de transcription, le RA est activé par la liaison de ses ligands stéroïdiens, la testostérone ou la dihydrotestostérone (DHT). La fixation du ligand sur le domaine de liaison du ligand du RA induit un changement de conformation, une dimérisation et une translocation dans le noyau.

En l'absence de ligand, RA comme RE sont maintenus dans un état inactif associé à des *Heat shock proteins* (57). Il existe trois principales modalités d'action de ces récepteurs.

La première est une induction de la transcription. Une fois liés à leurs ligands, les récepteurs subissent un changement conformationnel favorisant leurs localisations nucléaires et leurs dimérisations conduisant à la liaison à l'ADN. Le RA comme le RE, interagissent avec l'ADN via des séquences spécifiques (élément de réponse

aux androgènes, ARE, très proche des ERE pour le RE) (58,59). Ces séquences nucléotidiques spécifiques sont situées dans les régions promotrices des gènes cibles du RA. Pour y parvenir, ils interagissent et recrutent un ensemble de cofacteurs nucléaires pour entraîner l'activation ou la répression de ses gènes cibles. Certains de ces co-facteurs sont communs aux deux récepteurs.

Le RA (comme le RE) peut également interagir sur la transcription génique sans se lier directement à l'ADN, par interaction directe avec d'autres facteurs de transcription.

Enfin, les RA peuvent également avoir une action activatrice non-génomique à la membrane cellulaire pour y induire diverses voies de signalisation telles que la voie MAPK, avec une vitesse d'exécution beaucoup plus courte qu'avec les deux premiers modes d'action (60).

### *c. Activation du RA par les androgènes : les ligands du RA*

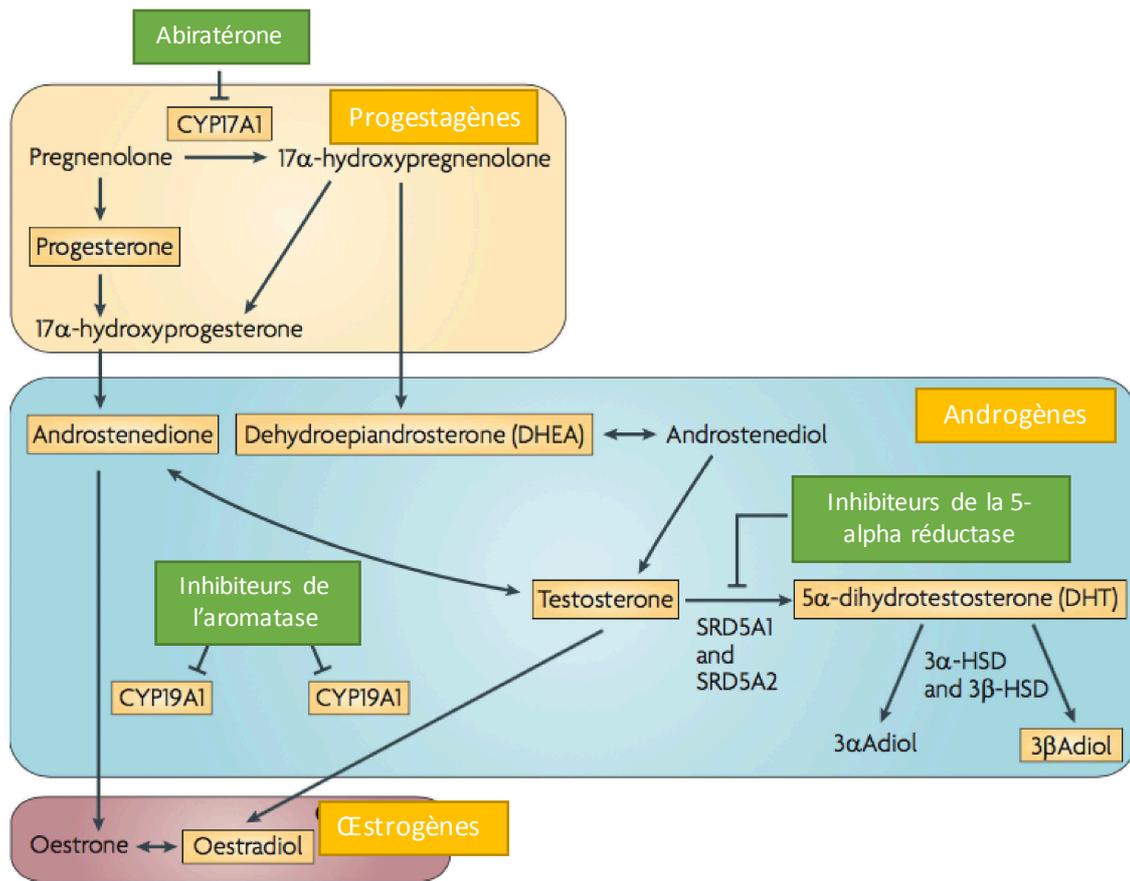
Le RA peut être activé par différents ligands correspondant à différents androgènes. Les principaux androgènes naturels sont la déhydroépiandrostérone (DHEA), l'androstènedione, la testostérone et le produit de sa conversion par la 5 $\alpha$  réductase, la dihydrotestostérone (DHT). Testostérone et dihydrotestostérone sont les principaux ligands du RA. La DHT possède une affinité plus élevée pour le RA que la testostérone (61). Chez l'homme, ces androgènes sont responsables du développement des organes génitaux externes, de l'appareil reproducteur et de la prostate (62). Les androgènes influencent également le métabolisme de différents tissus tels les os, les muscles, la peau et le tissu adipeux ainsi que le comportement (63).

Le cholestérol est le précurseur commun des hormones stéroïdiennes, dérivant de la pregnénolone, intermédiaire commun à toutes les hormones. Les androgènes sont biosynthétisés chez l'homme par les cellules de Leydig testiculaires, et chez la femme non ménopausée, par les ovaires. Il existe également une sécrétion de déhydroépiandrostèrone et d'androstènedione par les glandes corticosurrénales, qui seront converties en testostérone dans les tissus périphériques (64). Les hormones ainsi sécrétées sont libérées dans la circulation sanguine pour agir à distance sur les

organes cibles. La majorité de la production de testostérone est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire par l'intermédiaire de la LH (Luteinizing hormone), produite par l'hypophyse, elle-même sous contrôle de la sécrétion pulsatile de la LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone ; au niveau de l'hypothalamus). Dans les cellules des organes cibles, les enzymes 5  $\alpha$ -réductases convertissent la testostérone, en dihydrotestostérone (65).

La DHT constitue le principal androgène actif chez l'homme notamment dans la prostate. Chez la femme, c'est la testostérone qui est l'androgène biologiquement actif, produit principalement à partir de l'androstènedione. La DHT est chez la femme minoritaire car uniquement produite à partir de la conversion périphérique de la testostérone. Il est important de noter que chez la femme ménopausée, les œstrogènes sont produits à partir des androgènes par aromatisation du fait d'une enzyme spécifique, l'aromatase, notamment présente dans le tissu adipeux. Les traitements anti-aromatases représentent la base des traitements anti-hormonaux chez les femmes ménopausées ayant présenté un cancer du sein luminal.

Une synthèse locale mammaire de ces hormones a été décrite, à partir des précurseurs sanguin circulants (66). En outre, le tissu mammaire normal et tumoral possède l'ensemble des enzymes nécessaires à ces conversions et en particulier l'aromatase pour les œstrogènes, mais aussi la 5 $\alpha$ -réductase pour les androgènes (67). Les voies de synthèse des hormones stéroïdes, œstrogènes et androgènes, présentent d'ailleurs des liens forts, qui sont impliqués dans la physiopathologie des cancers du sein et de la prostate (figure 4).



**Figure 4. Voies de biosynthèse des hormones stéroïdes communes entre cancer du sein et de la prostate mettant en lumière la place centrale des androgènes.**

En vert, représentation des principales thérapeutiques anti-hormonales. Adapté de Risbridger GP et al., Nat Rev Cancer, 2010 (68). *3αAdiol* : *5α-androstane-3α,17β-diol*; *3βAdiol* : *5α-androstane-3β,17β-diol*; *3α-HsD* : *3α-hydroxystéroïde déhydrogénase*; *3β-HsD* : *3β-hydroxystéroïde déhydrogénase*.

#### d. Régulation du RA

L'activité transcriptionnelle du RA est régulée par plusieurs mécanismes physiologiques ou pathologiques. Environ 300 co-régulateurs potentiels du RA ont été identifiés (68). Les co-régulateurs peuvent être classés de manière fonctionnelle

comme co-activateurs ou co-répresseurs (69). Ces co-régulateurs peuvent intervenir sur de nombreux gènes cibles du RA, modifiant ainsi la disponibilité des éléments de réponse du RA (ARE), ou sur le métabolisme du RA (action sur le protéasome, sur les protéines chaperonnes comme notamment la HSP90) ou bien directement sur la structure et la fonction du RA (ligase, ubiquitinase, kinase, etc...) (70).

En plus des événements de régulation physiologique ou pathologique extrinsèques au RA par des co-régulateurs, il a été décrit des variants pathologiques du gène du RA lui-même. Il a ainsi été mis en évidence des mutations inactivatrices ou perte de fonction du domaine de liaison au ligand ainsi que des mutations activatrices (71). Ces altérations ont été rapportées dans les cancers de prostate avancés et pré-traités par hormonothérapie (agoniste ou antagoniste de la LHRH). Celles-ci viennent faciliter la signalisation du RA en conférant une promiscuité du ligand avec son récepteur, permettant ainsi au RA d'être activé même en présence de niveaux faibles voir absents d'androgènes. Par ailleurs, ces mutations peuvent être capables de moduler l'action des agonistes ou des antagonistes du RA pouvant induire des effets paradoxaux (72).

Le RA présente également des variants d'épissage influents sa fonction comme le variant AR V7 (73,74). Ces variants peuvent être des formes constitutionnellement actives du récepteur par perte du domaine de liaison au ligand mais conservant sa capacité d'activation de certaines cibles du RA. Enfin, des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination ou encore la SUMOylation jouent un rôle dans la régulation de la transcription du RA (75).

L'activation du RA peut donc être variable avec une régulation complexe et évolutive du fait par exemple de la stimulation/inhibition exogène de multiples co-facteurs. Son activation et sa régulation relèvent de mécanismes fins qui ont été principalement explorées dans les cancers de prostate.

## B. RA et cancer de prostate : androgéno-dépendance

Le modèle classique pour l'étude du rôle des RA est le cancer de prostate, reposant sur les données disponibles concernant son implication physiopathologique dans ce type de cancer.

La croissance de la glande prostatique est régulée par les androgènes (testostérone et ses métabolites actifs). Le maintien de cette croissance nécessite un niveau approprié de testostérone circulante. De même, le développement, la différenciation et la fonction de la glande prostatique sont sous cette même dépendance (76,77). Il est depuis longtemps connu qu'une orchidectomie bilatérale induit l'involution de la glande tandis que l'administration de testostérone exogène est alors capable de ré-induire une croissance prostatique (78).

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent et parmi le plus mortel des cancers masculins (79). Son développement et sa progression sont liés au RA et à la stimulation androgénique, classant ces cancers dans la catégorie des cancers hormono-dépendants et conduisant à une littérature scientifique riche sur le sujet (80). Les premières démonstrations d'efficacité d'un traitement anti-hormonal dans un cas de cancer de prostate datent de 1941 avec l'utilisation de traitement anti-androgénique par castration ou par une prise d'œstrogènes (81). Il y a plus de 70 ans, le Docteur Charles HUGGINS a ainsi démontré que la privation androgénique par orchidectomie bilatérale provoquait chez l'homme une régression des cancers de prostate (81,82) démontrant cliniquement le caractère androgéno-dépendant de cette maladie.

Dès son oncogénèse, le cancer de la prostate possède une dépendance très étroite avec le RA. Celle-ci est reliée à l'activation de différentes voies bien identifiées dans lesquelles le RA et les androgènes présentent déjà un rôle central. Un exemple notable est la régulation positive androgéno-dépendante des membres de la famille du facteur de transcription *E-twenty-six* (*ETS*). Des fusions de gènes entre le promoteur du gène *TMPRSS2* (régulé par le RA) et de *ETS* sont retrouvées dans environ 50% des cancers de prostate (83,84). Ces fusions induisent un pouvoir de réponse androgéno-dépendante aux facteurs de transcription *ETS*. La dépendance envers le RA et/ou les androgènes est donc omniprésente dans cette

physiopathologie tumorale. D'autres voies de signalisation moins spécifiques ont été impliquées dans le cancer de la prostate, comme les voies de signalisations PI3K et MAPK, tant dans les stades précoces qu'avancés dans les études de profils génomiques tumoral (85). Néanmoins les analyses des voies de signalisation du RA montrent que celles-ci gardent un rôle central à tous les stades tumoraux par rapport aux autres voies de signalisation retrouvées altérées.

La spécificité de l'addiction oncogénique envers le RA dans les cancers de la prostate a mené au développement de thérapeutiques spécifiques anti-hormonales. Ces principes physiopathologiques et thérapeutiques d'androgéno-dépendance du modèle de cancer de la prostate ont servi de base à la compréhension biologique et aux opportunités thérapeutiques dans les tumeurs moléculaires apocrines mammaires. Les premières explorations réalisées ont visé à comprendre la place biologique du RA dans ce sous-groupe de cancer du sein.

## C. RA et cancer du sein

### *a. Place et rôle du RA dans le sein normal et pathologique*

La balance androgènes/œstrogènes joue un rôle important dans le développement de la glande mammaire. Les œstrogènes induisent ainsi la croissance de la glande mammaire féminine alors qu'un excès endo- ou exogène d'androgènes aura tendance à inhiber ce développement (86). La prépondérance des androgènes est au contraire, chez l'homme, responsable de l'absence de développement de la glande mammaire telle que présente chez la femme.

En situation physiologique, les RA et RE utilisent les mêmes mécanismes d'action et peuvent entrer en concurrence avec une activité inhibitrice mutuelle. Cette compétition pour la liaison à l'ADN peut ainsi inhiber la signalisation dépendante des œstrogènes (87). De plus, l'activité facteur de transcription de ces deux récepteurs nécessite des cofacteurs communs, responsable d'une compétition entre ces deux récepteurs (revue dans (68)). L'interaction directe des deux récepteurs semble être inhibitrice pour les deux voies de signalisation comme le montre Panet-Raymond et

al. (88). La compétition se produit du fait d'un partage de séquence de liaison à l'ADN entre les deux facteurs de transcriptions (séquences ARE et ERE), conduisant à une diminution des effets pro-proliférants du RE (89).

En situation pathologique, les interactions entre RA et RE persistent probablement. RA et RE peuvent ainsi avoir des interactions fortes et compétitives, impliquant un effet inhibiteur du RA sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires en présence du RE (37,40-45). Il a été montré que les androgènes peuvent induire un effet antiprolifératif dans certains cancers du sein. Dans ces expériences la DHT inhibe la prolifération de certaines lignées cellulaires de cancer du sein RE et RA positifs; cet effet est par ailleurs également retrouvé dans un modèle *in vitro* de tissu mammaire normal (90–92). Une des explications rapportées propose un rôle de régulation du RA sur l'expression du récepteur aux œstrogènes bêta (93).

La croissance de certains cancers du sein pourrait donc résulter d'une balance fine entre les voies de signalisation des œstrogènes (pro-proliférants, comme décrit dans le tissu mammaire sain et les cancers du sein RE positifs) et la voie de signalisation des androgènes (inhibant la prolifération en présence du RE dans le tissu mammaire sain) (94). Cette balance implique la présence des deux récepteurs, comme dans la majorité des tumeurs RE positifs, luminales. Le point important semble être la présence ou l'absence du RE et non la présence seule du RA. Ainsi, la stimulation androgénique peut aussi bien majorer ou inhiber la croissance de différentes lignées cellulaires de cancer du sein (90). Il existe pourtant une hétérogénéité de ces résultats sur les mêmes lignées cellulaires et la non reproductibilité des résultats est liée en partie à des conditions de stimulation androgéniques différentes (androgène utilisé, DHT ou R1881 ; sérum utilisé et quantité d'androgènes exogène non maîtrisée) (95). Néanmoins, un consensus existe sur l'effet variable des androgènes et du RA sur la prolifération en fonction du type cellulaire mammaire renforçant l'hypothèse d'un effet lié à la présence ou non du RE.

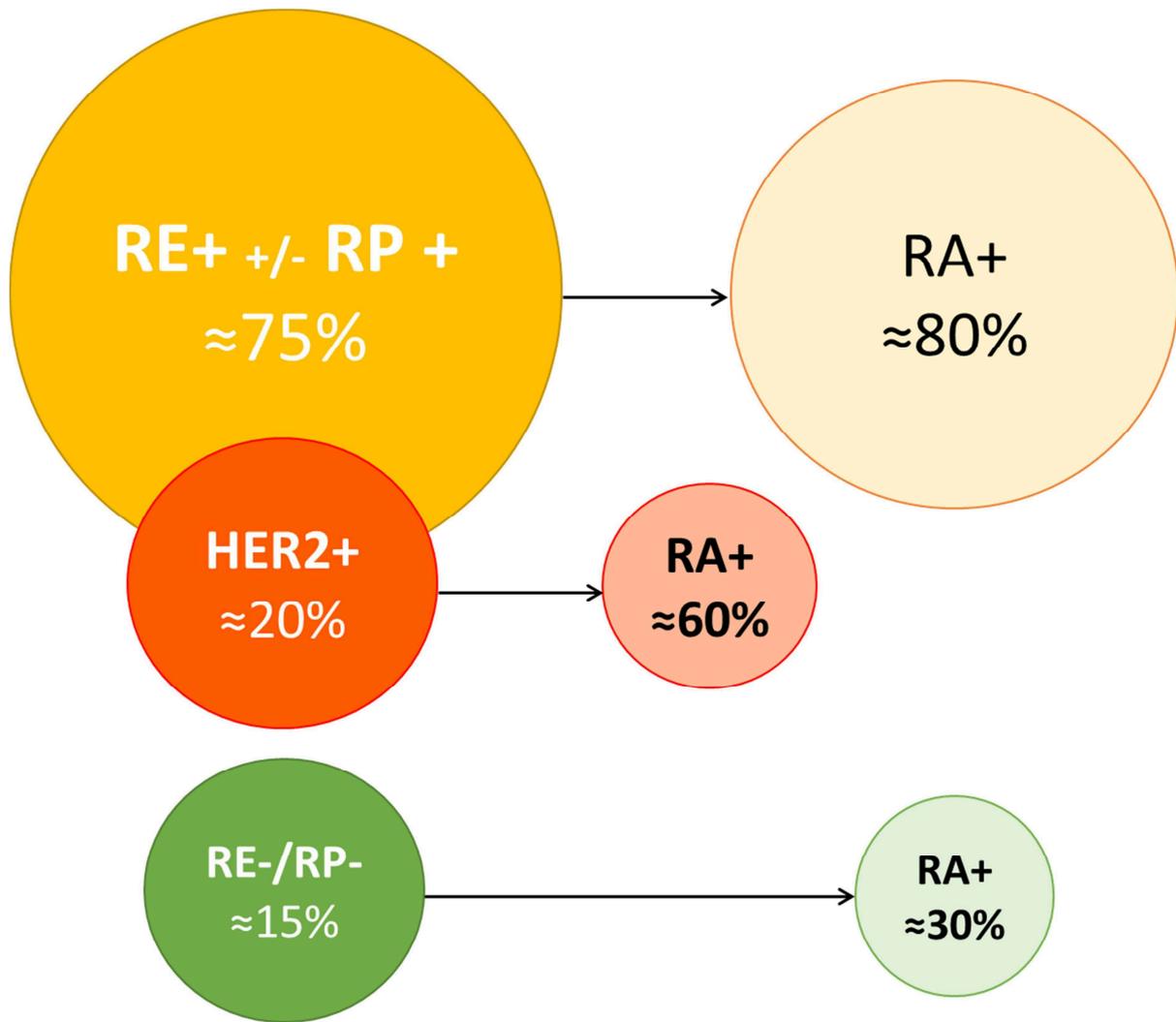
La découverte des tumeurs moléculaires apocrines (RE-, RA+), par l'équipe de Farmer et al. (32), conforte cette hypothèse dans le sens d'un rôle pro-proliférant du RA en l'absence de RE, soit pro-oncogénique. Dans les tumeurs luminales (RE+, RA+), le RA et la stimulation des androgènes auraient alors un rôle anti-proliférant en présence du RE.

Un argument pour l'activité pro-oncogénique des androgènes et du RA repose sur leurs rôles dans l'évolution métastatique des cancers du sein comme démontré dans un modèle préclinique (96). Il a été montré *in vitro* que la DHT est capable d'induire la transition épithélio-mésenchymateuse dans des cellules cancéreuses mammaires, indépendamment du RE mais sous la dépendance du RA. Cette transition épithélio-mésenchymateuse est un processus initial conduisant à la formation de métastases. La *lysine-specific demethylase 1A* (LSD1) semblerait nécessaire à ce processus par régulation épigénétique de certains de ces gènes cibles. RA et LSD1 sont, dans ce modèle, indispensables à ce processus d'évolution métastatique validé sur modèle murin (96).

La littérature concorde dans le cancer du sein vers un rôle ambivalent du RA avec en cas d'absence du RE, une action pro-oncogénique. Cette absence d'expression du RE correspond à la situation des tumeurs moléculaires apocrines et accrédite le rôle physiopathologique central du RA dans ces tumeurs.

### ***b. Prévalence et rôle pronostic du RA dans les cancers du sein***

Concernant la prévalence, des études immunohistochimiques indiquent que le RA est exprimé dans environ 75-80% des cancers du sein RE-positifs (97) et dans environ 30% des cancers RE-négatifs (98) (figure 5). La littérature retrouve selon les études une grande amplitude de fréquence de positivité du RA dans les tumeurs RE-positives, de 50 à 80%. Plusieurs explications peuvent être retrouvées comme la date de réalisation de l'étude, l'utilisation de diverses techniques immunohistochimiques et de divers seuils retenus pour définir la négativité/positivité des RA (99–101).



**Figure 5. Proportion de cancer du sein exprimant les récepteurs androgènes ( $\geq 10\%$ ) en IHC par sous-groupes définis selon le statut des récepteurs hormonaux et de HER2.**

Adapté de Vaz Luis I, et al., *Ann Oncol* (102). A gauche, prévalence des sous-groupes de cancer du sein en fonction du statut des RE/RP et de HER2 (HER2+: amplifié) ; à droite, proportion de tumeurs RA-positives (RA+) dans chacun de ces sous-groupes.

Concernant le pronostic et selon les dernières données disponibles issues d'une méta-analyse sur plus de 10000 patientes, il est retrouvé en analyse multivariée une amélioration de la survie sans maladie sur l'ensemble des patientes atteints de cancers du sein (HR=0,46 ; IC 95% : 0,37-0,58,  $p < 0,001$ ) et de la survie globale (HR=0,53 ; IC à 95% : 0,38-0,73,  $p < 0,001$ ) en cas d'expression du RA en IHC (103). Les auteurs présentent également des données effectuées au niveau transcriptomique sur 7220 patients. Ces données sont dans ce cas en faveur d'un bénéfice en survie sans progression et en survie globale en cas d'expression du RA mais uniquement en analyse univariée (HR=0,82 ; IC 95% : 0,72-0,92,  $p = 0,0007$  et HR=0,84 ; IC 95% : 0,75-0,94;  $p = 0,02$ ) (103).

Le RA apparaît comme un facteur pronostique positif de la survie dans les cancers du sein dans leur ensemble mais particulièrement dans les cancers RE-positifs en analyse multivariée (103). Deux autres méta-analyses confirment ce caractère pronostic positif (97,104). L'amélioration du pronostic corrélé à la positivité du RA dans les tumeurs mammaires RE-positives renforce l'idée d'un rôle d'inhibition du RA sur le caractère pro-oncogénique du RE.

Pour les tumeurs RE-négatives et HER2-amplifiées, l'expression du RA semble ne pas être associée à la survie (105–107).

Concernant les cancers du sein RE-négatifs et HER2 non-amplifiées (triple négatifs), le caractère pronostic de l'expression du RA a également été retrouvée (108–114). Il faut noter que cette association a longtemps été débattue avec certains auteurs ayant retrouvé une association pronostique négative pour la positivité du RA dans les tumeurs triple négatives (115,116) alors que d'autres n'ont trouvé aucune association avec la survie (105,117–121).

Une méta-analyse a pu conclure en faveur d'un rôle protecteur du RA qui apparaît corrélé à la survie sans progression dans les tumeurs RE-négatives (OR=0,42 ; IC 95% : 0,26 à 0,67 ;  $P < 0,001$ ) (104).

De plus, dans ces tumeurs triple négatives, la faible expression du RA est associée au risque de rechute métastatique (114). Il faut noter que l'expression du RA n'est pas systématiquement conservée (72% des cas, 36/50) entre la tumeur primaire et les métastases (108). Cette étude présente des effectifs limités et donc une conclusion de portée limitée sur ce point.

Les tumeurs triple négatives exprimant le RA, autrement dit, les tumeurs moléculaires apocrines, pourraient avoir du fait de cette expression un pronostic plus favorable que les tumeurs triple négatives RA-négatives. Ceci vient renforcer l'intérêt biologique et clinique d'identifier et de mieux appréhender ce sous-groupe de tumoral.

### 3. Caractéristiques des tumeurs moléculaires apocrines

Dans l'exercice clinique courant, les tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives présentent un besoin thérapeutique important par rapport aux HER2 positives qui elles bénéficient de la grande efficacité des thérapies ciblées anti-HER2 disponibles (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab et T-DM1) (31). L'identification du sous-groupe moléculaire apocrine HER2-négatif est ainsi devenue une question d'intérêt afin d'isoler les patients ayant un pronostic et des possibilités de traitement potentiellement différents des autres tumeurs triple négatives. Cette démarche s'inscrit dans les recommandations de Saint-Gallen pour le traitement du cancer du sein qui insistent sur une discrimination des cancers basée sur la réponse à un traitement particulier (9), même si à ce jour aucun traitement spécifique n'a d'autorisation de mise sur le marché dans ce sous-groupe. L'utilisation d'un biomarqueur diagnostique simple et abordable a donc un grand intérêt pour identifier les groupes de patientes avec un potentiel thérapeutique particulier.

En termes de définition pratique, les tumeurs moléculaires apocrines ont été définies comme des tumeurs non-luminales, c'est-à-dire RE et RP négatives (seuil à 10%). La positivité du RA en IHC a été adoptée dans les séries rétrospectives et les essais cliniques prospectifs pour sélectionner parmi ces tumeurs non-luminales, les tumeurs moléculaires apocrines (98,122–124). Le seuil est là aussi posé à 10% pour considérer la positivité. En ce qui concerne HER2, la recherche de l'amplification est réalisée en anatomopathologie par IHC et *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) si nécessaire (IHC dit équivoque ou ++). Les analyses d'expression transcriptomique et de CHIP-Seq ont montré le rôle central d'HER2 dans les tumeurs moléculaires apocrines, même si toutes les tumeurs moléculaires apocrines ne sont pas HER2-amplifiées (32,125).

Certaines caractéristiques complémentaires à cette définition immunohistochimique qu'elles soient anatomopathologiques, biologiques ou cliniques peuvent représenter un intérêt dans l'identification et la prise en charge de ce sous-groupe tumoral.

Les caractéristiques décrites ci-dessous sont issues d'analyses réalisées majoritairement sur des tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives dans des

cohortes de tumeurs triple négatives même si certaines sont issues de tumeurs moléculaires apocrines HER2-positives (spécifié dans le texte).

## **A. Caractéristiques histopathologiques**

Les tumeurs moléculaires apocrines empruntent une partie de leur identité à des caractéristiques histologiques apocrines. Ces caractéristiques centrales dans ce sous-groupe tumoral vont être explicitées dans cette partie.

### ***a. Lésions apocrines mammaires***

La glande mammaire est une glande apocrine. Le terme « apocrine » fait référence à la manière dont est sécrétée la substance ; sueur dans les glandes sudoripares, lait dans les glandes mammaires (126). Les cellules de ces glandes ont deux pôles distincts : le pôle basal regroupe les organites nécessaires à la sécrétion ; le pôle apical où se forme progressivement la substance produite. Lors de l'excrétion, le pôle apical se fragmente et libère la substance.

Au cours de l'évolution, des glandes sudoripares répondant aux androgènes se sont retrouvées sous contrôle œstrogénique, ce qui a permis le développement de la glande mammaire. Dans la glande mammaire normale, des changements phénotypiques apocrines se produisent très fréquemment. Ceux-ci sont de nature bénigne mais peuvent aussi être de nature maligne (8). Une de ces anomalies est la métaplasie apocrine qui peut apparaître à partir d'une glande mammaire physiologique par une exposition élevée aux androgènes, comme montré chez les femmes transsexuelles prenant des androgènes exogènes (127).

Les lésions apocrines bénignes et les tumeurs moléculaires apocrines partagent une affinité commune aux androgènes. Dans des conditions physiologiques, les hormones sexuelles permettent une influence stimulante ou inhibitrice sur les cellules épithéliales mammaires. Les RE sont limités aux cellules épithéliales luminales et

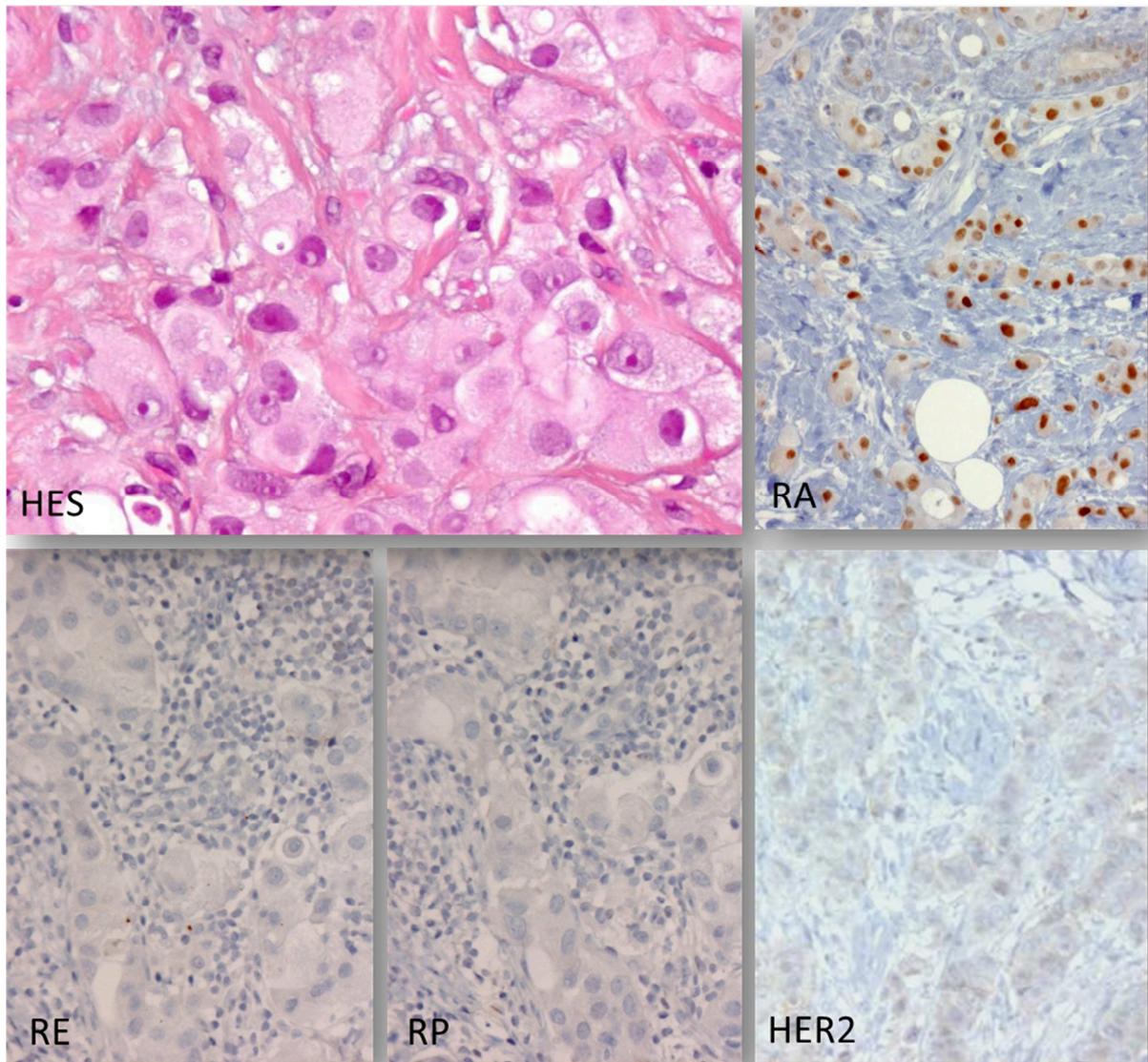
sont cruciaux pour la morphogenèse mammaire post-pubertaire (128). Les RA sont également présents sur les cellules épithéliales luminales mammaires. Leur activation n'est pas nécessaire pour le développement mammaire chez les femmes, mais elle joue un rôle majeur dans l'inhibition de la croissance glandulaire mammaire RE-dépendante à la puberté et chez les femmes adultes (53). Comme nous l'avons vu, en situation physiologique, les œstrogènes agissent donc comme facteurs de stimulation du développement mammaire tandis que les androgènes jouent plutôt un rôle inhibiteur. Les cellules mammaires luminales normales expriment le RA, dont l'action semble généralement être éclipsée par le récepteur aux œstrogènes. La perte d'expression du RE par ces cellules pourrait conduire au développement de la métaplasie apocrine (129), alors même que les cellules continuent d'exprimer un profil luminal.

La métaplasie apocrine peut être définie comme la conversion d'une cellule sensible aux œstrogènes en une cellule sensible aux androgènes. Ceci repose sur le postulat d'un rôle des androgènes dans la stimulation de l'épithélium mammaire vers le développement de cellules apocrines (130). La métaplasie apocrine et les tumeurs moléculaires apocrines partagent un enrichissement en différenciation apocrine même si la métaplasie apocrine n'est pas systématiquement retrouvée dans le sous-groupe tumoral moléculaire apocrine (32). Cependant, des caractéristiques histologiques de morphologie apocrines sont retrouvées associées de manière significative dans le groupe des tumeurs moléculaires apocrines (RE-, RA+) dans les études de Farmer et al. et Guedj et al. (32,37).

Le pendant malin de la métaplasie apocrine est le carcinome invasif apocrine (IAC). Les IAC sont un sous-type histologique rare de cancer du sein avec une incidence variant de moins de 1% à 4% (8). Ils présentent les mêmes caractéristiques de croissance tumorale que les autres carcinomes mammaires invasifs. La différenciation glandulaire de ces tumeurs est classique et comparable aux sous-groupes histologiques les plus fréquents. Leurs spécificités résident dans des caractéristiques morphologiques avec de grandes cellules présentant un cytoplasme granulaire éosinophile abondant et des nucléoles proéminents (figure 6). Ces tumeurs expriment majoritairement le RA et sont le plus souvent RE-négatives (8).

Un marquage par la GCDFP15 (*Gross cystic disease fluid protein 15*) a été décrit comme spécifique au caractère apocrine (8).

Alors que six des sept tumeurs moléculaires apocrines de l'article de Farmer et al. (32) étaient des tumeurs invasives apocrines en histologie, la réciproque n'est pas systématique. En effet, les tumeurs invasives apocrines peuvent présenter des profils immunohistochimiques distinctifs des tumeurs moléculaires apocrines. Ainsi elles peuvent présenter un profil RA- et RE+ (129,131) même si une série publiée, a retrouvé une majorité de profil RA+, RE-/RP- (132) comme celui des tumeurs moléculaires apocrines. Ces différences pourraient être liées aux variations de définition histopathologique des carcinomes invasifs apocrines. La superposition entre sous-groupe transcriptomique moléculaire apocrine et métaplasie/tumeurs apocrine invasive n'est donc pas totalement complète.



**Figure 6. Coupes histologiques d'un carcinome infiltrant apocrine mammaire.**

HES : hématoxyline éosine safran ; RA : récepteurs aux androgènes ; RE : récepteurs aux œstrogènes ; RP : récepteurs à la progestérone ; (captures fournies par le Dr Gatean MacGrogan).

Les carcinomes présentant une différenciation apocrine sont volontiers de grade faible ou intermédiaire (grade 1 ou 2 dans 70% des cas), présentent un taux de prolifération faible ( $Ki-67 \leq 15\%$  dans 73% des cas) et surviennent chez des patientes plus âgées (âge médian de 69 ans) par rapport au carcinome invasif de type non-spécifique (133). Dans une cohorte de 605 cancers du sein triple négatifs, il n'était pas retrouvé de différence de survie sans rechute invasive ou de différence de survie globale selon le sous-type histologique. Par contre, les métastases osseuses étaient

numériquement plus fréquentes et les rechutes invasives semblaient survenir plus tardivement dans les carcinomes invasifs apocrines que dans les autres sous-types histologiques (133). Ces caractéristiques clinico-pathologiques évoquent celles retrouvées dans les tumeurs lumineales (RE+).

### *b. Spécificités anatomopathologiques*

Quelques publications ont posé la question de l'identification et de la caractérisation anatomopathologique des tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives dans le groupe des tumeurs triple négatives. Les caractéristiques histologiques propres aux carcinomes apocrines peuvent aider à l'identification de ces tumeurs moléculaires apocrines comme nous venons de le détailler dans le chapitre traitant des lésions apocrines du sein. D'autres caractéristiques peuvent également être intéressantes. Ainsi, le grade tumoral des tumeurs moléculaires apocrines (HER2-) semble plus faible, grade I/II dans 25%, versus 13% dans l'ensemble des tumeurs triple négatives (29). L'atteinte ganglionnaire ne semble pas être différentielle par rapport aux autres sous-groupes de tumeurs triple négatives tout comme la taille tumorale au diagnostic (29). Les tumeurs lobulaires invasives semblent plus représentées dans le sous-groupe moléculaire apocrine HER2-négatif (10%) que dans l'ensemble des tumeurs triple négatives (3%) (29).

L'importance des androgènes et du RA dans les tumeurs triple négatives a entraîné une prise de conscience de l'intérêt de réaliser le marquage de l'expression du RA dans l'étude IHC diagnostique des tumeurs triple négatives au côté du RE, RP, et d'HER2 (134,135). Néanmoins, il faut garder à l'esprit que la corrélation exacte entre l'expression du RA en IHC et celle en ARNm n'a pas été établie dans de larges cohortes (36,136). Ainsi, simplifier la définition transcriptomique de la prépondérance de la voie du RA à l'expression du RA en IHC n'est probablement pas optimal. D'autres marqueurs se sont révélés fréquemment associés à ce sous-groupe tumoral, comme des marqueurs IHC décrits dans les carcinomes apocrines infiltrants et spécifiques du caractère apocrine.

La protéine GCDFP-15 (*Gross cystic disease fluid protein 15*) a été initialement décrite dans le liquide de kyste bénin et est exprimée dans la métaplasie apocrine (137). C'est un marqueur de différenciation apocrine qui peut être utilisé en pratique clinique pour progresser dans le diagnostic de tumeur métastatique de primitif non caractérisé pour définir une origine mammaire. Son expression est également corrélée aux tumeurs moléculaires apocrines (138). Cette association est confirmée par une tentative de définition des tumeurs apocrines moléculaires parmi les tumeurs RE-négatives, par l'équipe de Lehmann-Che (136). Les auteurs rapportent une signature RT-qPCR identifiant les tumeurs moléculaires apocrines. Celle-ci est composée de l'absence de surexpression de *ESR1*, de la surexpression du *RA*, de *FOXA1* et 3 des 5 gènes de la voie du RA suivant : *AGR2*, *ALCAM*, *SPDEF*, *TTF3*, *UGT2B28A*.

Cette signature permettrait de compenser le manque de sensibilité du RA en IHC. En effet, l'expression du RA en IHC n'identifie seulement que 58% des tumeurs moléculaires apocrines identifiées par cette signature transcriptomique, contre 90% pour FOXA1 (IHC). La combinaison IHC du RA et de FOXA1 n'améliore pas la sensibilité ou la spécificité de cette détection. Ainsi, la combinaison RE négatif, RA positif et FOXA1 positif en IHC identifie seulement 57% des tumeurs moléculaires apocrines. Par contre, la présence de HER2 (3+) ou de GCDFP15 positif en IHC identifie les tumeurs moléculaires apocrines avec une sensibilité de 94% et une spécificité de 100%.

Ainsi, plusieurs tentatives de définition IHC ont été publiées, tentatives non basées sur la positivité du RA. Si l'on considère l'expression protéique de GCDFP-15 et d'HER2 en IHC pour définir les tumeurs moléculaires apocrines, le RA n'est retrouvé exprimé que dans seulement 37,8% (139) ; en contradiction avec la définition classique reposant sur la positivité du RA.

Une autre équipe a testé la combinaison de plusieurs marqueurs IHC comprenant le RE, RP, SPDEF et ALCAM pour identifier les tumeurs moléculaires apocrines, retrouvant une sensibilité proche de 100% (IC 95% : 69-100%) et une spécificité de 94% (IC 95% : 79-99%) (36). D'autres biomarqueurs tels que GGT1 (Gamma-glutamyltransférase1) identifiés dans l'étude d'expression transcriptomique de Farmer et al. (32) ont été utilisés pour identifier les tumeurs moléculaires apocrines par IHC. Sur la base de 26 tumeurs RE négatives et GGT1 positives, seulement 19,2% de

celles-ci étaient également positives pour le RA démontrant la difficulté de trouver une définition de routine simple et reproductible (140).

EGFR et CK5/6 semblent être des marqueurs IHC négatifs de tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives (respectivement 30% et 11% de positivité dans l'étude de Lehmann-Che et al. (136)), au contraire des tumeurs basales.

En repartant de la définition communément acceptée, basée sur le RA, les résultats de plusieurs équipes convergent sur la possibilité de démarquer les tumeurs triple négatives RA-positives (MA) des RA-négatives par l'index de prolifération KI-67. Les tumeurs moléculaires apocrines (RA-positives) semblent être moins proliférantes que les basales RA-négatives, selon plusieurs études concordantes retrouvant des expressions de KI-67 plus faibles (40,141–145). Ce marqueur seul ne permet pas d'identifier pour autant les tumeurs moléculaires apocrines et est de plus soumis à des difficultés de reproductibilité inter observateur.

Au total, la positivité du RA associée à la négativité du RE en IHC ne semble pas parfaite pour identifier les tumeurs moléculaires apocrines (quel que soit le statut de HER2). Néanmoins, celle-ci gagne la pratique courante dans les centres experts pour identifier ces tumeurs (146). Les données de la littérature montrent que parmi les tumeurs triple négatives, une combinaison du RA avec des marqueurs tels que FOXA1 et/ou GCDFP15 semble présenter un réel intérêt car explore le caractère apocrine de ces tumeurs ; caractère au centre de la définition princeps de Farmer et al. (32).

## B. Caractéristique biologique des tumeurs moléculaires apocrines

Le rôle des œstrogènes dans le cancer du sein luminal et celui des androgènes dans le cancer de la prostate est une évidence. Le point commun est la place centrale des récepteurs stéroïdes dans ces deux types de cancer avec des implications thérapeutiques majeures. Celle-ci repose sur une réelle dépendance vis-à-vis des œstrogènes pour les tumeurs mammaires lumineales ou vis-à-vis des androgènes pour les cancers de prostate.

La biologie des tumeurs moléculaires apocrines est souvent simplifiée au rôle du RA et à la dépendance majeure de ces tumeurs vis-à-vis des androgènes en s'appuyant sur le modèle des cancers de prostate. Afin de ne pas se limiter uniquement à cette hypothèse physiopathologique, de nombreux travaux se sont intéressés à la biologie des tumeurs moléculaires apocrines pour en identifier les spécificités.

### a. Caractéristiques transcriptomiques et génomiques

#### Prépondérance transcriptomique des voies du métabolisme et des androgènes

La description des caractéristiques biologiques de ces tumeurs doit prendre en compte leur définition initiale. Ainsi, l'identification de ce sous-groupe est avant tout basée sur une description transcriptomique (32). Cette description princeps montre que la différence entre le groupe moléculaire apocrine versus luminal versus basal réside probablement sur une différence de type cellulaire et de différenciation cellulaire (32). Les 222 gènes fortement exprimés et qui discriminent les tumeurs moléculaires apocrines des autres sous-groupes ont été analysés selon leur fonction par *Gene Ontology* (147). Les auteurs montrent qu'un grand nombre de ces gènes sont classés dans la fonction «métabolisme» et sont liés à la synthèse des acides gras et des lipides. Une contamination par des cellules du tissu adipeux a été éliminée lors de cette analyse. Cette augmentation de l'expression des gènes du métabolisme semble être liée à la signalisation prépondérante des androgènes. En effet, l'activité du RA est significativement plus élevée dans le sous-groupe

moléculaire apocrine RE-/RA+ par rapport aux sous-groupes luminal et basal. L'activité du RE apparaît par contre significativement plus élevée dans le sous-groupe luminal par rapport au sous-groupe basal et celle-ci est intermédiaire dans le sous-groupe moléculaire apocrine sans être aussi faible que dans le sous-groupe basal. Cette analyse fournit une information centrale : les tumeurs moléculaires apocrines présentent un RA actif et central alors même que la signalisation des voies du RE est faible ou inexistante.

Cette analyse est partagée par l'équipe de Doane et al. (36) qui décrit également que les tumeurs du sous-groupe moléculaire apocrine (nommées RE- classe A) se distinguent des tumeurs basales (nommées RE- classe B) par un programme transcriptionnel proche des tumeurs lumineuses malgré une négativité de l'expression du RE. De plus, de nombreux gènes régulés par des facteurs de transcription hormonaux (RE et/ou RA) sont retrouvés parmi les 138 gènes les plus différenciellement exprimés entre les tumeurs RE- classe A et B, en faveur d'une sur-expression dans le sous-groupe moléculaire apocrine (classe A). Ainsi des gènes tels que *AR*, *CYB5*, *XBP1*, *FOXA1*, *SPDEF*, *APOD* et *PIP* font partis des 50 gènes les plus différenciellement sur-exprimés entre les 2 groupes de tumeurs RE-négatives

Des études se sont également intéressées au profil transcriptomique immunitaire des tumeurs moléculaires apocrines. Celles-ci ne semblent pas présenter un profil de réponse immunitaire en analyse transcriptomique au contraire d'autres sous-groupes de tumeurs triple négatives, tel que le sous-groupe immunomodulateur (27,29,148).

## La place d'HER2

L'autre point majeur identifié par les deux équipes (Farmer et Doane, (32,36)) est la prépondérance des tumeurs HER2-amplifiées dans le groupe moléculaire apocrine. Ce récepteur HER2 joue probablement un rôle central dans ces tumeurs. L'amplification du gène *ERBB2* est retrouvée dans environ 15 à 20 % de l'ensemble des cancers du sein. Farmer et Doane décrivent que le taux de surexpression de HER2 dans les tumeurs moléculaires apocrines est d'environ 50% et 30%

respectivement, démontrant un enrichissement en tumeurs HER2-amplifiées dans ce sous-groupe (32,36). Des études basées sur l'IHC retrouvent qu'environ 50% des tumeurs moléculaires apocrines (RE-, RA+) surexpriment HER2 (146,148,158). Naderi et al. (149) ont mis en évidence *in vitro* une signalisation croisée entre la voie androgénique et la voie HER2 passant par une phosphorylation de la protéine ERK1/2. Ceci renforce la suspicion du rôle physiopathologique d'HER2 dans ces tumeurs qui ne présentent pourtant pas toutes une amplification du gène *ERBB2*.

### Profil génomique

Les données transcriptomiques de ce sous-groupe ont été récemment complétées par des données de profil génomique tant sur le plan mutationnel que sur le plan du copy-number. En reprenant la classification de Lehmann et al. (27) définissant des sous-groupes de tumeurs triple négatives, l'équipe de Bareche et al. identifie un taux de mutation de la voie PI3K/AKT/MTOR de 75% dans les tumeurs du sous-groupe LAR ; sous-groupe superposable aux tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives (29). Ainsi, les taux de mutation des gènes *PIK3CA* ou *AKT1* sont les plus importants parmi les différents sous-groupes de tumeurs triple négatives avec 55% et 13% respectivement de tumeurs moléculaires apocrines mutées.

Une publication antérieure avait déjà rapportée que 40% des tumeurs MA sont mutées sur les codons hotspots du gène *PIK3CA* contre 4% pour les autres sous-groupes de tumeurs triple négatives (150). Une analyse de Millis et al. confirme également cette prévalence des altérations de la voie PI3K dans les tumeurs MA. Cette équipe retrouve un taux de mutation de *PIK3CA* de 36% (triple négatifs RA+, N=95) versus 9% (triple négatifs RA-, N=524). Les mutations de *AKT1* sont également plus fréquentes dans les tumeurs triple négatives RA+ versus RA- (12% versus 0,5%, 9/73 et 2/372 respectivement) ainsi que les mutations de *PTEN* (12,9% versus 2,0%) (151).

Par ailleurs, il est retrouvé un taux important de mutation de *CDH1* de 13%, bien supérieur aux autres sous-groupes. Ceci explique la sur-représentation des tumeurs

lobulaires infiltrantes en histologie, caractérisée par la perte de l'E-cadhérine codée par le gène *CDH1* (29).

Enfin, les tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives semblent présenter le taux de mutation (*mutational burden*) le plus élevé des sous-types de tumeurs triple négatives avec une médiane de 4 mutations exoniques par tumeur (29).

### ***b. Caractéristiques biologiques et voies de signalisation impliquées***

La première caractéristique ayant intéressé les équipes travaillant sur les tumeurs moléculaires apocrines a été la recherche de preuve d'une androgéno-dépendance de ces tumeurs. Depuis des décennies, le modèle cellulaire MDA-MB-453 a été étudié et a fourni le plus grand nombre d'informations biologiques disponibles sur ce sous-groupe. L'équipe de Doane et al. (36) ont fait le lien entre cette lignée et les tumeurs moléculaires apocrines, avec un profil d'expression très proche permettant de renforcer la présomption que ce sous-groupe tumoral présentait une addiction réelle aux androgènes. Les informations les plus publiées concernent l'addiction aux androgènes de cette lignée caractérisée par une androgène-dépendance de sa croissance, induite par les androgènes, inhibée par les anti-androgènes (90,152). Cette addiction particulière, validée par d'autres équipes (36,150,153) puis par des données *in vivo* (125,153) a servi de base au rationnel des essais thérapeutiques existants sur les tumeurs moléculaires apocrines.

Les connaissances sur les tumeurs moléculaires apocrines ont progressé en 2011 grâce aux analyses de ChIP-Seq (*chromatin immunoprecipitation DNA sequencing*) réalisées sur des lignées cellulaires de carcinome de ce sous-groupe. Ces expériences mettent en évidence des mécanismes physiopathologiques du RA avec un potentiel intérêt théranostique.

Récemment, Malinen et al. (154) ont montré via l'étude du cistrome du RA, que la lignée cellulaire de sous-type proche des tumeurs moléculaires apocrines (MDA-MB-453) et celle de cancer de prostate (VCaP) partagent une grande partie des sites de fixation sur les gènes cibles du RA. Cette information vient renforcer le rôle central du

RA dans ces deux cancers. Robinson et al. (155) ont montré que le RA était nécessaire à la prolifération par utilisation de siARN, confirmé par des tests avec un inhibiteur sélectif du RA. Ces auteurs montrent également la dépendance fonctionnelle du RA envers FOXA1. FOXA1 est un facteur de transcription impliqué dans la modulation de l'activité du RE et du RA dans le cancer du sein (RE+) et du RA dans la prostate, rendant l'ADN plus accessible à ces deux facteurs de transcription (156). Son expression accrue avait été identifiée dans les analyses transcriptomiques décrivant le sous-groupe moléculaire apocrine (32,36). Dans les tumeurs moléculaires apocrines, FOXA1 joue le même rôle de co-facteurs pour le RA que pour le RE dans les tumeurs de sein RE+. Il interagit avec les zones de chromatine habituellement occupées par le RE dans les tumeurs lumineales afin d'induire la transcription de gènes RE dépendants. Ceci explique que les études transcriptomiques ont décrit les tumeurs moléculaires apocrines comme partageant un certain nombre de transcrits avec les tumeurs lumineales.

Ni et al. (125) ont confirmé cette collaboration entre FOXA1 et RA et identifié le rôle central potentiel de HER2. L'identification de l'existence d'une régulation mutuelle entre HER2 et FOXA1 (157) et la découverte que HER2 est un gène cible du RA (125,158) renforcent cette suspicion. Pour ce faire, le RA stimule la voie Wnt, via la transcription de Wnt7b, qui elle-même recrute la  $\beta$ -caténine, aboutissant à l'induction d'HER3 (à l'aide du RA) et secondairement la voie HER2 (125).

Il est maintenant démontré que les androgènes stimulent la prolifération cellulaire via le RA, par l'interaction de FOXA1 et la stimulation des voies de signalisation en aval d'HER2, induisant ainsi une diversité de voies de signalisation pro-oncogéniques. Il a ainsi été mis en lumière une inter-relation entre RA, HER2 et ERK par une boucle de régulation pour laquelle les auteurs proposent qu'HER2 soit nécessaire pour que le RA active la voie de signalisation ERK. Le rôle d'HER2 semble là aussi central dans la relation entre les voies de signalisation du RA et MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*)/ERK pour promouvoir la prolifération cellulaire (149,158).

Les explorations biologiques ont par la suite concerné d'autres voies de signalisation classiquement dérégulées dans les cancers de manière générale. Ainsi, une étude a retrouvé une activation des récepteurs EGFR et PDGFR $\beta$  dans les triple négatifs RA-positifs (159). Il a également été démontré que MYC est induit par le RA et HER2 /

HER3 (eux-mêmes induits par RA) ce qui conduit à un renforcement de la transcription des gènes sous contrôle androgénique (160). Toutes ces études démontrent clairement les liens étroits entretenus entre RA, HER2 / HER3 et diverses voies de signalisation pro-oncogéniques. Comme nous l'avons vue, une des voies classiquement impliquée dans la physiopathologie des tumeurs MA est la voie PI3K/AKT/mTOR. Notre équipe d'oncogénétique a démontré que les patients atteints de la maladie de Cowden (perte constitutionnelle de *PTEN* prédisposant entre autres aux cancers du sein) développent des carcinomes mammaires avec une signature transcriptomique proche de celle des tumeurs moléculaires apocrines ainsi qu'un profil IHC proche des tumeurs apocrines infiltrantes (161). La perte de *PTEN* (gène suppresseur de tumeur, inhibant la voie PI3K) libère l'inhibition et permet l'induction de la voie HER2 / PI3K / AKT. Même si les comparaisons avec les tumeurs MA doivent rester limitées du fait que les tumeurs du sein des maladies de Cowden peuvent être RE+, ces données convergent vers une dérégulation majeure de la voie PI3K dans les tumeurs moléculaires apocrines.

Les études biologiques spécifiques aux tumeurs moléculaires apocrines ont apporté la preuve du caractère central du RA, de ces voies de signalisation ainsi que des voies de signalisation sous contrôle d'HER2 comme la voie PI3K.

### C. Caractéristiques cliniques et radiologiques

Il existe peu de cohortes publiées de tumeurs moléculaires apocrines, toutes avec un nombre de patientes limité. Il semble que les patientes présentant des tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives soient plus âgées que la moyenne des patientes présentant une tumeur triple négative (122–124,162). Ainsi, seulement 8% des patientes avec une tumeur moléculaire apocrine (HER2-) ont moins de 45 ans contre 22% pour l'ensemble des tumeurs triple négatives (29). De plus, l'histoire de la maladie pourrait permettre d'identifier les tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives dans le sous-groupe des tumeurs triple négatives. Ainsi, certains auteurs retrouvent plus de rechute locale dans les tumeurs moléculaires apocrines par rapport aux autres sous-groupes de cancer du sein même si ces données sont

limitées par le nombre de patientes et par le fait que les tumeurs moléculaires apocrines considérées comprennent des tumeurs HER2-amplifiées (136). Le pronostic de ces tumeurs ne semble pas permettre d'isoler franchement ce sous-groupe tumoral du reste des tumeurs du sein RE-négatives comme détaillé dans le chapitre pronostic de ce sous-groupe tumoral.

Dernièrement, de nouvelles pistes ont été explorées pour isoler ces tumeurs. Ainsi, une étude a montré des différences en termes d'imagerie de la tumeur mammaire primitive entre cancer triple négatif RA+ (MA) et RA- (basal) avec plus de microcalcification et des marges plus spiculées en cas de tumeurs moléculaires apocrines (163). Ces données pourraient constituer un complément aux données nécessaires de type anatomopathologiques et restent à confirmer.

#### *a. Pronostic des tumeurs moléculaires apocrines*

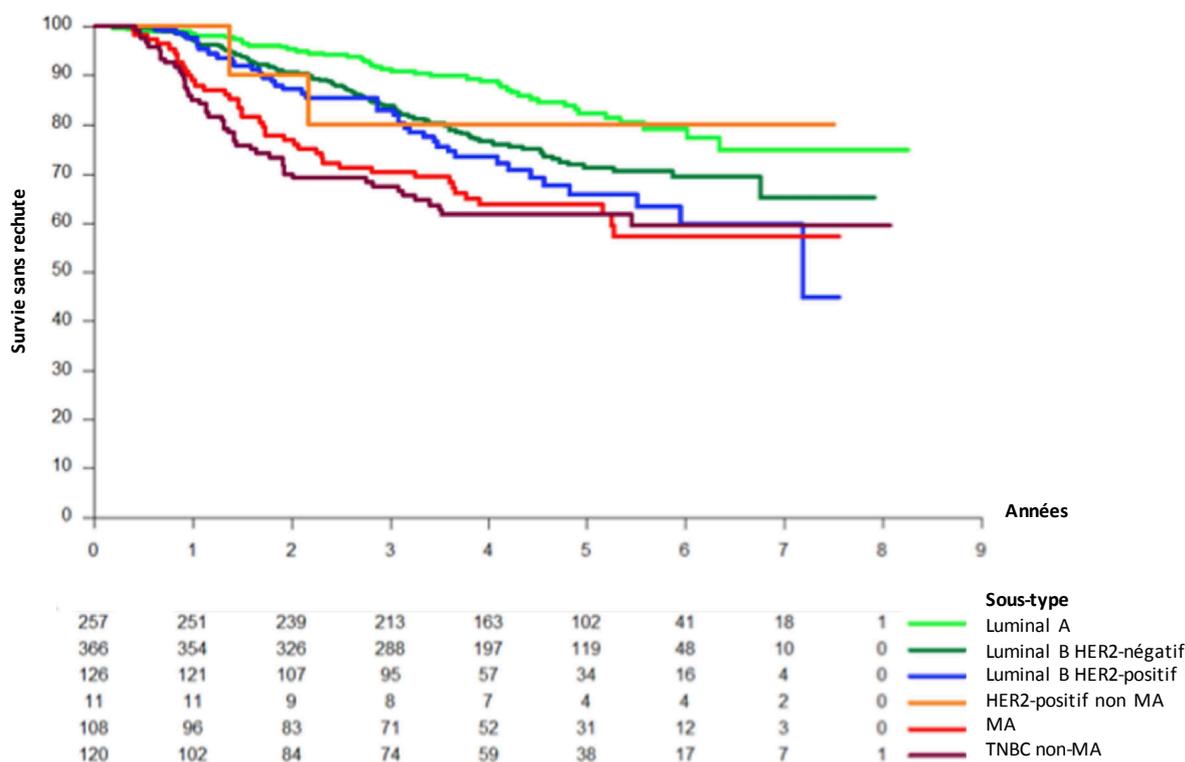
Les difficultés d'identification des tumeurs moléculaires apocrines soulèvent la question des données de caractéristiques cliniques et de pronostic disponibles dans la littérature concernant ces patientes.

#### **Pronostic général du sous-groupe moléculaire apocrine**

Concernant l'ensemble des tumeurs moléculaires apocrines (HER2 amplifié ou non), les données publiées révèlent une proportion significative de récurrence dans les 5 ans suivant la prise en charge locale de ces tumeurs, entre 35 et 45% (37,136,164). Guedj et al. (37) ont rapporté un taux de rechute métastatique de 38% à 5 et 15 ans, ce qui n'est pas vraiment distinct des tumeurs basales (36%) avec un profil de récurrence précoce entre 18 et 60 mois, puis un plateau signifiant la rareté des rechutes tardives. Les sites métastatiques semblent néanmoins différer des tumeurs basales avec plus de lésions osseuses (57% vs 24%) et de métastases hépatiques (43% vs 29%) (37).

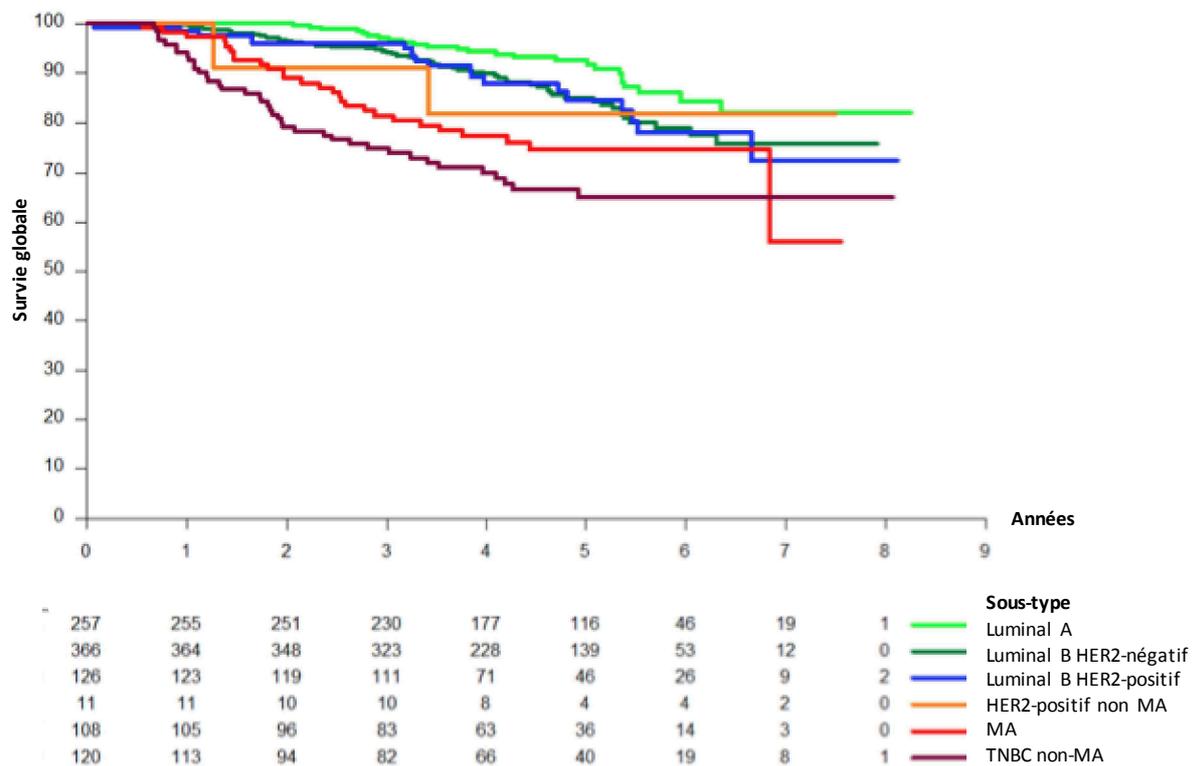
Des données non encore publiées de notre équipe sur plus de 1000 cancers du sein (issues de l'essai EORTC 10994 (165)) retrouvent un taux de rechute à 5 ans comparable à ceux publiés d'environ 36% dans le sous-groupe moléculaire apocrine (figure 7). La définition des sous-groupes dans cette analyse est basée sur l'IHC. Concernant les taux de rechute (comprenant les rechutes locales et à distance) à 5 ans, ils sont de 45% pour les MA (quel que soit le statut HER2) versus 43% pour les tumeurs basales (RE/RP-, RA-). De plus, la survie globale à 5 ans entre MA (quel que soit le statut HER2) et triple négatives non-MA) favorise les MA (75% et 66% respectivement) (figure 8).

Lakis et al. (40) ont décrit dans une analyse similaire une meilleure survie sans maladie et survie globale dans les tumeurs RE-/RA + comparées aux tumeurs RE-/RA- dans une cohorte de patientes traitées par chimiothérapie de type taxanes en stade précoces. Cependant, le sous-groupe de tumeurs MA de cette étude comprenait également des tumeurs HER2-amplifiées. Soixante-huit pourcent des tumeurs étaient ainsi HER2-amplifiées, ce qui peut introduire un biais dans l'interprétation de la chimiosensibilité. En effet, les tumeurs HER2+, quels que soient leurs statuts de récepteurs hormonaux, sont connues comme étant chimiosensible et particulièrement sensibles aux taxanes (166). Les données de survie des tumeurs classées comme moléculaires apocrines sont donc dans ce type d'étude à interpréter avec prudence car limitées par la non-différenciation des tumeurs selon le statut HER2 (40). Ce biais majeur repose sur un pronostic intrinsèquement différent en fonction de l'amplification ou non d'HER2 mais également sur la disponibilité de thérapies spécifiques anti-HER2.



**Figure 7. Courbe de survie sans rechute (locale ou à distance) issue de la cohorte de l'étude EORTC 10994 (165).**

Données non publiées (Pr H. Bonnefoi) sur 1092 patientes ayant présenté lors de l'inclusion un cancer du sein de stade localisé non métastatique (sauf stades T1 N0-1). Patientes traitées au sein de l'essai par chimiothérapie néo-adjuvante. MA : tumeurs moléculaires apocrines quel que soit le statut HER2. TNBC : tumeur triple négative.



**Figure 8. Courbe de survie globale issue de la cohorte de l'étude EORTC 10994 (165).**

Données non publiées (Pr H. Bonnefoi) sur 1092 patientes ayant présenté lors de l'inclusion un cancer du sein de stade localisé non métastatique (sauf stades T1 N0-1). Patientes traitées au sein de l'essai par chimiothérapie néo-adjuvante. MA : tumeurs moléculaires apocrines quel que soit le statut HER2. TNBC : tumeur triple négative.

### Pronostic spécifique des tumeurs moléculaires apocrines HER2 non-amplifiées

Des données spécifiques aux tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives, TNBC-RA+, ont été rapportées. Lehmann et al. (27) retrouvent que les tumeurs TNBC-RA+ semblent avoir un taux de survie sans rechute plus faible que les autres sous-types de TNBC, mais sans aucune différence en survie sans métastase. Ceci évoque une propension significative à la rechute locale (27). Dans une cohorte

récente également basée sur une identification transcriptomique selon la classification de Lehmann et al. (27), les tumeurs triple négatives du sous-groupe LAR (équivalent au moléculaire apocrine HER2-négatif) sont associées à un moins bon pronostic en termes de survie globale (HR = 1.47; IC = 1,0-2,14; p = 0,046) par rapport aux autres sous-groupes de tumeurs triple négatives (29).

Ces données spécifiques aux tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives identifiées par analyse transcriptomique ne confirment pas les études démontrant un risque réduit de rechute corrélé avec l'amplitude d'expression du RA en IHC. Ces études sont en effet plutôt en faveur d'une relation entre la positivité du RA en immunohistochimie et l'amélioration de la survie globale ou de la survie sans récurrence dans les tumeurs triple négatives (108–110,112–114). Une de ces études retrouvent ainsi un taux de survie sans rechute de 65,5% pour les tumeurs triple négatives RA-négatives versus 85,7% pour les TNBC RA-positives (p=0,0544) (167). En survie globale les taux respectifs sont de 76,2% versus 95,2% (p=0,0355).

Dans notre cohorte issue de l'essai EORTC 10994 utilisant une classification IHC des tumeurs), si les tumeurs moléculaires apocrines HER2-amplifiées ne sont pas pris en compte dans l'analyse, le taux de rechute à 5 ans (locale ou à distance) est de 34% dans les MA HER2- (vs 52% pour les MA HER2+) prouvant le caractère pronostic délétère de la surexpression de HER2. Dans le sous-groupe des tumeurs triple négatives, la survie globale à 5 ans entre tumeurs moléculaires apocrines (RA+) et non-moléculaire apocrine (RA-) est équivalente même si les taux de rechutes sont légèrement inférieurs dans les RA+. Dans cette analyse spécifique distinguant en deux groupes les tumeurs triple négatives en fonction du RA en IHC, les tumeurs MA semblent avoir un pronostic relativement identique aux tumeurs dites basales (RA-).

Les données de pronostic des tumeurs moléculaires apocrines apparaissent donc contradictoires selon la prise en compte ou non des tumeurs HER2-amplifiées. Il existe aussi une disparité selon la définition utilisée, transcriptomique ou immunohistochimique au sein des tumeurs moléculaires apocrines HER2 non-amplifiées. Ces cohortes sont par ailleurs souvent limitées par leur puissance, l'hétérogénéité des traitements reçus et la durée de suivi des patientes, ce qui peut expliquer ces différences.

Néanmoins, il apparaît que les tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives, identifiées en transcriptomique ou en IHC, ne présentent probablement pas de meilleur pronostic par rapport aux autres tumeurs triple négatives (RA-). Ce pronostic reste ainsi péjoratif par rapport aux tumeurs luminales.

### ***b. Chimiosensibilité des tumeurs moléculaires apocrines***

La question de la chimiosensibilité des tumeurs moléculaires apocrines a été analysée grâce à des cohortes de patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante. Pour les tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives, qui sont des tumeurs triple négatives, les traitements sont actuellement basés sur la chimiothérapie par taxanes ou anthracyclines (24). Les tumeurs triple négatives dans leur ensemble ont un taux de réponse complète histologique (RCH, ypT0/ypTis et ypN0) après chimiothérapie néoadjuvante d'environ 30%, ce qui est plus élevé que les tumeurs luminales (7,5% pour les luminales A et 15% pour les luminales B) mais inférieur au HER2-positives RE-négatives (36%) (168,169). La RCH est corrélée avec la survie sans événement et la survie globale dans les tumeurs triple négatives (168,169). Lorsque toutes les tumeurs du sein sont considérées, l'expression du RA est associée à une augmentation des taux de RCH, 24,5% (RA +) contre 12,7% (RA-) ( $p = 0,0086$ ) (167).

Lorsque l'on considère uniquement les tumeurs triple négatives RA+ (MA HER2-), une petite cohorte (20 patients) rapporte un taux de RCH moindre après chimiothérapie (10%) versus l'ensemble des tumeurs triple négatives (28%) (170). Des analyses récemment publiées concluent dans le même sens (171,172), arguant pour une potentielle moins bonne chimiosensibilité des tumeurs triple négatives RA+ (MA) versus RA-.

Loibl et al. (167) ont retrouvé des résultats légèrement différents avec un taux de RCH de 29% dans les triple négatifs RA+, non significativement différents des 33% pour les triple négatifs RA-. Ces résultats sont corroborés par nos propres résultats non publiés (issus de l'étude EORTC 10994), 34% (N=38) versus 30% (N=120)

respectivement. Ces 2 cohortes présentent l'avantage d'un nombre de cas analysés relativement important.

Dans l'hétérogénéité des tumeurs triple négatives, l'identification des tumeurs moléculaires apocrines HER2-non amplifiées n'a, à ce jour, pas permis de montrer de variations franches et significatives des taux de RCH et de survie par rapport aux tumeurs basales. Le profil d'expression luminal et l'expression du RA ne semble également pas conférer le même profil de pronostic que ceux observés dans les tumeurs lumineuses, RA-positives. Un pronostic faible est partagé par les sous-groupes basaux et moléculaires apocrines. Cette absence de différence de pronostic rappelle que celui-ci est sombre dans les tumeurs triple négatives car repose sur des traitements non-ciblés, de chimiothérapie.

## 4. Modèles d'étude préclinique

Les avancées dans les connaissances des tumeurs moléculaires apocrines nécessitent des données précliniques génératrices d'hypothèses en vue d'améliorer la prise en charge spécifique de ces tumeurs. Pour ce faire, un ou des modèles d'études précliniques reproduisant la biologie des tumeurs moléculaires apocrines sont nécessaires. Une lignée cellulaire est largement reconnue comme représentant le sous-groupe moléculaire apocrine, la lignée MDA-MB-453. Celle-ci représente le modèle classique des tumeurs MA utilisé dans la littérature scientifique et ayant conduit à l'identification de caractéristiques biologiques de ce sous-groupe.

### A. La lignée cellulaire MDA-MB-453

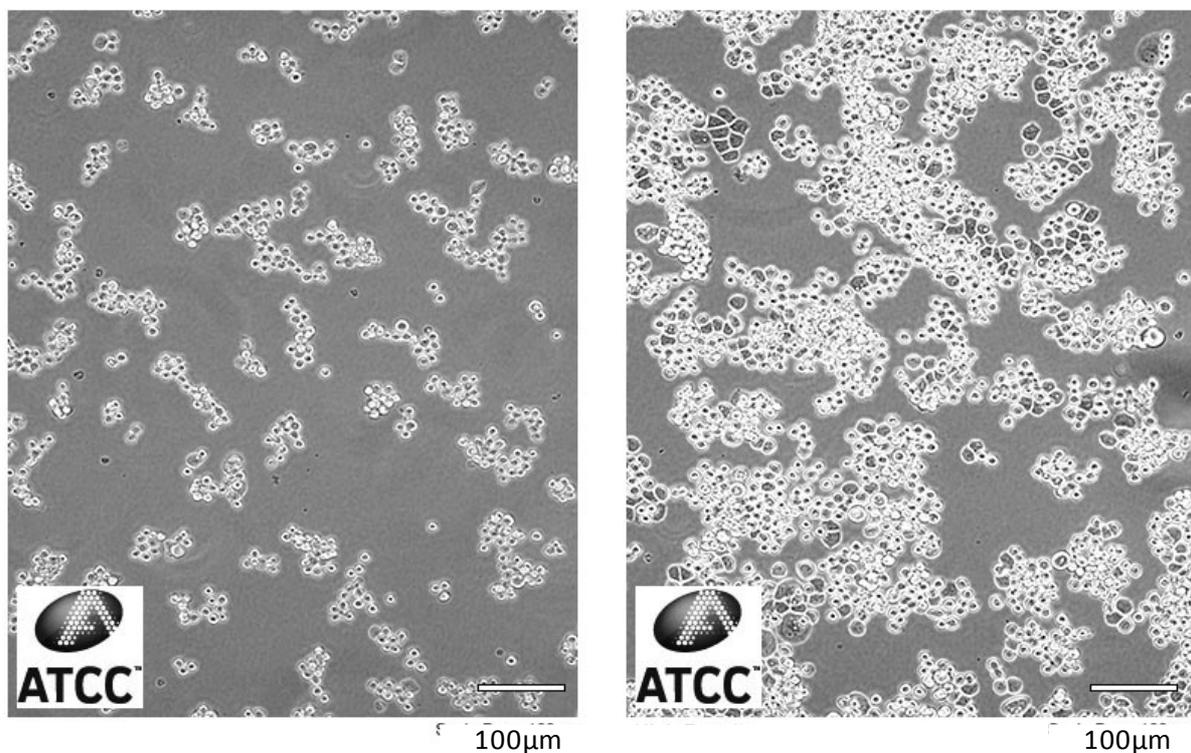
#### a. Description de la lignée MDA-MB-453

Cette lignée cellulaire a été isolée en 1976 par l'équipe de Cailleau et al. Elle est issue d'un épanchement péricardique d'origine tumoral métastatique chez une patiente de 48 ans présentant un cancer du sein. Cette patiente avait été traitée antérieurement au prélèvement péricardique par une radiothérapie mammaire locorégionale et une ovariectomie (173). Quelques semaines avant le prélèvement à partir duquel a été dérivé la lignée cellulaire, une chimiothérapie associant vincristine, adriamycine, cytoxan, 5-fluorouracil et méthotrexate avait été initiée chez cette patiente (174). Cette lignée est référencée dans plus de 400 articles dans la base Pubmed (recherche effectuée en janvier 2017) et est commercialisée par l'*American Type Culture Collection* (ATCC).

C'est une lignée adhérente cultivée classiquement en DMEM supplémenté par du sérum de veau foetal (SVF) 10%. Elle exprime le récepteur aux androgènes. Elle porte une mutation de *PIK3CA* (c.3140A>G, p.H1047R), de *PTEN* (c.919G>A, p.E307K) (discutée par certains auteurs (175)) et de *CDH1* (c.1913G>A, p.W638\*) (Cosmic, ; ATCC, <http://www.lgcstandards-atcc.org/>). Cette mutation perte de

fonction de *CDH1* entraîne une perte de la protéine E-cadhérine (figure 9), caractéristique du phénotype histologique lobulaire infiltrant. Cette lignée est donc comparable au carcinome lobulaire infiltrant selon la classification histologique de l'OMS (6).

D'autres équipes retrouvent une délétion homozygote du gène *TP53* (176). L'hétérogénéité de la littérature sur le statut de certains gènes est probablement en lien avec les dérives observées dans les lignées cellulaires en culture depuis un certain temps et/ou les techniques de séquençages utilisées.



**Figure 9. Morphologie de la lignée MDA-MB-453.**

Lignée commercialisée par American Type Culture Collection (ATCC, captures issues du site : <http://www.lgcstandards-atcc.org/>).

Doane et al. ont corrélé cette lignée cellulaire MDA-MB-453 au sous-groupe des tumeurs moléculaires apocrines par application de leur signature transcriptomique (36). Cette lignée cellulaire présente une prolifération décrite comme RA-dépendante

(et œstrogène indépendante), devant une réduction de la croissance cellulaire après exposition à un antagoniste des androgènes, le flutamide (36). Ceci a été confirmé par d'autres équipes (90,125,153). De multiples publications ont par la suite étudiés l'effet de thérapeutiques anti-androgènes, en monothérapie ou en combinaison sur cette lignée (voir chapitre 3).

Les résultats de ces études sont cependant à considérer à la lumière de certaines limites présentées par cette lignée cellulaire.

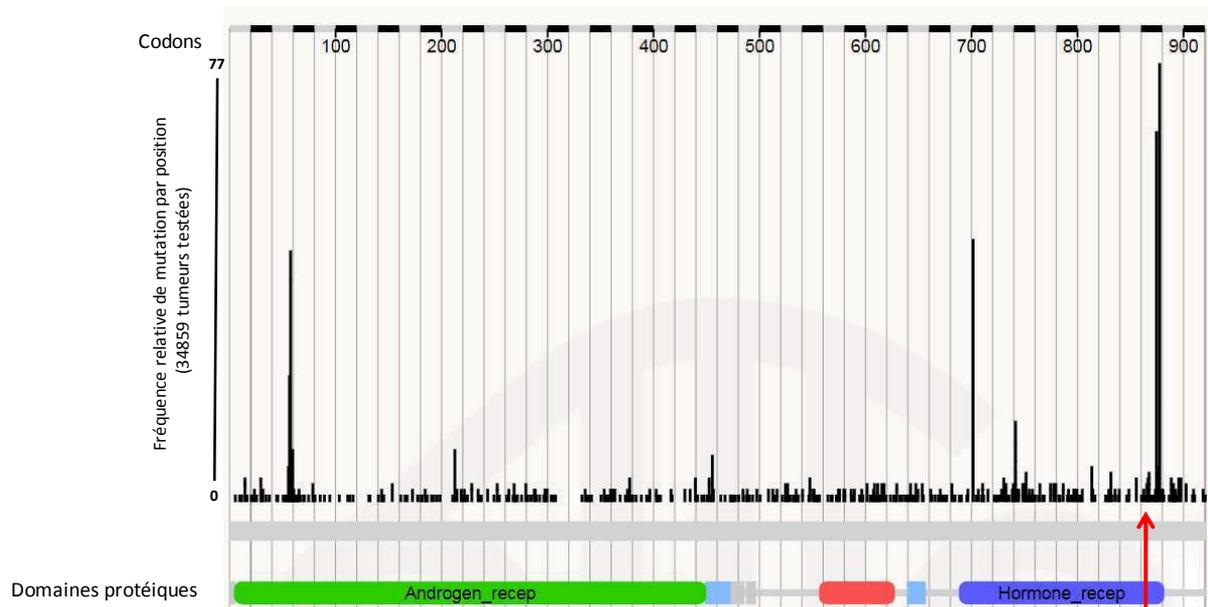
### ***b. Limites de la lignée MDA-MB-453***

La lignée cellulaire MDA-MB-453 présente des aberrations génétiques non retrouvées dans les descriptions génomiques publiées des tumeurs moléculaires apocrines (177). En outre, il est retrouvé une mutation du gène *KRAS* (Gly13Asp GGC>GAC), très rare dans les cancers du sein de manière générale (0,8%, 18/2176 patientes analysées, cohorte AACR GENIE, <http://www.cbioportal.org/genie>). De même une forte dérégulation du cycle cellulaire avec perte de P16, de RB et surexpression de Cycline D1, explique le haut potentiel de prolifération de cette lignée mais n'a pas été décrite dans les tumeurs moléculaires apocrines.

Le point le plus préoccupant est la mutation du gène *RA* (c.2604G>T, p.Q868H) (Cosmic, [http://cancer.sanger.ac.uk/cell\\_lines](http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines), (178)). Cette mutation est également retrouvée par d'autres auteurs ou elle est décrite en position 865 et non 868, toujours dans le domaine de liaison du ligand au RA (179). Cette mutation, dont l'impact est non clairement défini, affecte un codon du domaine de liaison du ligand (figure 10).

Ces mutations sont extrêmement rares dans les cancers du sein (<1%), plus fréquents dans les cancers de prostate (8%) notamment pré-traités par des anti-androgènes (178). L'équipe de Moore et al. a retrouvé une réponse différente de la lignée MDA-MB-453 selon le ligand du RA utilisé, DHT ou MPA (acétate de médroxyprogestérone). Les auteurs expliquent cette différence par une modification de la fonctionnalité du domaine de liaison du ligand induite par la mutation du RA (179). Ceci pourrait entraîner un effet variable de l'interaction entre les ligands et le

récepteur (RA). Dans cette hypothèse, un agoniste pourrait induire une activité antagoniste sur le récepteur et vice versa.



**Figure 10. Fréquence des mutations du gène *RA*.**

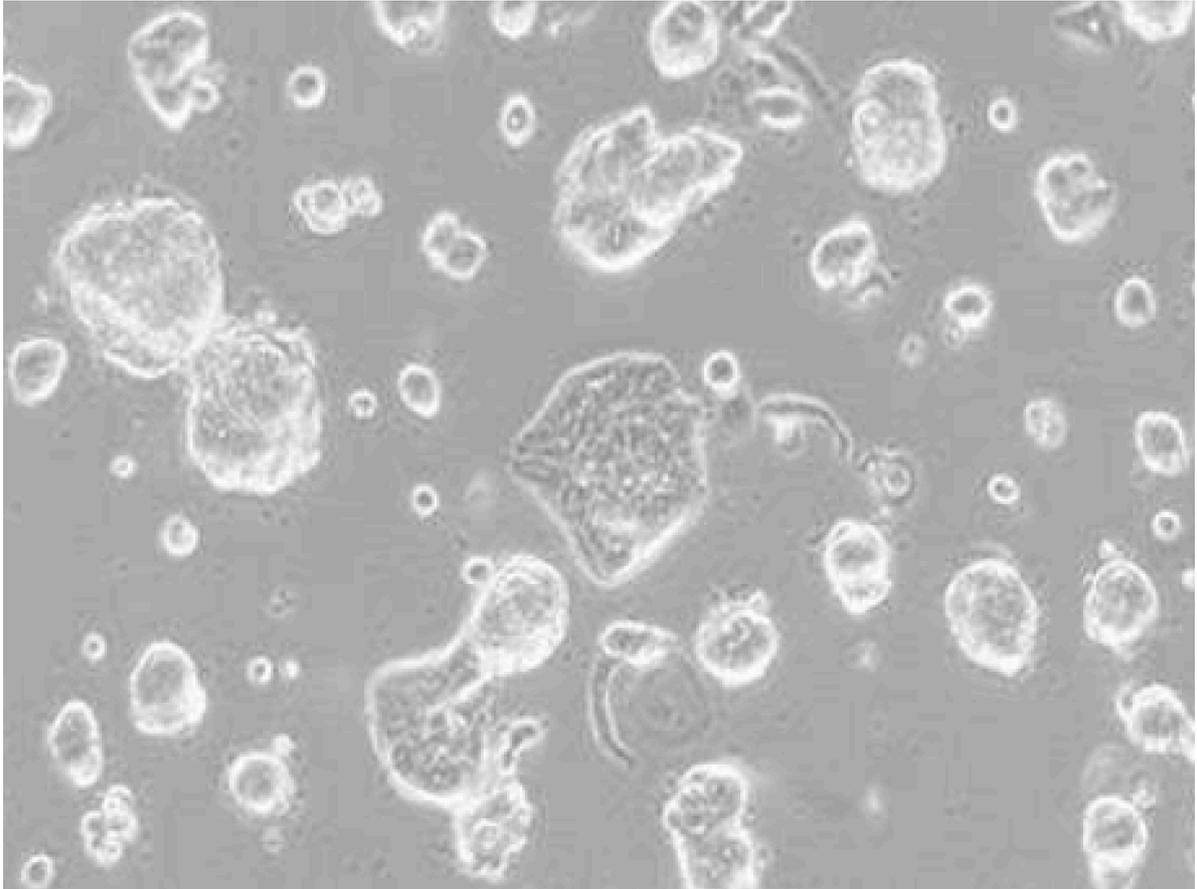
Fréquence mutationnelle en fonction du codon altéré dans l'ensemble des types tumoraux ; Adapté de Cosmic (178) (34859 tumeurs séquencées pour le *RA*, Cosmic database, Janvier 2018). Position de la mutation p.Q868H de la lignée MDA-MB-453 indiquée par une flèche rouge. Hormone\_recep : domaine de liaison du ligand.

D'autre part, il existe une incertitude concernant le statut HER2 de cette lignée. On peut retrouver une vingtaine d'articles décrivant ce statut, 5 utilisent la FISH, dont 4 retrouvent une amplification de *ERBB2* (177,180–183). Six articles classent la lignée comme négative pour HER2 en IHC (181–186). Enfin certains articles concluent sur des données de western blot (187–189). Ces données sont controversées du fait des techniques utilisées, de l'ancienneté des expériences et de la non-conformité aux pratiques actuelles recommandées en pratique clinique par l'ASCO (164). Notre détermination retrouve un statut HER2 2+ en IHC avec une FISH amplifiée (7,25 copie d'HER2, 2,60 copies du centromère du chromosome 17 ; ratio à 2,79) selon les recommandations françaises du GEFPICS 2014 (191). La lignée serait donc à considérer comme HER2-amplifiée.

## B. Autres lignées cellulaires moléculaires apocrines

Les limites de ce modèle ont mené à l'utilisation d'autres lignées cellulaires. Ainsi, différentes lignées ont été décrites comme pouvant correspondre au sous-groupe de tumeurs moléculaires apocrines. Celles-ci ont été identifiées par Lehmann et al. (25). Ainsi, les lignées SUM185PE, HCC2185, CAL-148 et MFM-223 présentent un profil transcriptomique proche de la lignée MDA-MB-453 et une similitude plus ou moins importante avec les tumeurs moléculaires apocrines. Ces lignées sont triple négatives (RE, RP et HER2 négatives), expriment le RA et pour certaines ont une croissance inhibée par un traitement anti-androgènes. Ces lignées ne font pas l'unanimité sur leurs caractères moléculaires apocrines et il n'y a en conséquence que peu de travaux rapportés utilisant ces lignées de manière spécifique à l'exploration biologique du sous-groupe moléculaire apocrine.

La seule exception est la lignée SUM185PE (figure 11) qui est la lignée la plus utilisée après la lignée MDA-MB-453. La SUM185PE possède des conditions de culture simples et pratiques facilitant son utilisation. Elle a été isolée à partir d'une atteinte pleurale métastatique d'un cancer du sein anaplasique, RE et RP négatifs mais HER2-amplifié d'après le fournisseur (<http://www.asterandbio.com/wp-content/uploads/2016/07/CS-09-r03-SUM185PE-Instructions-for-Use.pdf>). Le statut HER2 fait là aussi débat, puisqu'une publication de comparaison de profils de différentes lignées de cancer du sein catégorise la SUM185PE comme non-amplifiée pour *ERBB2* (192). Il n'y a pas de données de séquençage génomique de cette lignée disponible dans les bases de données publiques type *COSMIC Cell-Lines project* ([http://cancer.sanger.ac.uk/cell\\_lines](http://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines)). Cette lignée est caractérisée par une androgène dépendance (150) et répond à un traitement par anti-androgène, bicalutamide en expérimentation *in vitro* et *in vivo* (165).



**Figure 11. Morphologie de la lignée SUM185PE.**

Lignée commercialisée par Asteran Bioscience, (capture issue de : <http://www.asterandbio.com/wp-content/uploads/2016/07/CS-09-r03-SUM185PE-Instructions-for-Use.pdf>).

## **Chapitre 3**

### **Prise en charge thérapeutique des tumeurs moléculaires apocrines**

La prise en charge des cancers du sein moléculaires apocrines ne diffère pas au stade localisé de l'ensemble des autres sous-types de cancer du sein. Les avancées biologiques physiopathologiques dans ce sous-groupe ont amené à des essais en phase avancée de la maladie, soit des cancers du sein localement évolués ou métastatiques. Ces essais reposent sur des molécules anti-androgènes développées initialement dans les cancers de prostate.

## 1. Les traitements anti-androgènes dans les cancers de la prostate

### A. Généralités

Les connaissances sur le rôle du RA sont à l'origine de l'utilisation des méthodes de suppression des androgènes pour traiter le cancer de la prostate. Le traitement initial des maladies avancées comprend la suppression des androgènes par castration soit par voie chirurgicale (orchectomie) soit par voie chimique (analogues de la GnRH/LHRH) (194). Les agonistes de la GnRH désensibilisent le récepteur GnRH en interrompant sa stimulation intermittente physiologique (195). Les patients peuvent également être placés sous une thérapie de privation androgénique, ou traitement anti-androgène, qui est habituellement combinée pour réaliser un blocage androgénique complet en début de traitement par agoniste de la GnRH (196,197). La privation androgénique est généralement obtenue par traitement oral avec des anti-androgènes non stéroïdiens, tel que le flutamide, qui a été approuvé pour le traitement du cancer de la prostate en 1989, ou des composés plus récents tels que le bicalutamide.

Les traitements anti-androgènes sont un ensemble de traitements qui pour la plupart sont antagonistes du RA. Ils entrent en compétition avec les ligands du RA au niveau des sites de liaison du RA (198). Il y a deux types d'anti-androgènes, stéroïdiens ou non stéroïdiens. Les stéroïdiens n'ont pas d'intérêt clinique du fait de leurs effets secondaires importants liés au manque de spécificité de leurs liaisons sur des récepteurs stéroïdiens autre que le RA. Les anti-androgènes non-stéroïdiens tels que

le flutamide ou le bicalutamide ont des propriétés antagoniste sans activité agoniste pro-androgéniques (199) ce qui a permis leurs développements dans le traitement du cancer de la prostate.

L'un des premiers anti-androgènes développé a donc été le flutamide. Celui-ci a une affinité faible pour le RA. Les molécules développées ultérieurement comme le nilutamide et le bicalutamide ont une affinité plus importante (199). Comme évoqué, d'autres traitements anti-androgènes ont été développés, comme les agonistes de la LHRH, qui agissent en amont de la production des androgènes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Enfin, l'inhibition de la synthèse/conversion intra-tumorale ou périphérique des androgènes a mené au développement de plusieurs classes thérapeutiques. Ainsi, certains inhibiteurs d'enzymes spécifiques peuvent être utilisés comme anti-androgènes, ciblant par exemple le CYP17A, la 17-kéto-réductase et la 5 $\alpha$ -réductase. La voie de synthèse des androgènes et les thérapeutiques spécifiques sont résumées dans la figure 12.

Les patients bénéficiant de déprivation androgénique vont inévitablement développer une maladie résistante à la castration (CRPC) (200,201). Ce stade de cancer de la prostate est alors mortel, et les patients ne répondent plus à la thérapie première de privation androgénique. Les patients atteints de CRPC sont alors habituellement traités par chimiothérapie, de type taxanes (docetaxel), qui a démontré un bénéfice en survie (202,203). C'est dans ce contexte de maladie évolutive devenant résistante à la castration hormonale, tout en restant RA-dépendante, que de nouvelles molécules anti-androgènes ont été développées.



## B. Traitements anti-androgènes de nouvelle génération

Devant l'incidence et le pronostic sombre des cancers de la prostate avancés et les mécanismes de résistances identifiés, de nouvelles molécules anti-androgènes ont été développées ou sont en cours de développement.

Nous allons évoquer 3 anti-androgènes de nouvelle génération, l'abiratérone et l'enzalutamide qui ont une AMM dans le cancer de prostate en phase de résistance à la castration et l'ODM-201 qui lui est en cours de développement clinique dans la même indication. Nous ne détaillerons pas d'autres anti-androgènes tels que la galeterone (TOK-001) qui est en cours de développement clinique sur le même principe d'action (205) ou encore l'apalutamide (ARN-509) qui vient récemment d'obtenir une AMM dans les cancers de prostate résistants à la castration en rechute biologique non-métastatique (206).

### a. Acétate d'abiratérone

L'abiratérone (acétate) est un inhibiteur sélectif et irréversible du cytochrome P450 17 $\alpha$  (17 $\alpha$ -hydroxylase / C17-20 lyase, CYP17), enzyme clé dans la voie de production des androgènes. L'enzyme cible de ce traitement catalyse la conversion de précurseurs des minéralocorticoïdes (prégnénolone ou progestérone) en DHEA ou en androstènedione, deux précurseurs de la testostérone. Elle a une activité double, hydroxylase, qui est responsable de la conversion de la prégnénolone et de la progestérone en précurseurs des glucocorticoïdes (prégnénolone et 17OH-progestérone), et lyase qui elle est responsable de la conversion supplémentaire de précurseurs de glucocorticoïdes en DHEA et en androstènedione (207). L'abiratérone inhibe spécifiquement le CYP17, entraînant ainsi une réduction des taux de testostérone circulant (sérum) chez des patients atteints de carcinome de prostate (208,209).

L'inhibition du CYP17 entraîne également une diminution des glucocorticoïdes et une augmentation paradoxale des minéralocorticoïdes par inhibition de l'activité

hydroxylase de l'enzyme cible, expliquant par-là les principales toxicités décrites avec l'abiratérone. Dans les cellules dépendantes des androgènes, comme les cancers de prostate, l'abiratérone a une action attendue de réduction de la production des androgènes via la diminution de la stéroïdogénèse intracellulaire tumorale (210,211) mais aussi via la diminution de la transformation des précurseurs stéroïdes circulants vers des hormones définitives (212).

Deux grands essais cliniques, COU-AA-301 et COU-AA-302, ont abouti à l'autorisation de mise sur le marché de l'abiraterone (Zytiga) en pré et post chimiothérapie par docetaxel dans le cancer de prostate résistant à la castration métastatique. Des gains en survie globale ont été obtenus, de 34,7 mois dans le bras abiratérone versus 30,3 mois dans le groupe placebo (HR = 0,81, IC 95%, 0,70-0,93; P = 0,0033) et de 14,8 mois versus 10,9 mois, HR = 0,65, IC 95%, 0,54-0,77; P <0,001) en pré et post docetaxel respectivement. Le traitement était correctement toléré dans les deux études. Les effets indésirables fréquents incluaient la fatigue, l'anémie, les nausées, les arthralgies, et la constipation (213,214). Récemment son intérêt a été démontré en phase métastatique précoce dite hormono-sensible élargissant son potentiel d'utilisation avec une nouvelle autorisation de mise sur le marché (215).

### ***b. Enzalutamide***

L'enzalutamide (MDV3100) est un antagoniste du RA de nouvelle génération. Il possède une activité antagoniste plus forte que le bicalutamide par une liaison cinq fois plus affine au domaine de liaison du RA. Sa conformation empêche la translocation du récepteur dans le noyau et éviterait toute activité paradoxale agoniste sur le RA, la liaison du RA à l'ADN et le recrutement de co-facteurs (216).

Cette molécule a obtenu une AMM dans le cancer de prostate avancé avant ou après traitement par chimiothérapie de type docetaxel (217,218). Un bénéfice en termes de survie globale a été retrouvé avec une tolérance correcte (217,218).

D'autres antagonistes sont eux encore en cours de développement clinique ou accessibles en clinique depuis peu comme l'apalutamide (ARN509) (219) au mode

d'action superposable à l'enzalutamide. L'ODM-201 a également été développé dans cette classe thérapeutique et dans cette même pathologie.

### c. ODM-201

#### Caractéristiques et mécanismes d'action

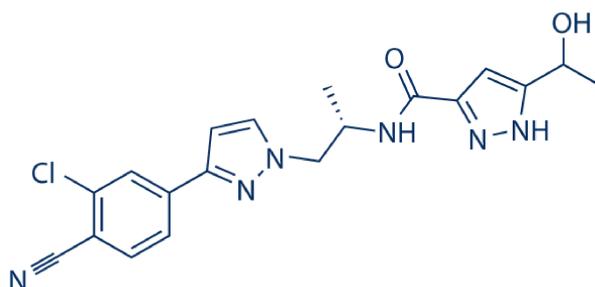
L'ODM-201 est un anti-androgène non stéroïdien de type antagoniste du RA, de haute affinité. Il inhibe l'activation du RA induit par les androgènes en facilitant la formation de complexes inactifs qui ne peuvent pas se transloquer vers le noyau empêchant ainsi la liaison et la transcription aux gènes sous la dépendance du RA. Cette molécule aussi connue sous le nom BAY-1841788 ou darolutamide est développée conjointement par la société ORION et le laboratoire BAYER HealthCare (220).

L'ODM-201 est un composé synthétique composé de 2 diastéréoisomères actifs, l'ORM-16497 et l'ORM-16555 avec une forme active métabolique, l'ORM-15341, pharmacologiquement active (220). Ses caractéristiques biochimiques sont présentées dans le tableau 4 et la figure 13.

|                   |   |
|-------------------|---|
| Masse moléculaire | 398.85 g/mol  |
| Formule chimique  | C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> CIN <sub>6</sub> O <sub>2</sub> |
| Solubilité        | DMSO : 80 mg/mL<br>Ethanol : 38 mg/mL<br>Eau : <1 mg/mL         |

**Tableau 4. Caractéristiques de l'ODM-201.**

DMSO : Diméthylsulfoxyde



**Figure 13. Structure de l'ODM-201.**

Adapté de Moilanen AM, et al. *Scientific Reports* (220).

### Développement préclinique

Les données *in vitro* montrent que l'ODM-201 de par son métabolite actif, l'ORM-15341, agit comme un ligand sur le RA et induit une action antagoniste, que le domaine de liaison du ligand (LBD) soit sauvage (wild-type) ou muté (dans la limite des mutations testées) .

Il induit ainsi un blocage de la translocation du RA vers le noyau (220). Une action anti-proliférante a été démontrée avec *in vitro*, une dose inhibant la viabilité cellulaire de 50% des cellules, ou concentration inhibitrice médiane (IC50) de 230nM retrouvée dans la lignée de cancer de prostate VCAP, proche de celles retrouvées avec l'enzalutamide et l'apalutamide (410 et 420nM respectivement). *In vivo*, l'ODM-201 confirme cette activité sur des xénogreffes de cette même lignée cellulaire (VCAP) (220).

### Spécificité de l'ODM-201 par rapport aux autres anti-androgènes

Trois particularités permettent d'isoler l'ODM-201 comme une molécule d'intérêt à fort potentiel thérapeutique dans le cancer de la prostate et donc en parallèle dans les cancers du sein moléculaires apocrines.

Le point d'intérêt majeur réside dans sa capacité à poursuivre son activité antagoniste en présence de mutations fréquentes de résistance du gène du RA dont la mutation F876L (220). Cette dernière induit une résistance par activité agoniste paradoxale sur le RA muté de nombreux anti-androgènes dont l'enzalutamide et l'ARN-509 (tableau 5) (221).

| Anti-androgène | IC50 (nM)  |               |               |               |
|----------------|------------|---------------|---------------|---------------|
|                | RA sauvage | RA muté F876L | RA muté T877A | RA muté F876L |
| ODM-201        | 65         | 66            | 1500          | 1782          |
| Enzalutamide   | 155        | Agoniste      | >10000        | 296           |
| ARN-509        | 168        | Agoniste      | >10000        | 1130          |

**Tableau 5. Valeurs d'IC50 par tests de transactivation du RA.**

Rapporteur luciférase de réponse du RA ; adapté d'après Moilanen AM, et al.

*Scientific Reports* (220). IC50 reportés correspondent à la dose inhibant l'activité du RA dans 50% des cellules, en nanomolaire.

Un autre avantage de l'ODM-201 semble être son faible passage de la barrière hémato-encéphalique (220,222) réduisant le risque de crises convulsives constatées avec l'enzalutamide (événement certes décrit, mais avec une fréquence rare).

Enfin, l'ODM-201 ne semble pas augmenter les taux circulants de testostérone de manière concordante avec l'absence de pénétration encéphalique (stimulation centrale de l'axe hypophysio-gonadique par l'enzalutamide) (223).

## Développement clinique

L'ODM-201 est en cours de développement clinique dans le cancer de la prostate. Deux études de phase I ont montré une tolérance correcte dans des maladies non

antérieurement traitées par chimiothérapie (224) ou antérieurement poly-traitées (225). Des preuves d'efficacité ont également été apportées par ces études. Ces éléments ont été confirmés par une étude de phase I/II, l'étude ARADES, dans laquelle des patients atteints de cancer de prostate avancé résistant à la castration recevaient de l'ODM-201 à la dose de 200mg quotidien. Les effets secondaires les plus fréquemment rapportés étaient la fatigue (42%), les diarrhées (29%) et les arthralgies (25%) (222).

Ces résultats ont permis l'ouverture d'essais cliniques de phase III. L'essai ARASENS (NCT02799602, *ODM-201 in Addition to Standard ADT and Docetaxel in Metastatic Castration Sensitive Prostate Cancer*) compare l'adjonction ou non de l'ODM-201 à une chimiothérapie par docetaxel chez des patients métastatiques non-résistants à la castration poursuivant un traitement par agoniste de la LHRH. Le deuxième essai, ARAMIS (NCT02200614, *Efficacy and Safety Study of BAY1841788 (ODM-201) in Men With High-risk Non-metastatic Castration-resistant Prostate Cancer*) randomise lui l'ODM-201 versus placebo chez des patients non métastatiques résistants à la castration. Ces études sont en cours et les résultats ne sont pas encore disponibles.

### C. Résistance aux anti-androgènes

Les anti-androgènes présentent une efficacité limitée dans le temps. Dans le cancer de la prostate avancé, cette perte d'efficacité peut s'expliquer par exemple par une action agoniste paradoxale des anti-androgènes sur le RA du fait d'apparition ou par une majoration de représentation de clones cellulaires porteurs de mutation du RA, ou bien par amplification du RA (226). Ceci a mené au développement des anti-androgènes de nouvelle génération. Dans le cancer de la prostate évolué ce stade est appelé en pratique clinique, stade de résistance à la castration (CRPC) (227). Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer cette évolution.

Premièrement, la surexpression du RA liée à une amplification du gène du RA (228). Deuxièmement, l'apparition de mutation dans le domaine de liaison du ligand (LBD) du gène du RA (T877A, L701H, W741L, ou F876L). Celles-ci induisent une

diminution de l'affinité et de la spécificité des ligands pour le RA. Ces mutations peuvent induire une liaison d'autres hormones telles que les glucocorticoïdes sur le RA et induire une activité paradoxale de type agoniste des anti-androgènes sur le RA (229).

Les résultats d'analyses d'ADN circulant sur prélèvement sanguin montrent que les mutations du RA et/ou les altérations du nombre de copies du gène *RA* sont respectivement détectées dans 48% et 60% des échantillons avant et après traitement (230).

Troisièmement, la résistance à la déprivation androgénique est fréquemment associée à l'émergence de variants d'épissages du RA dont le variant AR-V7. Cet isoforme du RA a perdu son *Ligand Binding Domain* et est constitutionnellement actif entraînant une résistance notamment à l'abiratérone et à l'enzalutamide (231).

D'autre part, un autre mécanisme de résistance est lié aux récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). Ceux-ci peuvent se substituer aux RA et activer un ensemble de gènes proches de ceux activés par le RA (232).

Enfin, la résistance aux anti-androgènes a été décrite comme pouvant être en lien avec une activation ligand-indépendante du RA (233).

Ces différents mécanismes de résistance aux anti-androgènes expliquent les progressions observées dans les cancers de prostate malgré les traitements par multiples thérapeutiques anti-androgènes disponibles.

## 2. Données précliniques sur modèles moléculaires apocrines

Les travaux validant la découverte par Farmer et al. du sous-groupe des tumeurs moléculaires apocrines ont apporté des informations préliminaires sur l'intérêt de traiter ces tumeurs par des anti-androgènes à l'aide d'expérience sur modèle cellulaire, principalement sur la lignée MDA-MB-453. Ainsi, Doane et al. (36) montrent que cette lignée est sensible au flutamide (anti-androgène) ; sensibilité prouvée par une réduction de prolifération non retrouvée avec des anti-estrogènes (36). Le même résultat est obtenu avec le bicalutamide par Lehmann et al. qui montrent que parmi l'ensemble des lignées de phénotypes triple négatifs, celles qui sont sensibles au bicalutamide sont majoritairement celles qui expriment le RA (27). Les données précliniques sur l'enzalutamide montrent qu'il induit comme dans les tumeurs prostatiques, une diminution de la localisation nucléaire du RA et une inhibition de la croissance androgène dépendante. Cet effet pourrait passer, selon les auteurs de ce travail, par une induction d'apoptose comme montré par l'augmentation du taux de caspases 3 clivées (153). Il y a donc un effet qui semble attendu et spécifique des anti-androgènes dans ces modèles (principalement la lignée MDA-MB-453).

Les preuves d'efficacité des anti-androgènes en monothérapie ont permis la réalisation de tests précliniques de combinaison à base d'anti-androgènes. Les données générées par l'équipe de Naderi et al. retrouvant une boucle de rétrocontrôle positive entre le RA et ERK (voie de signalisation MAPK) dans le sous-type moléculaire apocrine a permis la réalisation de tests fonctionnels de cette hypothèse. Les auteurs ont ainsi combiné un anti-androgène, le flutamide, à un inhibiteur de ERK (CI-1040) et ont retrouvé une action synergique de cette association sur la lignée cellulaire MDA-MB-453 *in vitro* et *in vivo* (234).

Comme retrouvé par l'équipe de Lehmann et al., les tumeurs MA sont mutées dans environ 40% des cas pour *PIK3CA* (150). La même équipe a testé fonctionnellement cette cible thérapeutique potentielle. Un ensemble de traitements ciblant la voie PI3K a été testé. La lignée MDA-MB-453 est retrouvée sensible à ce type de drogues quand on compare aux autres lignées de tumeurs triple négatives testées (IC50 de

l'ordre du nM). De plus, les auteurs retrouvent un effet synergique quand les inhibiteurs de PI3K sont combinés avec un anti-androgène, le bicalutamide. Ces résultats sont toutefois modestes quand le test est réalisé *in vivo* par mesure de volume tumoral avec un effet de type additif, moins important qu'en *in vitro*. Une autre étude retrouve également un effet additif modeste de l'association enzalutamide et rapamycine (inhibiteur de mTOR) aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* sur la lignée MDA-MB-453 (235).

Les cellules MDA-MB-453 semblent sensibles aux inhibiteurs du cycle cellulaire de type inhibiteurs spécifiques de CDK4/6, comme le palbociclib. La sensibilité de la lignée MDA-MB-453 est supérieure à la majorité des lignées de cancers du sein, tout phénotype confondu (236). Ceci a mené à démontrer l'intérêt probable de combiner l'enzalutamide au palbociclib dans le modèle cellulaire MDA-MB-453. Il est retrouvé une majoration de la réduction de la viabilité cellulaire et de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par l'adjonction de palbociclib à l'enzalutamide (237).

Au contraire des antagonistes du RA tel que l'enzalutamide, il n'y a pas de données dans la littérature concernant l'utilisation de l'abiratérone dans un modèle préclinique de tumeurs moléculaires apocrines.

Ces données précliniques constituent le rationnel scientifique d'essais cliniques publiés en cours dans le sous-groupe moléculaire apocrine.

### 3. Données cliniques relatives aux tumeurs moléculaires apocrines

Différentes données cliniques sont disponibles dans le domaine des traitements spécifiques aux tumeurs moléculaires apocrines (tableau 6). Ces études rapportent les résultats de traitements anti-androgènes dont l'utilisation est validée et routinière dans le cancer de la prostate : le bicalutamide, l'enzalutamide et l'acétate d'abiratéronne.

|                            | Nombre de patientes éligible et évaluable | Age médian | Nb médian de lignes antérieures de chimiothérapie | Taux de bénéfice clinique à 6 mois (IC95%) | Réponses objectives |
|----------------------------|---|------------|---|--|---------------------|
| <b>Bicalutamide</b>        | 26  | 66         | 1 (0–8)   | 19 % (7–39)<br>N=5                         | Aucune              |
| <b>Abiraterone acetate</b> |   |            |   |  |                     |
| <b>Essai AMA</b>           | 30  | 62,5       | 2,5 (0–9)   | 20 % (7,7–38,6)<br>N=6                     | 1 RC, 1 RP          |
| <b>Essai SHIVA</b>         | 4   | 45,5       | -   | 0<br>N=4                                   | Aucune              |
| <b>Enzalutamide</b>        | 78  | 59         | 1 (0–5)   | 28 % (19–39)<br>N=22                       | 1 RC, 5 RP          |

**Tableau 6. Principaux résultats des essais cliniques évaluant un anti-androgène dans les tumeurs moléculaires apocrines HER2 non-amplifiées.**

D'après les publications (122–124) et les données issues de l'essai SHIVA, Pr Le Tourneau (238). RC : réponse complète ; RP : réponse partielle (selon RECIST V1.1).

## A. Bicalutamide

Concernant le bicalutamide, une étude de phase II a montré un taux de bénéfice clinique (réponse complète ou partielle ou stabilité selon les critères RECIST) de plus de 6 mois chez un petit nombre de patientes (5/26) présentant une tumeur RE- RA+ (défini par RA  $\geq$ 10%) (indépendamment du statut HER2 mais seulement 1/26 patiente HER2-amplifiée incluse et traitée) métastatique (122). Ce traitement était relativement bien toléré dans cette étude sans effets indésirables graves notables. Cette étude a apporté la preuve de concept clinique de l'efficacité d'un traitement anti-androgène dans les tumeurs moléculaires apocrines.

Les inhibiteurs du cycle cellulaire ont obtenu une AMM récente dans les cancers luminaux avancés, avec notamment le palbociclib, inhibiteur de CDK4/6 (239,240). Un essai combinant bicalutamide et palbociclib a été mené. Les données non définitives pour l'instant communiquées montrent que sept patientes ont été incluses avec les mêmes critères que l'essai avec le bicalutamide en monothérapie. Les données d'efficacité ne sont pas encore matures mais la tolérance semble bonne permettant d'envisager des combinaisons de traitement à base d'anti-androgènes (241).

## B. Enzalutamide

Un essai de phase 2 multicentrique a été réalisé incluant 118 patientes avec tumeurs triples négatives, RA>0% (population en intention de traiter) dont 78 présentaient un RA  $\geq$ 10% et au moins une évaluation scannographique (population évaluable). Cette population évaluable (RA  $\geq$ 10%) représente la population d'intérêt de l'étude. Les patientes recevaient 160mg d'enzalutamide par jour. Le critère de jugement principal était le taux de bénéfice clinique (réponse complète ou partielle ou stabilité selon les critères RECIST) à 16 semaines. Les données concernant les tumeurs RA  $\geq$ 10% montrent un taux de bénéfice clinique à 16 semaines de 33% (IC 95%: 23-45) avec 6/78 patientes en réponse complète ou partielle (8%) (124). A 24 semaines, ce taux

de bénéfice clinique est de 28% (IC 95%: 19-39). La survie sans progression (SSP) était de 3,3 mois (IC 95%: 1,9-4,1).

La prise en compte de patients inclus avec un RA positif à un seuil  $\geq 1\%$  (versus  $\geq 10\%$ ) rajoute 40 patientes dans l'analyse (N=118). Parmi elles, une seule réponse a été observée (réponse complète). La prise en compte de ces patientes induit une baisse du taux de bénéfice clinique à 16 semaines, à 25 % (IC 95%: 17 -33) versus 33% (pour RA  $\geq 10\%$ ) et de la survie sans progression, à 2,9 mois (IC 95% : 1,9-3,7) versus 3,3 mois (pour RA  $\geq 10\%$ ) (124).

Les auteurs définissent une signature transcriptomique identifiant les patientes présentant un bénéfice clinique dans l'étude (242). Cette signature semble corrélée à la SSP mais n'a été présentée uniquement qu'en poster en congrès sans publication à ce jour. Par ailleurs, l'identité précise des transcripts composant cette signature n'a pas été révélée. La SSP est rapportée à 16,1 semaines (IC 95%: 13,3-27,4) pour les patientes présentant cette signature contre 8,1 semaines (IC 95%: 7,4-12,6) dans le cas contraire. Ceci se traduit également par un gain significatif de survie globale pour les patientes avec cette signature (75,6 semaines (IC 95%: 51,6-91,4) contre 32,3 semaines (IC 95%: 20,7-48,3)). La publication de ces résultats est attendue pour confirmer ces données (242).

Une étude ancillaire a récemment été publiée et retrouve une valeur prédictive positive de bénéfice clinique de 30% pour un RA  $\geq 10\%$  (243). Les patientes incluses avec un RA positif ( $\geq 10\%$ ) présentent un bénéfice significatif en survie global sous enzalutamide (HR=0,54 ; IC95% : 0,32-0,91; p= 0,019) par rapport aux patientes incluses avec un RA négatif ( $< 10\%$ ) (243).

Une étude de phase III en phase métastatique a été proposée devant ces résultats encourageants ainsi que des essais de phase 2 en adjuvant et néoadjuvant (en combinaison au paclitaxel) (244,245)(NCT02689427 ; NCT02750358). Par ailleurs, à la suite des données précliniques sur l'intérêt des inhibiteurs de PI3K, un essai évaluant l'enzalutamide combiné à un inhibiteur de PIK3CA (Taselisib) est en cours (246) (NCT02457910).

### C. Acétate d'abiratérone

Une étude spécifique avec un traitement par acétate d'abiratérone a été réalisée et publiée par notre équipe (123). L'essai clinique UCBG 2012-1/AMA sponsorisé par UNICANCER et coordonné par le Pr Hervé Bonnefoi est un essai de phase II multicentrique ayant pour objectif d'évaluer la tolérance et l'efficacité de l'acétate d'abiratérone dans les cancers du sein avancés ou métastatiques triple négatifs récepteurs androgènes positifs. Les RA devaient être positifs sur plus de 10% des cellules examinées pour pouvoir inclure les patientes (RA  $\geq$ 10%). Le critère de jugement principal était là aussi le taux de bénéfice clinique mais considéré cette fois à 24 semaines. Vingt pourcent (N=6) des patientes incluses (N=30) ont présenté un bénéfice clinique défini protocolairement par une stabilité, une réponse partielle ou complète d'au moins 6 mois. Une réponse complète a été observée avec un recul de 23.4 mois lors de l'analyse, la patiente étant toujours sous traitement plus de quatre ans après l'initiation du traitement. Une réponse partielle et quatre stabilités ont également été enregistrées.

D'autres patientes, incluses dans l'essai SHIVA, ont également reçu de l'abiratérone dans cette indication. Cet essai est un essai de phase II multicentrique randomisé de preuve de concept comparant l'efficacité d'un traitement fondé sur le profil moléculaire tumoral à celle d'un traitement conventionnel chez des patients atteints d'un cancer métastatique réfractaire. Cent quatre-vingt-quinze patients ont été inclus dont 40 cancers du sein. Parmi eux, 4 patientes avec une tumeur triple négative ont été identifiées avec une expression du récepteur aux androgènes  $\geq$ 10% en IHC et ont reçu de l'acétate d'abiratérone. Aucune de ces patientes n'a présenté de bénéfice clinique supérieur à 6 mois (définition identique au protocole UCBG12-1) (238,247).

Par ailleurs, un poster présenté au congrès de l'ASCO en 2013 a rapporté les données de 6 patientes RE-, RA+ incluses dans un essai avec un statut HER2 positif ou négatif, traitées par Abiratérone. Il semble d'après les données rapportées dans ce poster, n'y avoir qu'une réponse prolongée à type de stabilisation pendant 7,2 mois après 4 lignes de chimiothérapie. Cette patiente en réponse présente une tumeur HER2-amplifiée prétraitée par anti-HER2 (248).

De nombreux essais sont en cours dans ces tumeurs moléculaires apocrines (tableau 7). La plupart se concentre sur les tumeurs HER2 négatives.

Trois types de traitements anti-androgènes sont proposés, les antagonistes du RA, les inhibiteurs du CYP17A1 et les modulateurs sélectifs du RA. Dernièrement, des essais ont ouvert aux inclusions concernant des phases précoces de maladie (tumeurs uniquement localisées au sein) démontrant l'intérêt croissant de ces thérapies spécifiques dans ce sous-groupe.

|  | Stade précoce  |                            | Stade métastatique  |  |
|--|--|----------------------------|---|--|
|  | Néo-Adjuvant   | Adjuvant                   | Monothérapie  | Combinaison  |
| Tumeurs MA HER2- (triples négatives RA+) | Antagoniste du RA<br><br>Enzalutamide (NCT02676986)<br>Enzalutamide + paclitaxel (NCT02689427) | Enzalutamide (NCT02750358) | Enzalutamide (Phase III; <b>Essai fermé</b> , NCT02929576)        | Bicalutamide + inhib. CDK4/6: Ribociclib (Phase I/II, NCT03090165)<br>ou<br>+ inhib. CDK4/6: Palbociclib (Phase I/II, NCT02605486) |
|  |  |                            | Bicalutamide Vs Chimiothérapie (NCT03055312)                      | + inhib. PI3Kα: Alpelisib (Phase I, NCT03207529)<br>ou<br>+ inhib. PI3Kα: Taselisib (Phase I/II, NCT02457910)                      |
|  |  |                            | ODM-201 Vs Capécitabine (Phase II; NCT03383679)                   |  |
| Inhibiteur du CYP17A1                    | -  | -                          | Orteronel (TAK-700, NCT01990209)                                  | -  |
| Modulateur sélectif du RA                | -  | -                          | Seviteronel (NCT02580448)   | -  |
|  |  |                            | Enobosarm (Ostarine/GTX-024, NCT02368691)<br>CR1447 (NCT02067741) | Enobosarm + Pembolizumab (Phase II, NCT02971761)   |
| Tumeurs MA HER2+                         | Antagoniste du RA  | -                          | -   | Enzalutamide + Trastuzumab (Phase II, NCT02091960)   |

**Tableau 7. Essais cliniques en cours dans les cancers du sein moléculaires apocrines selon le statut HER2.**

Les formes précoces correspondent à des tumeurs opérables non métastatiques.  
MA : moléculaire apocrine ; Source : *clinicaltrials.org*

## **Chapitre 4**

### **Chk1 et mécanismes de réparations des dommages à l'ADN**

Des données récentes mettent en évidence le rôle critique du récepteur aux androgènes en tant que régulateur des gènes de réparation des dommages à l'ADN (DDR) dans les cancers de prostate avancés (249). Cela a fourni un rationnel à la combinaison entre des agents ciblant les mécanismes du DDR et les thérapeutiques anti-androgènes.

## 1. Mécanismes de réparations des dommages à l'ADN

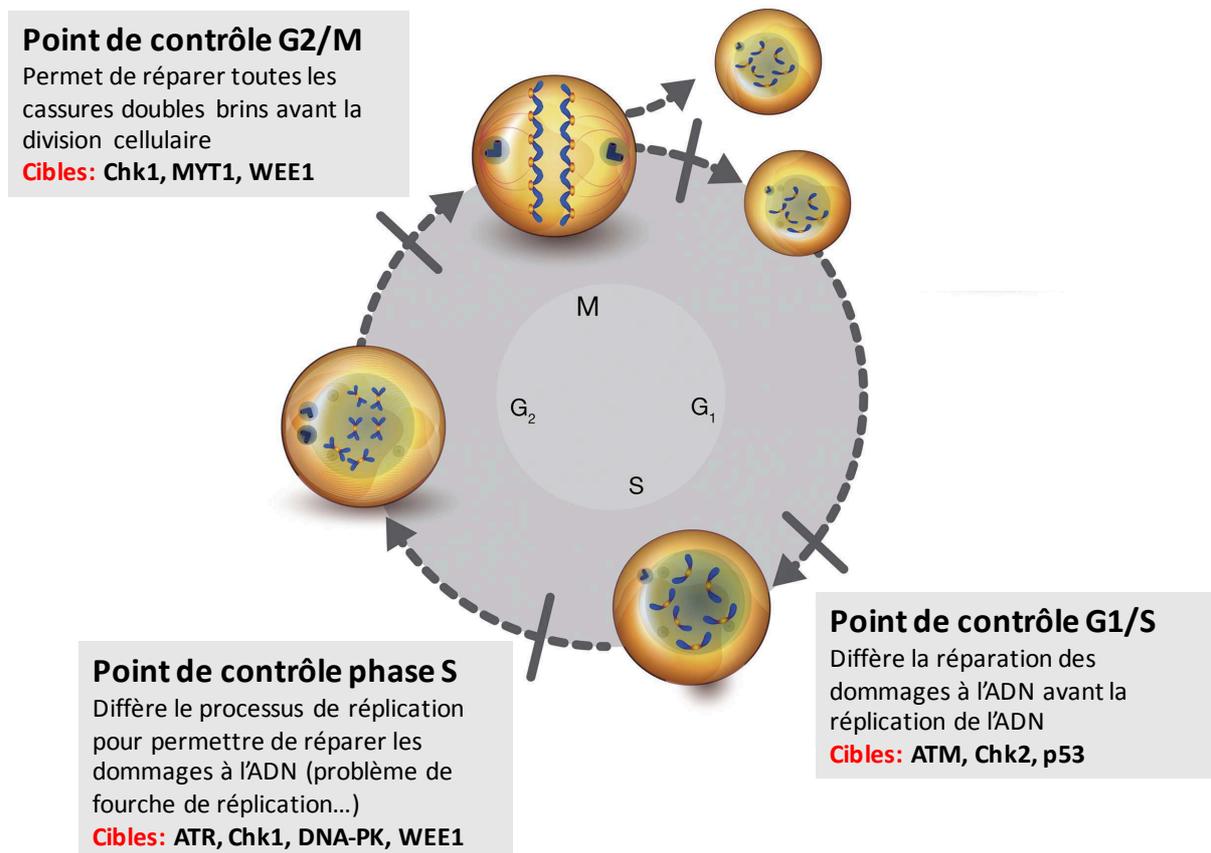
### A. Généralités

La réparation des dommages à l'ADN (cassures simples brin, doubles brins...) et le cycle cellulaire sont deux mécanismes physiopathologiques majeurs des cellules tumorales. Ces deux mécanismes sont intimement liés. La régulation de ces deux entités fait notamment intervenir quatre protéines kinases centrales formant deux voies distinctes principales, ATR-Chk1 et ATM-Chk2, qui sont induites pour la première par un ensemble d'anomalies de l'ADN alors que la deuxième est induite spécifiquement en réponse aux cassures double-brin (250). Ces protéines induisent un arrêt transitoire du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN au niveau des phases S et G2/M et agissent comme point de contrôle du cycle cellulaire. Chk1 représente un maillon distal et effecteur, faisant de lui un point de contrôle central.

Une autre grande voie de réparation des dommages à l'ADN est dépendante de p53 avec une cinétique d'action plus lente permettant le blocage du cycle cellulaire en phase G1 (251,252).

Sur un plan mécanistique, les dommages endogènes ou exogènes de l'ADN des cellules tumorales, notamment induits par des agents cytotoxiques, activent les points de contrôle du cycle cellulaire ralentissant ainsi la progression du cycle cellulaire afin de faciliter la réparation de l'ADN. Ceci permet d'éviter une catastrophe mitotique (253–255). Les points de contrôle du cycle cellulaire, leurs rôles et les protéines effectrices cibles sont représentés dans la figure 14. De nombreux efforts ont été entrepris ces dernières années pour augmenter l'efficacité des agents cytotoxiques par l'intermédiaire de l'inhibition de ces voies de contrôle du cycle

cellulaire. Les thérapies inhibant ces points de contrôle (Chk1 et/ou Chk2) présentent un développement important dans une optique d'action de létalité synthétique (*synthetic lethality*) ou bien de synergie anti-tumorale.



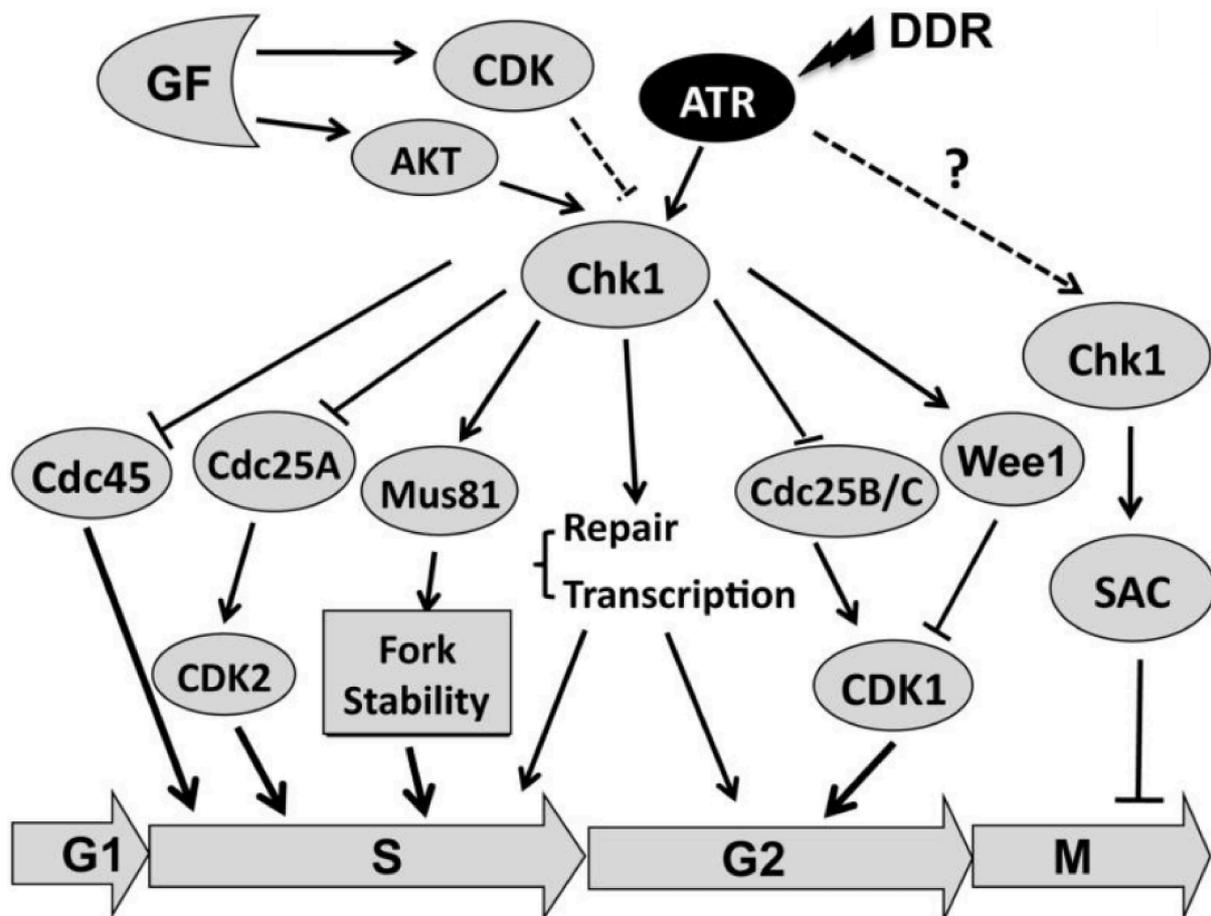
**Figure 14. Cibles et rôles des points de contrôle du cycle cellulaire en réaction à des dommages à l'ADN.**

Adapté de O'Connor MJ et al, *Molecular Cell* (256). ATM: ataxia-telangiectasia mutated; ATR: ataxia-telangiectasia and Rad3-related; DNA-PK: DNA-dependent protein kinase.

## B. Rôle de Chk1

*Checkpoint kinase 1* (Chk1) est une sérine/thréonine kinase codée par le gène *CHEK1*. La fonction principale de Chk1 est de coordonner la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) et d'agir comme point de contrôle du cycle cellulaire des phases S et G2/M. En effet, la voie ATR-CHEK1 reconnaît un large spectre d'anomalies de l'ADN : liées aux rayonnements, à l'inhibition de la réplication de l'ADN, aux infections virales ou encore aux liaisons inter-brin de l'ADN (257).

Chk1 est nécessaire au point de contrôle des phases S et G2/M du cycle cellulaire (figures 14 et 15). Son activité est induite par l'activation d'ATR et/ou d'ATM suite à un stress génotoxique permettant ainsi de bloquer la réplication de l'ADN (257). Pour ce faire, Chk1 est activé par phosphorylation via ATR et retarde transitoirement la progression du cycle cellulaire à travers les phases S et G2/M de sorte que les lésions de l'ADN puissent être efficacement réparées (250). La kinase Chk1 est donc principalement effectrice en aval d'ATR mais également d'ATM. En détail, l'activation de Chk1 implique la phosphorylation de différentes sérines de cette protéine, Ser317 et Ser345 par ATR/ATM, ainsi que son autophosphorylation sur la sérine 296 (Ser296). La phosphorylation de Chk1 sur les Ser317 et Ser345 mène à l'activation de Chk1 (258). De manière spécifique, la phosphorylation de la Ser317 sert d'élément déclencheur nécessaire à la phosphorylation de la Ser345 qui elle est le déterminant final de l'activation maximale du point de contrôle (250). Chk1 exerce son action de point de contrôle sur le cycle cellulaire en régulant la famille de phosphatases cdc25, notamment en phosphorylant cdc25A, inhibant ainsi son activité (259). Cdc25C est également inactivé par phosphorylation de Chk1, bloquant ainsi l'activation de cdk1 et la transition vers la mitose (260).



**Figure 15. Action centrale de Chk1 comme point de contrôle du cycle cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN.**

D'après Zhang Y et Hunter T, *Int J Cancer* (250). GF : Growth factor ; DDR : Réparation des dommages à l'ADN ; *Repair* : réparation de l'ADN

## 2. Chk1 et cancer

De nombreux laboratoires pharmaceutiques ont développé des inhibiteurs spécifiques de Chk1. Plusieurs études réalisées sur différents modèles de tumeurs ont montré que ces molécules, inhibiteurs de Chk1, potentialisent les lésions de l'ADN induites notamment par des agents de chimiothérapies.

### A. Généralités

Le gène *CHEK1* est situé sur le chromosome 11 en position 11q22-23, une région portant également le gène *ATM* et sur laquelle des délétions fréquentes et une perte d'hétérozygotie est retrouvée de manière classique dans de nombreuses tumeurs (261). Compte tenu de son rôle essentiel dans les points de contrôle de réparations des dommages à l'ADN et du cycle cellulaire, *CHEK1* était initialement considéré comme un gène suppresseur de tumeur, cependant, aucune mutation homozygote perte de fonction de *CHEK1* n'a été détectée dans une large gamme de tumeurs humaines (262–265). De plus, *CHEK1* a été retrouvé surexprimé dans un grand nombre de tumeurs tels que le cancer du sein, colon et estomac avec une expression retrouvée corrélée à la récurrence (266–268). Ainsi *CHEK1* est communément considéré comme un oncogène.

Inhiber Chk1 en présence d'anomalies de l'ADN, comme par exemple celles induites par des produits cytotoxiques de chimiothérapie, a donc été proposé comme piste thérapeutique dans différents types de cancer. Plusieurs molécules inhibant Chk1 sont actuellement testées en préclinique et en clinique avec une spécificité d'action sur Chk1 ou bien une plurivalence sur d'autres cibles des mécanismes du DDR. Ces différents inhibiteurs de Chk1 disponibles pour des études précliniques sont présentés dans le tableau 8.

| Nom        | Spécificité d'action             | Compagnie             |
|------------|----------------------------------|-----------------------|
| CHIR-124   | Chk1 sélectif                    | Chiron Corp.          |
| SB 218078  | Chk1 sélectif                    | Eli Lilly and Company |
| SCH 900776 | Chk1, <i>Cdk2</i> et <i>Chk2</i> | Merck                 |
| TCS 2312   | Chk1 sélectif                    | Tocris Bioscience     |
| PD 407824  | Chk1 et <i>Wee1</i>              | Pfizer                |
| PF-477736  | Chk1 sélectif                    | Pfizer                |
| AZD 7762   | Chk1 et <i>Chk2</i>              | Astra Zeneca          |
| V158411    | Chk1 sélectif                    | Vernalis              |
| GDC-0575*  | Chk1 sélectif                    | Genentech             |

**Tableau 8. Inhibiteurs de Chk1 disponibles en préclinique et leurs spécificités d'action sur Chk1.**

\*Le GDC-0575 n'est pas disponible à la vente au contraire de tous les autres inhibiteurs de Chk1 présentés dans ce tableau.

Le développement des inhibiteurs de Chk1 soulève plusieurs points d'interrogation concernant : (1) la nécessité ou non d'associer un inhibiteur de Chk1 à un autre mécanisme défaillant de la chaîne du DDR (afin d'obtenir un effet de type *synthetic lethality*) pour obtenir un effet biologique, (2) la capacité de ces molécules à être potentialisées par l'effet des chimiothérapies cytotoxiques et (3) le caractère prédictif d'efficacité du statut *TP53* muté et donc un intérêt d'administration préférentiel chez les patients porteurs de tumeurs p53 déficientes.

Concernant l'intérêt de combiner l'inhibition de plusieurs effecteurs du DDR pour obtenir un effet biologique, des essais cliniques sont en cours reposant sur des données précliniques encourageantes, par exemple avec inhibiteur de PARP plus inhibiteur d'ATM (269). Des données sont également disponibles sur des modèles de cancer de l'ovaire avec la combinaison inhibiteur de Chk1 et inhibiteur de PARP induisant un effet synergique en combinaison (270). Néanmoins, ces données de combinaison ne doivent pas occulter l'efficacité des inhibiteurs de Chk1 en monothérapie, en l'absence de situation de *synthetic lethality* (270,271).

Concernant la potentialisation des inhibiteurs de Chk1 par un agent cytotoxique, les données précliniques sur différents types tumoraux, notamment sein et sarcomes, sont en faveur d'une additivité voire d'une synergie d'action lors de combinaison avec des agents de chimiothérapie (272,273). De même, cette potentialisation d'effet par un cytotoxique n'apparaît pas obligatoire pour obtenir un effet des inhibiteurs de Chk1 au vu des données en monothérapie.

Concernant le statut *TP53*, plus de 50% de l'ensemble des tumeurs présentent une mutation inactivatrice de *TP53* (274,275). Ces tumeurs présentent une dépendance vis à vis des points de contrôle S et G2-M pour leur réponse aux dommages à l'ADN (259,276). En effet, l'inactivation de p53 induit un défaut du point de contrôle de la phase G1 (277). Lorsque les points de contrôle des phases S et G2 sont abrogés par l'inhibition de Chk1 (par un inhibiteur de Chk1), les cellules tumorales déficientes en p53 subissent une catastrophe mitotique et une apoptose (278,279). Des travaux récents sur un modèle de cancer du sein triple négatif semblent renforcer cette hypothèse (272) tout comme ceux dans les sarcomes (273). Le statut *TP53* muté pourrait donc représenter un facteur prédictif d'efficacité.

A ce jour peu de données sont disponibles sur l'efficacité et la tolérance des inhibiteurs de Chk1 chez l'homme et il n'y a donc pas de facteurs prédictifs clairs et établis d'efficacité. Ces données concernent principalement des essais de phase 1 avec un nombre limité de patients et de situations cliniques (273,280–282).

## **B. Chk1 et cancer du sein**

Il existe peu de données relatives à des expériences utilisant des inhibiteurs de Chk1 dans des modèles de cancer du sein. De manière spécifique au cancer du sein, il a été retrouvé qu'une faible expression transcriptomique de *CHEK1* semble être corrélée à un bon pronostic quand l'ensemble des sous-groupes sont considérés mais également dans le sous-groupe des tumeurs moléculaires apocrines (283). Des données IHC viennent renforcer le rôle pronostic négatif de l'expression de Chk1 (284). Celle-ci peut être mesurée grâce à un anticorps anti-pChk1 (phospo-Chk1

Serine S345) pour lequel un marquage cytoplasmique et/ou nucléaire élevé est corrélé à un taux de rechute local (285).

Concernant le statut *TP53* du modèle cellulaire étudié, certaines expériences *in vitro* sont en faveur de prendre en compte l'inactivation de p53 comme facteur majeur de réponse aux inhibiteurs de Chk1 (272). Par ailleurs, une étude portant sur trois inhibiteurs de Chk1 différents, V158411, PF-477736 et AZD7762 dans des lignées cellulaires mammaires retrouve une efficacité supérieure dans les lignées triple négatives versus les lignées luminales. Dans cette étude les auteurs ne retrouvent pas d'effet du statut de *TP53* sur l'activité des inhibiteurs de Chk1 (271) notamment sur la lignée MDA-MB-453, considérée comme *TP53* sauvage dans cet article. Le rôle prédictif du statut p53 dans l'efficacité des inhibiteurs de Chk1 dans le cancer du sein reste donc également à clarifier.

Alors qu'une publication a testé des inhibiteurs de Chk1 sur la lignée moléculaire apocrine MDA-MB-453 (271), il n'y a pas à l'heure actuelle de données spécifiques différentielles d'efficacité sur ce sous-groupe de tumeurs versus d'autres sous-groupes de cancer du sein. En parallèle, dans des modèles de cancer de la prostate, il a été montré que le RA induit la régulation de nombreux gènes de réparation des dommages à l'ADN (249). De plus, certains auteurs indiquent que Chk1 pourrait réguler l'activité transcriptionnelle du RA (286). Ces données précliniques fournissent le rationnel à la mise en place d'essais dans le cancer de prostate. Ceux-ci concernent des anti-androgènes, antagonistes du RA ou des inhibiteurs de synthèse des androgènes (dont l'abiratérone), combinés avec des inhibiteurs de la réparation de l'ADN dont des inhibiteurs de PARP ou de Chk1.

L'activité des inhibiteurs de Chk1 n'est pas encore démontrée dans le cancer du sein de manière générale en l'absence de données disponibles au travers d'essais cliniques. Les seules données disponibles sont relatives à un inhibiteur non spécifique de Chk1, l'UCN-01. Cette molécule est un inhibiteur sélectif de la protéine kinase C qui a démontré une activité inhibitrice sur Chk1. En combinaison avec l'irinotécan dans une étude de phase 2, le taux de réponse dans des tumeurs mammaires triples négatives n'était que de 4% (287). L'absence de spécificité de cette molécule a conduit à l'arrêt de son développement. Les données précliniques

dans les tumeurs triple négatives sont prometteuses avec des molécules bien plus spécifique et un premier essai clinique est en cours avec un inhibiteur de Chk1/Chk2 (LY2606368) pour évaluer son intérêt chez des patientes mutées BRCA1/2 avec le rationnel d'induire un effet de *synthetic lethality* (NCT02203513). Les données précliniques dans les cancers de la prostate, RA-dépendant, laissent entrevoir un intérêt, par analogie, dans les cancers du sein moléculaires apocrines.

## Objectifs de la thèse

---

Notre équipe de recherche clinique et préclinique s'est imposée comme une des équipes à l'avant-garde de la recherche sur les tumeurs du sein moléculaires apocrines.

Suite à la description par les Prs Iggo et Bonnefoi de ce sous-groupe tumoral pour la première fois en 2005, notre groupe a réalisé un des trois essais cliniques testant l'hypothèse biologique du rôle central des androgènes dans ces tumeurs. Les résultats de notre essai corroborent les autres données cliniques disponibles, en faveur d'une efficacité réelle mais limitée à un petit nombre de patientes traitées. Ceci met en évidence que l'identification de ces tumeurs moléculaires apocrines en pratique clinique (reposant sur la positivité du RA et la négativité du RE et RP en IHC) n'est pas optimale et qu'il n'y a pas de facteurs prédictifs d'efficacité disponibles pour ces traitements anti-androgènes.

L'objectif de cette thèse est d'approfondir les connaissances des mécanismes de sensibilité et d'améliorer les prises en charge thérapeutiques des cancers du sein moléculaires apocrines à travers deux projets distincts. Le premier cherche à approfondir les connaissances du modèle classique de tumeurs moléculaires apocrines, la lignée cellulaire MDA-MB-453 et de rechercher de nouveaux modèles d'étude dans le but de tester un nouvel anti-androgène (l'ODM-201) dans des conditions caractérisées. Le deuxième projet a pour but de rechercher des facteurs prédictifs de réponse à un anti-androgène, l'acétate d'abiratérone et d'isoler de potentielles cibles thérapeutiques à partir du matériel tumoral des patientes incluses dans l'essai clinique réalisé par notre équipe.

# Publications

---

Les résultats des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avec pour objectif l'amélioration des prises en charge spécifiques des tumeurs moléculaires apocrines sont rapportés sous forme de deux projets.

Le premier projet a généré des données précliniques d'efficacité d'un nouvel anti-androgène, l'ODM-201. Ce projet s'appuie sur la mise en évidence de la nécessité d'utiliser de nouveaux modèles d'études précliniques spécifiques.

Le deuxième projet est l'analyse ancillaire de l'étude clinique UCBG 12-1 qui testait l'abiratérone dans le sous type-tumoral moléculaire apocrine. Ce projet a permis d'identifier des facteurs prédictifs de réponse et de définir une cible thérapeutique, Chk1. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de cette cible en combinaison avec l'abiratérone permet d'envisager une amélioration des taux de réponses observés sous abiratérone.

## **Projet 1**

**Modèles de tumeurs moléculaires apocrines**

**et**

**Etude d'un nouvel anti-androgène, l'ODM-201**

## Résumé des travaux effectués

### 1. Contexte

Notre groupe de recherche a entamé une collaboration avec le laboratoire BAYER HealthCare en 2016 (Annexe 1 et 2). Celle-ci concerne le développement d'un nouvel anti-androgène non stéroïdien de type antagoniste du RA, de haute affinité, l'ODM-201 (220). Celui-ci est déjà en cours d'essai clinique chez l'homme dans les cancers de la prostate avancés. Cette molécule y a été jugée efficace et bien tolérée (222,288).

L'expérimentation de ce nouveau traitement anti-androgène nécessite un modèle d'étude robuste. Le modèle classique de tumeurs moléculaires apocrines est la lignée MDA-MB-453 décrite dans la littérature comme ayant une croissance RA et androgéno-dépendante (36,153). Cette lignée est néanmoins porteuse d'une mutation du RA, Q865H (ligand binding domain) (179) aux conséquences fonctionnelles non claires. Nous avons également pu tester la lignée SUM185PE, autre modèle de tumeurs moléculaires apocrines, et un contrôle de lignée androgéno-dépendante de cancer de la prostate (LNCAP).

L'utilisation de *Patient Derived Xenograft* (PDX) constitue une alternative au modèle de lignées cellulaires. Dans un modèle de type PDX, une tumeur humaine directement greffée chez la souris peut permettre d'étudier la réponse à différentes thérapies ciblées spécifiques aux anomalies retrouvées dans son génome tumoral (revue de littérature dans les références (289–291)). Beaucoup d'espoir repose sur ces modèles. Ils pourraient permettre d'améliorer les résultats actuels relativement limités des approches de médecine personnalisée en oncologie où les patients sont traités en fonction des anomalies génomiques identifiées par séquençage de nouvelle génération, sans test préalable de la sensibilité réelle de la tumeur (238,292).

Dans ce projet, nous avons cherché à caractériser l'androgéno-dépendance de la croissance de la lignée classique de tumeurs moléculaires apocrines, MDA-MB-453

et à définir de nouveaux modèles d'études précliniques de type PDX orthotopique. Ces travaux avaient également pour but d'établir l'activité de l'ODM-201 et de vérifier la spécificité de son action.

## 2. Résultats

Nos premières expériences ont cherché à caractériser la dépendance aux androgènes de notre modèle d'étude, la lignée MDA-MB-453, à l'aide de multiples tests de milieux de culture visant à établir des conditions définies en androgènes (SVF réduit à 1% ou sérum *Charcoal stripped*). Celles-ci ont été réalisées sur plusieurs souches et passages de lignée MDA-MB-453 et retrouvent une dépendance faible de la croissance cellulaire vis-à-vis des androgènes (de même dans la lignée SUM185PE) en partie similaire à la littérature. Néanmoins, nous reproduisons les résultats de la littérature concernant la majoration de la viabilité cellulaire induite par les androgènes (multipliée par 1,5). Nous avançons donc le terme d'androgéno-sensibilité plutôt qu'androgéno-dépendance pour caractériser la physiopathologie du modèle cellulaire MDA-MB-453 vis-à-vis des androgènes.

L'étude du nouvel anti-androgène à notre disposition, l'ODM-201, a été réalisée sur le modèle établi, certes imparfait, de la lignée MDA-MB-453. L'ODM-201 a été fourni grâce au soutien du laboratoire BAYER HealthCare

Nous avons montré que l'action de l'ODM-201 est à la fois RA spécifique et compétitive avec les androgènes, confirmant son action d'antagoniste du RA. Malgré l'effet spécifique de l'ODM-201 sur le RA, nos résultats montrent que les lignées moléculaires apocrines présentent une sensibilité moindre aux anti-androgènes (ODM-201 et enzalutamide présentant des IC50 de plusieurs dizaines de micro-molaire) comparativement à la lignée de cancer de prostate LNCAP. Ceci soulève la possibilité d'un effet non spécifique de ces drogues dans ces modèles.

L'effet de l'ODM-201 reste difficile à caractériser dans les lignées moléculaires apocrines. En effet, une exposition à l'ODM-201 aux doses d'IC50 (définies en MTT)

n'induit pas d'augmentation franche d'apoptose, corroborant un effet attendu non-cytotoxique. Par ailleurs, nous n'avons pas retrouvé d'effet sur le cycle cellulaire. L'étude de l'anti-androgène ODM-201 n'a pas permis de mettre en évidence d'effet différentiel vis-à-vis des traitements anti-androgènes existants (enzalutamide ou abiratérone).

## **Rapport de collaboration avec le laboratoire BAYER**

**Grellety T**, Cardinaud B, Bonnefoi H.

*Preclinical in vitro analysis of ODM-201 (darolutamide) using MDA-MB-453 cell line as a model for molecular apocrine breast cancer.*

**Preclinical *in vitro* analysis of ODM-201 (darolutamide)  
using MDA-MB-453 cell line as a model for molecular apocrine  
breast cancer**

Grellety T, MD PhD Student

Bonnefoi H (Prof), MD

Cardinaud B, Senior scientist

INSERM UNIT U1218, Institut Bergonié, Bordeaux, France

## **I. Introduction**

Breast cancer is a clinically and biologically heterogeneous disease. Gene expression array studies have revolutionized the biological understanding of breast cancer. Several microarray-based studies identified a new breast cancer subtype characterized by the expression of the androgen receptor (AR), absence of the estrogen receptor  $\alpha$  (ER) and paradoxical expression of many genes that are typically expressed in ER-positive luminal tumors (1–4). We named these tumors "molecular apocrine" as they have an expression profile indicative of increased androgen signaling and some morphological hallmarks of apocrine tumors (1). Two-thirds of these tumors are human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive and the rest are HER2-negative. The latter is part of triple-negative breast cancer (TNBC) group.

In 2006, the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) group showed that MDA-MB-453 cell line shares transcriptomic similarities with molecular apocrine breast cancers (2). Thus the MSKCC group and several other groups used this cell line as a preclinical *in vitro* model representing molecular apocrine tumors. The MSKCC group reported that this cell line showed a proliferative response to androgen that is AR-dependent (R-1881) and ER independent (2). This proliferative effect was abrogated by flutamide (2). Of note, more than 20 years ago, a long time before microarrays technology and identification of the molecular apocrine subtype, a research group from University of South Australia showed that MDA-MB-453 cell line proliferation was increased by androgens (5).

In 2011, the Dana-Farber group confirmed that bicalutamide abolish proliferation and demonstrated that it induced apoptosis (6).

On the same year, the Vanderbilt University group reported the results of a trial in which they tested the sensitivity of several TNBC cell lines to bicalutamide (4). Luminal androgen receptors (LAR) cell lines (including MDA-MB-453) were more sensitive to bicalutamide than basal-like cell lines. This group showed also that the growth and viability of AR+ and TNBC cell lines (MDA-MB-453, CAL-148, MFM-223, SUM-185) is significantly reduced after treatment with PI3K inhibitors in combination with bicalutamide (7).

In 2014, the Colorado University group reported that the AR-antagonist enzalutamide completely abrogated this proliferation induced by DHT both *in vitro* and *in vivo* (8). Surprisingly, they showed that enzalutamide inhibited E2-induced proliferation *in vitro* of both MCF7 and BCK4 cell lines used as a negative control.

ODM-201 (darolutamide), a high-affinity non-steroidal antagonist of the AR, is in clinical development for prostate cancer (9,10). Demonstration of a specific preclinical activity of this new anti-androgen in MDA-MB-453 cell lines could support the activation of a clinical research program evaluating this agent in molecular apocrine breast cancer.

## **II. Objectives and methods**

### **Objectives**

The objective of this study was to establish the activity of ODM-201 and to check the specificity of its action in MDA-MB-453 cell line *in vitro*. The SUM185PE cell line, another model for molecular apocrine tumors, was also tested. The classical androgen-dependent prostate cancer cell line (LNCAP) was used as a control. First, we verified the androgen-dependent growth of the MDA-MB-453 cell line. Second, we studied the effect of ODM-201 on MDA-MB-453, SUM185PE and LNCAP cell lines.

### **Cell lines**

The different experiments were carried out on early passages of the ATCC-derived cell line MDA-MB-453 (ATCC® HTB-131™). SUM185PE line and a second strain of the MDA-MB-453 line were provided by the team of Dr De Cremoux (CNRS UMR7212 / INSERM U944, Hôpital Saint-Louis, Paris, France).

MDA-MB-453 and SUM185PE are grown in DMEM medium (Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) with 1% Penicillin/Streptomycin (except for androgen-dependence assays as mentioned below). The LNCAP line is derived from ECACC (European Collection of Authenticated Cell Culture via Sigma Aldrich) and is grown in RPMI supplemented with 10% FCS with 1% Penicillin/Streptomycin. The MDA-MB-231 line (use as AR negative cell line model) is also derived from the ATCC (ATCC® HTB-26™), grown in DMEM (Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA) supplemented with 10% FCS with 1% Penicillin/Streptomycin.

### **Drugs**

ODM-201 was obtained from the BAYER HealthCare laboratory. Abiraterone acetate (AA) and enzalutamide (Enza) were acquired via Selleckchem (references: S2246 and S1250 respectively).

Abiraterone has been tested for its primary inhibitory effect on androgen synthesis with a non-antagonistic predominant action on androgen receptor (AR). This allows comparison with the AR antagonists studied here.

The drugs used are diluted in DMSO with the exception of abiraterone acetate which is diluted in ethanol.

DHT was diluted in ethanol and R1881 (Sigma-Aldrich) in DMSO. They are used at a dose of 10nM.

### **Cell count**

Experiments to demonstrate growth androgen dependence of cell lines were performed by cell counting with these two different androgen-verified medium conditions. 20,000 cells are seeded in a 24-well plate in a standard growth medium of each line, DMEM 10%FCS for MDA-MB-453 and SUM185PE, RPMI 10%FCS for LNCAP. After 24 h, the cells are rinsed in PBS.

In the first condition, classical media were used with addition of 10% charcoal-stripped serum. Charcoal stripped serum were commercial (Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA) and also homemade, made by adding 5g of charcoal (C-4386, Sigma) to 100 ml of FCS before stirring for 45 min, then centrifuge at 12.000 rpm 30 min at 4°C and finally filter with 0.2 µm filter.

In the second condition, RPMI or DMEM are supplemented with 1% FCS.

For the two conditions, the FCS-poor medium (10% charcoal-stripped or 1% FCS) is applied for 24 h. DHT 1nM (25µM stock) or 1nM R1881 (10mM stock) are subsequently added to the medium for 5 days before cell detachment and automatically counted by a Beckman Coulter counter (Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer, California, USA).

### **Cell viability assay**

For the androgen dependence tests of cell viability, 3000 cells are seeded in a 96-well plate in standard growth medium of each line, DMEM 10% FCS for MDA-MB-453 and SUM185PE, RPMI 10%FCS for LNCAP. After 24 h, the cells are rinsed in PBS (phosphate buffered saline), then an FCS-poor medium is applied for 24 h, RPMI or DMEM supplemented with 1% FCS. A range of DHT or R1881 is applied for 5 days before reading.

For drug treatments, 3000 cells are seeded in a 96-well plate in standard growth medium of each line, DMEM 10% FCS for MDA-MB-453 and SUM185PE, RPMI 10%FCS for LNCAP. After 24 hours, cells are treated with a decreasing dose range of drugs by serial dilution for 5 days in the same media.

MTT (Methyl Thiazolyl Tetrazolium, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France), at a final concentration of 0.5mg/mL, was used to measure cell growth inhibition. The tetrazolium salts of the MTT substrate are incubated for 3 hours. The amount of formazan salt produced by the cells is measured on a spectrophotometer by calculating the absorbance between 570 and 630 nm after solubilization in DMSO. The analysis, the calculation of the IC50 and the

representation of the results are carried out with version 5.00 of the GraphPad Prism software for Windows.

### Western blot

The proteins are extracted by cell lysis in SDS-PAGE buffer (11). SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis makes it possible to separate the lysates which are then transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 5% milk PBS Tween (0.1%) (PBST) solution before incubation at 4°C overnight with the primary antibody. After three successive washes in PBST, the primary antibodies (Table 1) were detected by incubation with mouse or rabbit anti-immunoglobulin G (IgG) conjugated horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) at room temperature for two hours. The membranes are reused at most 2 times after desaturation in a solution of Glycine (6.6 mol / L) pH = 2 at 56 °C for 30 min. The visualization is performed by chemiluminescence using an Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent kit (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA). The images are captured by a Fusion FX7 scanner (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) and semi-quantitative analysis is performed using ImageJ 1.45s software.

| Antibody          | Clone  | Reference       | Dilution | Secondary |
|-------------------|--------|-----------------|----------|-----------|
| Androgen receptor | AR 441 | Abcam<br>ab9474 | 1/200    | Mouse     |
| B-actin           | AC-15  | Sigma<br>A5441  | 1/10000  | Mouse     |

Table 1. Primary antibodies use in western blot.

### Cell cycle assay

100000 cells are seeded in 6-well plate wells and then 24 hours after, treated for 72 hours (at least one cell cycle performed by each cell). The cells are then separated, washed and then permeabilized with an ethanol solution (600 µL of ethanol and 300 µL of PBS), for at least one hour at 4°C. Once washed, the cells are incubated in a solution containing RNase (1.5µL / condition), Propidium Iodide (50µg /ml /condition) and 1X PBS in a final volume of 300µL for 15 min in the dark at 37°C. A positive control is performed with nocodazole (50-100ng/mL, CellSignaling Technology), an antimitotic agent used to accumulate cells in phase M or later. Reading is done with the flow cytometer taking into account the fluorescence emitted by Propidium Iodide (FL2). The analysis is performed by BD CellQuest Pro software and version 5.00 of the GraphPad Prism software for Windows.

## **Apoptosis assay**

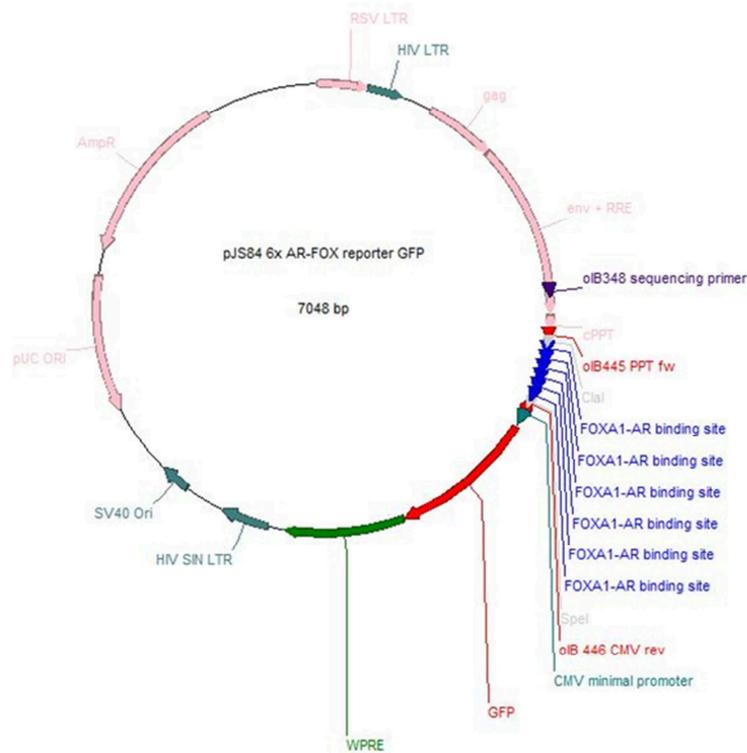
100,000 cells are seeded per well of 6-well plate, and then 24 hours after, are treated for 72 hours. The cells are then exposed to Annexin V-FITC and Propidium Iodide according to the supplier's protocol (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) and then incubated for 15 min at room temperature. The positive control is performed with staurosporin (Abcam), a protein kinase inhibitor inhibiting the binding of ATP to kinases at a concentration of 0.5 to 1  $\mu\text{M}$  depending on the lineage. Reading is done with the flow cytometer taking into account the fluorescence emitted by the FITC (FL1) and the Propidium Iodide (FL2). The analysis is performed by BD CellQuest Pro software and version 5.00 of the GraphPad Prism software for Windows.

## **Immunofluorescence of AR localization**

5000 cells are seeded in 96-well plates for 24h before treatment for 72 hours (at respective IC50 concentration, DHT 10nM). The wells are then washed with PBS 1X and the cells are fixed to 4% formaldehyde for 15 minutes. The cells are then incubated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 10 min to block the aldehyde groups, then rinsed and permeabilized with 0.5% Triton X-100 solution. The incubation with the anti-AR primary antibody (ab9474 Abcam, Cambridge, United Kingdom) diluted to 1/50 of 0.2% gelatin/PBS 1X is carried out overnight at 4°C after saturation in gelatin 0.2%/PBS 1X for 30 min. Cells are then washed with 0.2% gelatin/PBS1X and PBS1X. Incubation with the secondary antibody, Alexa Fluor® 488 dye (Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA) was carried out after PBS washing with 1/400 dilution in 0.2% gelatin/PBS 1X for 1 h at room temperature. The nuclei are counter-stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Fluorescence was read by LEICA microscopy at 20x and analysed with FIJI software version 1.51n (12). The analysis takes into account the number of nuclei positive for the AR staining. The positivity threshold of each experiment is constant between the conditions, based on the basal AR-fluorescence level of the cytoplasm of the cells.

## **AR reporter**

The AR activity vector reporter was produced by Richard Iggo (pJS84, see Cartography below). It is composed of a sequence repeated 6 times, specific to the AR and FOXA1 common binding site described in a model of prostate cancer (13). It is coupled to a GFP fluorescent reporter under the control of a minimal CMV promoter. MDA-MB-231 cells are used (AR negative). They are transduced at a MOI of 10 with a GFP-AR reporter. The cells are previously transduced at a MOI of 10 with a vector containing the AR gene described by Chen et al. in 2004 (14). Reading of the fluorescence is carried out by flow cytometry after 48h of exposure to the treatment of interest. Virus production and transduction is carried out in our Level 3 biosafety containment laboratory in accordance with French legislation on genetically modified organism.



Cartography of the GFP-AR reporter plasmid. Logiciel ApE, v2.0.52.

### III. Results

#### 1. Verification of the androgen-dependence of the MDA-MB-453 cell line

In order to study the effect of ODM-201, we sought to check the androgen dependency of our study model. For that, we tested two culture media to control the amounts of androgens. The experiments were carried out on different cell strains from 2 different laboratories with variable passages, including early passages (P2 of the ATCC).

The first condition tested was DMEM medium supplemented with 10% Charcoal Stripped Serum (commercial or homemade from commercial FCS). The tests resulted in slower cell growth compared to 10% FCS. Moreover, a rapid phenotypic modification which prevented the maintenance of cells in this condition was observed within one or two days. Addition of androgens (DHT or R1881) does not reverse the observed modification (data not shown).

The second condition tested was a media with the minimum amount of FCS the cells can bear (transiently), which is DMEM but with only 1% FCS. Our measure revealed that the testosterone concentration was in that condition lower than 0.01nM (as measured by mass spectrometry) and we finally choose to use it for our reported experiments (figure 1). We observed an increase of cell growth induced by androgens of approximately 1.5 when

compared to media without addition of androgen; a result difficult to reproduce (figure 1A). These experiments were carried out at least in triplicates and representative results are shown in figure 1A. Under this condition, we did not find a dose-dependent effect on cell growth neither by DHT nor by R1881.

With the same media condition, our cell viability experiments found an identical effect of the two androgens used (DHT or R1881) on molecular apocrine cell lines with an increase in cell viability (encompassing cellular general metabolic activity) (figure 1B). This effect is more marked on the SUM185PE line than on the MDA-MB-453 line with lower amplitude on the LNCAP.

## **2. Action of ODM-201**

### **a. Cell viability reduction and inhibitory concentration 50% (IC50) determination**

We found a quite high IC50 for ODM-201 in MDA-MB-453 (16.2 $\mu$ M) with no competitive effect of androgen saturation of the media on cell viability (figure 2A).

The cell viability reduction and IC50 of two other antiandrogens, enzalutamide and abiraterone, on MDA-MB-453 and SUM185PE molecular apocrine cell lines were tested. No competitive effect of androgen saturation of the media on cell viability was also observed (figure 2B). ODM-201 and Enzalutamide IC50s in MDA-MB-453 cell lines were very similar.

Enzalutamide and abiraterone IC50s were similar to those reported in the literature in MDA-MB-453 cell lines.

Interestingly, ODM-201 and enzalutamide IC50s (condition without adding DHT) were lower in LNCAP cell line than in the molecular apocrine cell lines, SUM185PE and MDA-MB-453 (figure 2B).

We confirmed the already reported LNCAP's sensitivity to ODM-201 (figure 2A-B) and to enzalutamide (figure 2B). We also confirmed that anti-androgens and androgens have a clear competitive effect on the LNCAP cell line (figure 2A-B). In the same conditions, this effect was not found with MTT assays in MDA-MB-453 or SUM185PE cell lines.

### **b. ODM-201 activity on intracellular localization of AR**

First, we have shown that androgenic stimulation by DHT induces the nuclear translocation of AR in the MDA-MB-453 cell line (figure 3).

Second, we assessed the specific action of the ODM-201 and enzalutamide by visualization of AR nuclear import blocking using fluorescence microscopy. The effect of anti-androgens on the percentage of nuclear AR-positive cells was tested in the absence or presence of DHT. In

the absence of DHT, ODM-201 blocks the nuclear translocation of the AR as visualized by a decreased in AR nuclear localization. In the presence of DHT, our results show that ODM-201, as well as enzalutamide, blocks the DHT-induced nuclear translocation of AR in MDA-MB-453 cell line (figure 3).

### **c. AR-dependent activity of ODM-201**

We also tested an AR-activity reporter to demonstrate the AR-dependent ODM-201 activity. To this effect, we measured the transcription activity of a GFP labelled AR transcription reporter using flow cytometry. We used MDA-MB-231 cell line, an AR negative mammary cell model, which was transduced with this reporter and an AR vector (figure 4A). Our experiments showed an exogenous AR activity induced by DHT that exhibited competitive inhibition by ODM-201 or enzalutamide (figure 4B). Figure 4C allows visualizing the dose-dependent competition effect of increased doses of androgen on ODM-201 effect in the MDA-MB-231 model measured by AR activity reporter. We also visualized this effect in the MDA-MB-453 cell line using fluorescence microscopy with a significant difference in the nuclear localization of AR between DHT alone and DHT plus ODM-201 (figure 3). This suggests that ODM-201 has a specific competitive effect on AR comparable to that of enzalutamide (data not shown for AR reporter assays with enzalutamide).

We tested the AR activity reporter in cell lines that strongly expressed endogenous AR (MDA-MB-453 and LNCAP). However, these experiments were unsatisfactory as the reporter is not functional in these lines (MDA-MB-453 or LNCAP). Therefore, we intend to perform complementary RT-qPCR assays on AR target genes such as PSA / KLK3, TMPRSS2 and FKBP5 in those two cell lines.

### **d. Characterization of the effect of ODM-201**

In order to characterize the loss of cell viability observed in MTT assays, we perform apoptosis and cell cycle assays. The anti-androgens tested, including ODM-201, induce very little cell death at IC50 doses calculated in MTT assays. Moreover, we observed few changes in the cell cycle under similar conditions despite persuasive positive control (figure 6).

## **III. Discussion**

Our data with the MDA-MB-453 cell line confirm the androgen dependence or at least sensitivity of this cell line already reported in the literature (2,5,6,7,8). However, as reported by others, the response to androgenic stimulation remains modest with a 1.5 fold growth with the addition of androgens compared to the control condition (2,5,6,8). Of note, we obtained

these results using DMEM medium with 1% FCS instead of a medium supplemented with Charcoal Stripped serum used by other groups (2,5,7). In our hands, MDA-MB-453 cultured in DMEM medium with charcoal stripped serum did not grow. Condition with charcoal stripped serum led probably to a too drastic withdrawal of necessary growth factor, preventing cells growth and further test on cells in those conditions.

In this study, we have shown that ODM-201 activity in MDA-MB-453 cell line is AR-specific. Despite the specific effect of ODM-201 on AR, our results show that the molecular apocrine cell lines (MDA-MB-453 and SUM185PE) exhibit less sensitivity to anti-androgens than the LNCAP prostate cancer cell line (IC50 up to 400 times higher) with no competitive effect of androgens on cell viability loss induced by anti-androgens. Moreover, the effect of ODM-201 remains difficult to characterize in molecular apocrine cell lines. Indeed, exposure to ODM-201 at IC50 doses does not induce an increase in apoptosis corroborating the expected non-cytotoxic effect. Moreover, we did not observe any effect on the cell cycle even though the experiments presented were not carried out in synchronized cells.

An important limitation of this study is the MDA-MB-453 cell line as a model to represent the molecular apocrine carcinoma breast cancer. Its reliability has been questioned, in particular, due to genomic alterations such as mutation of AR (15,16). Indeed, this cell line carries a Q865H mutation in the ligand binding domain of AR reported to decrease sensitivity to DHT (15). This mutation could be analogous to the resistant AR mutations found in anti-androgen pre-treated prostate cancers (17). To improve on that, we are trying to create in our lab a new model of molecular apocrine tumour directly derived from patients. We are using a method that we published recently (18) injecting tumour cells from patients with molecular apocrine tumours directly in mice ducts.

It should be emphasized that although preclinical data in molecular apocrine breast cancers are slightly disappointing (MDA-MB-453 androgen sensitivity is modest and exhibits less sensitivity to anti-androgens than the LNCAP prostate cancer line), clinical data obtained in three clinical therapeutic trials with agents targeting the androgen pathway has reported promising efficacy results (19–21). One of our patients is still in complete response after 4 years on abiraterone acetate treatment (22).

In conclusion, ODM-201 has an AR-dependent action similar to enzalutamide in the MDA-MB-453 cell line model. However this model reliability has been questioned and developing better preclinical models for molecular apocrine breast cancers should be a priority.

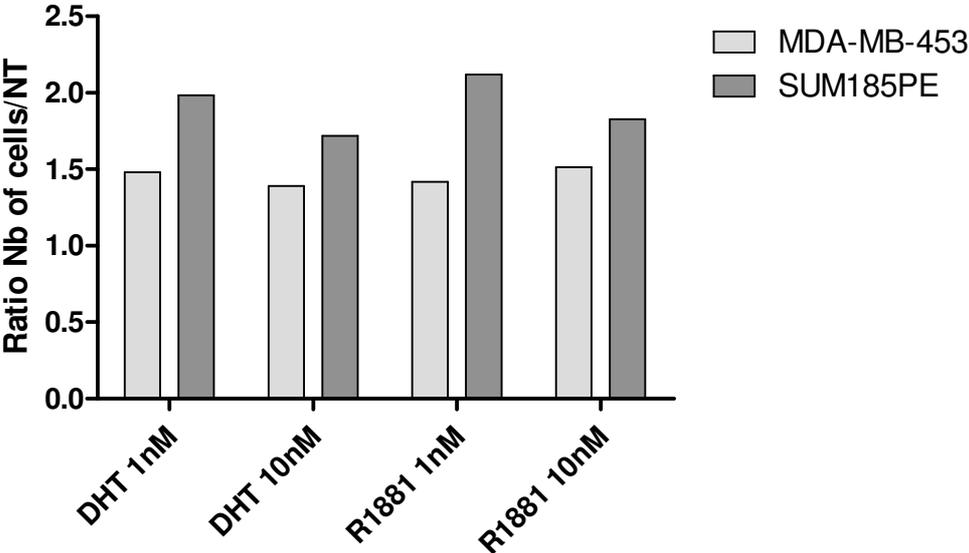
## REFERENCES

1. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005;24:4660–71.
2. Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 2006;25:3994–4008.
3. Guedj M, Marisa L, de Reynies A, Orsetti B, Schiappa R, Bibeau F, et al. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene* 2012;31:1196–206.
4. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750–67.
5. Birrell SN, Bentel JM, Hickey TE, Ricciardelli C, Weger MA, Horsfall DJ, et al. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;52:459–67.
6. Ni M, Chen Y, Lim E, Wimberly H, Bailey ST, Imai Y, et al. Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell* 2011;20:119–31.
7. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, Pendleton CS, Tang L, Johnson KC, et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res* 2014;16:406.
8. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, Cittelly DM, Howe EN, D'Amato NC, et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res* 2014;16:R7.
9. Moilanen A-M, Riikonen R, Oksala R, Ravanti L, Aho E, Wohlfahrt G, et al. Discovery of ODM-201, a new-generation androgen receptor inhibitor targeting resistance mechanisms to androgen signaling-directed prostate cancer therapies. *Sci Rep* 2015;5:12007.
10. Fizazi K, Massard C, Bono P, Jones R, Kataja V, James N, et al. Activity and safety of ODM-201 in patients with progressive metastatic castration-resistant prostate cancer (ARADES): an open-label phase 1 dose-escalation and randomised phase 2 dose expansion trial. *Lancet Oncol* 2014;15:975–85.
11. Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*,. CSHL Press; 1988. 2006.
12. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9:676–82.
13. Pomerantz MM, Li F, Takeda DY, Lenci R, Chonkar A, Chabot M, et al. The androgen receptor cistrome is extensively reprogrammed in human prostate tumorigenesis. *Nat Genet* 2015;47:1346–51.
14. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 2004;10:33–9.
15. Moore NL, Buchanan G, Harris JM, Selth LA, Bianco-Miotto T, Hanson AR, et al. An androgen receptor mutation in the MDA-MB-453 cell line model of molecular apocrine breast cancer compromises receptor activity. *Endocr Relat Cancer* 2012;19:599–613.
16. Vranic S, Gatalica Z, Wang Z-Y. Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. *Oncol Lett* 2011;2:1131–7.
17. Josan JS, Katzenellenbogen JA. Designer antiandrogens join the race against drug resistance. *eLife*. 2013;2:e00692.
18. Richard E, Grellety T, Velasco V, MacGrogan G, Bonnefoi H, Iggo R. The mammary ducts create a favourable microenvironment for xenografting of luminal and molecular apocrine breast tumours. *J Pathol* 2016;240: 256-261

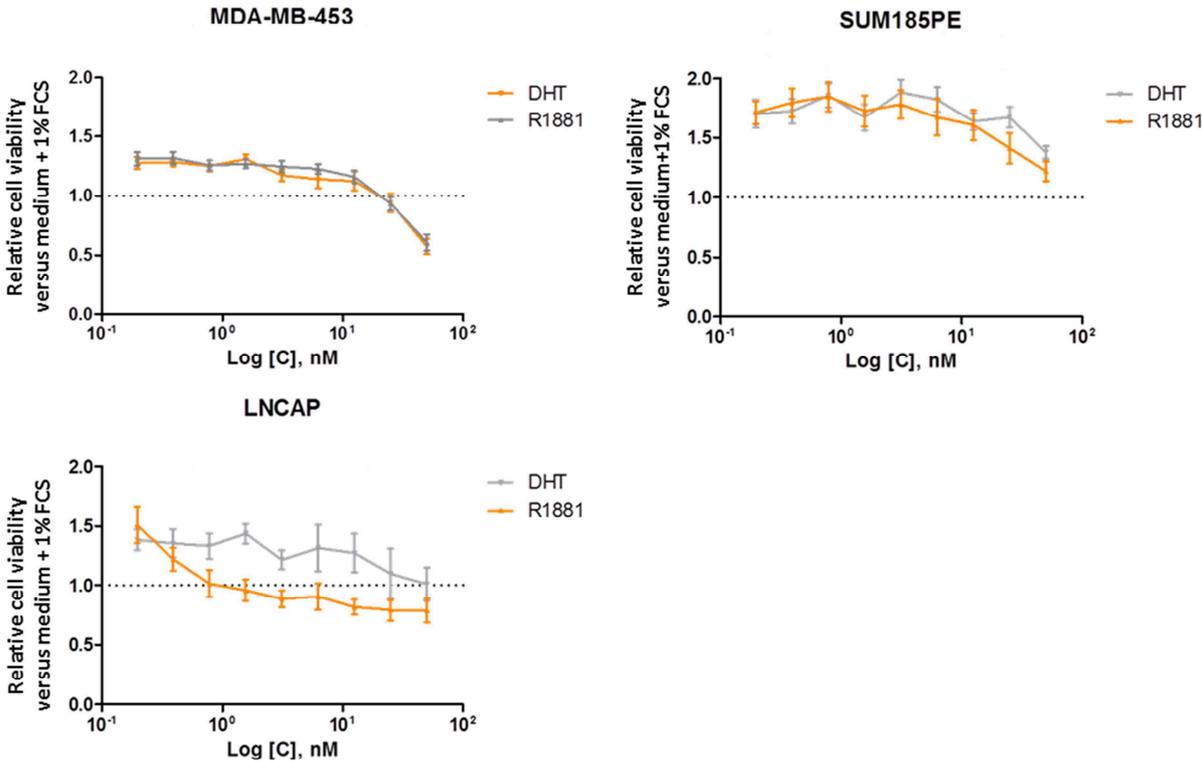
19. Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:5505–12.
20. Bonnefoi H, Grellety T, Tredan O, Saghatchian M, Dalenc F, Mailliez A, et al. A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). *Ann Oncol* 2016;27:812–8.
21. Traina TA. Results from a phase 2 study of enzalutamide (ENZA), an androgen receptor (AR) inhibitor, in advanced AR+ triple-negative breast cancer (TNBC). 2015 ASCO Annual Meeting. Abstract 1003.
22. Grellety T, MacGrogan G, Chakiba C, Kind M, Bonnefoi H. Long-Term Complete Response of an Androgen Receptor–Positive Triple-Negative Metastatic Breast Cancer to Abiraterone Acetate. DOI 101200PO1700223 *JCO Precis Oncol* 2018.

**Figure 1. Androgen dependence tests on molecular apocrine cell lines. A.** by cell count, n=1. **B.** by cell viability assay, n=3. NT= control without addition of androgens. Culture media of each cell line is indicated under bracket and all cell lines were exposed to 1% FCS for the experiments as described in methods section.

A

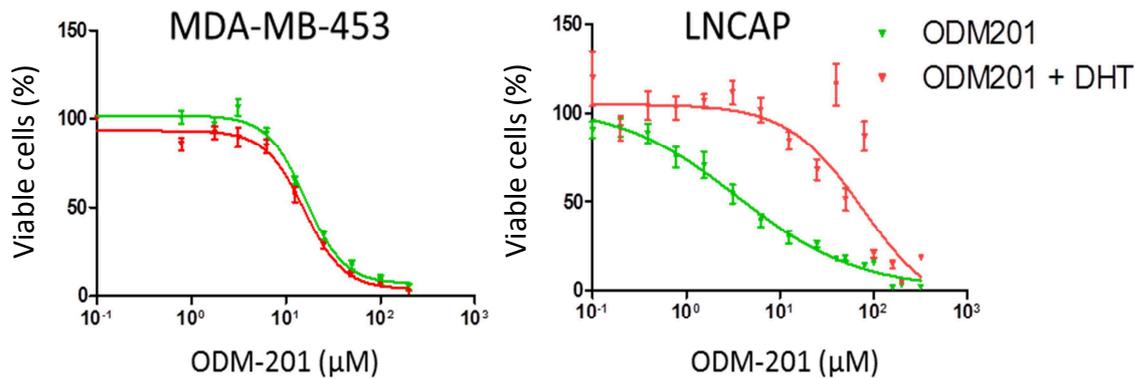


B

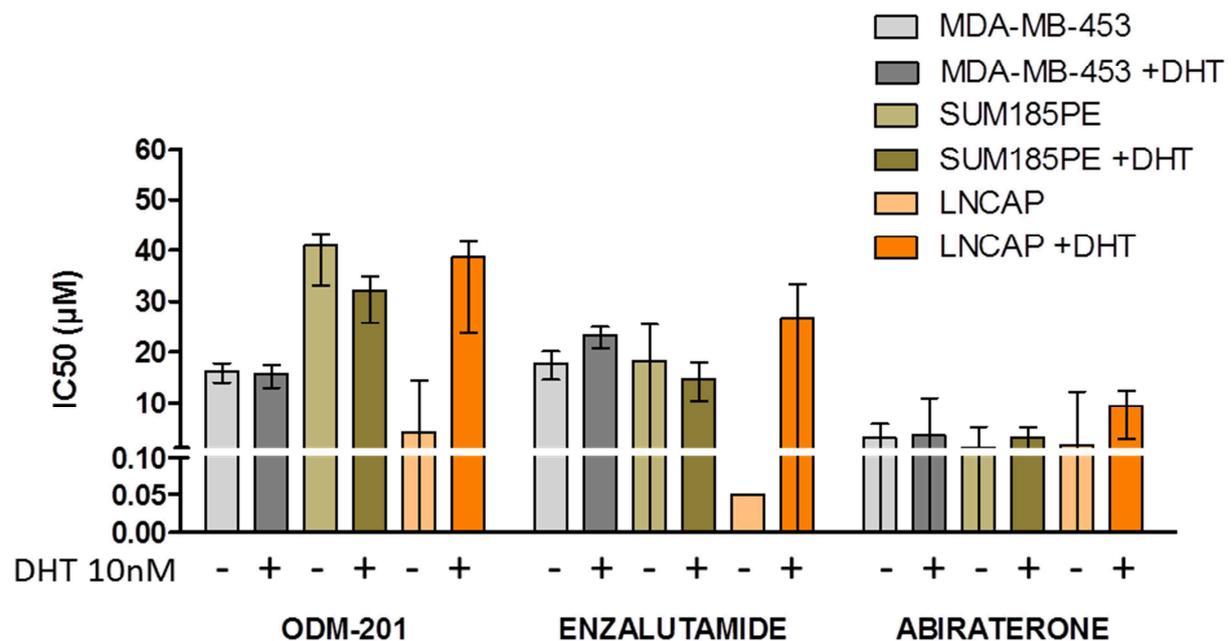


**Figure 2. Comparative cell viability with different anti-androgens in the molecular apocrine cell lines (MDA-MB-453 and SUM185PE) and in the LNCAP. A.** Comparison of the dose response curves between MDA-MB-453 and LNCAP for ODM-201 +/- DHT 10 nM (n = 3-4). **B.** Average IC50 calculated by MTT test (n = 3-4) after 5 days exposure. The error bars represent the 95% confidence interval of the mean.

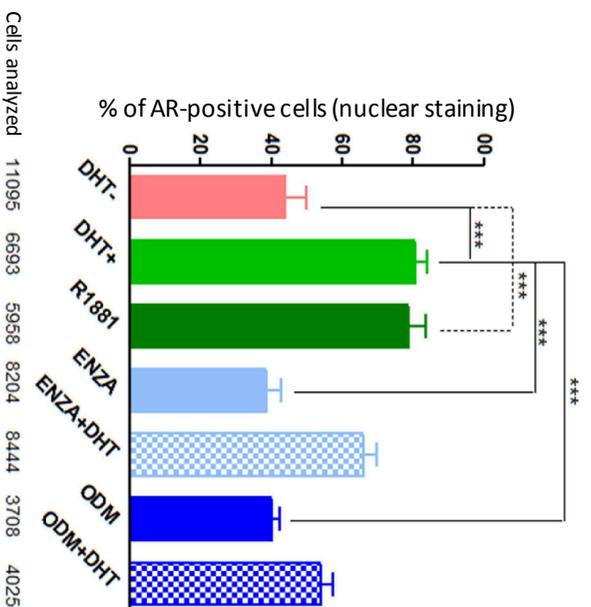
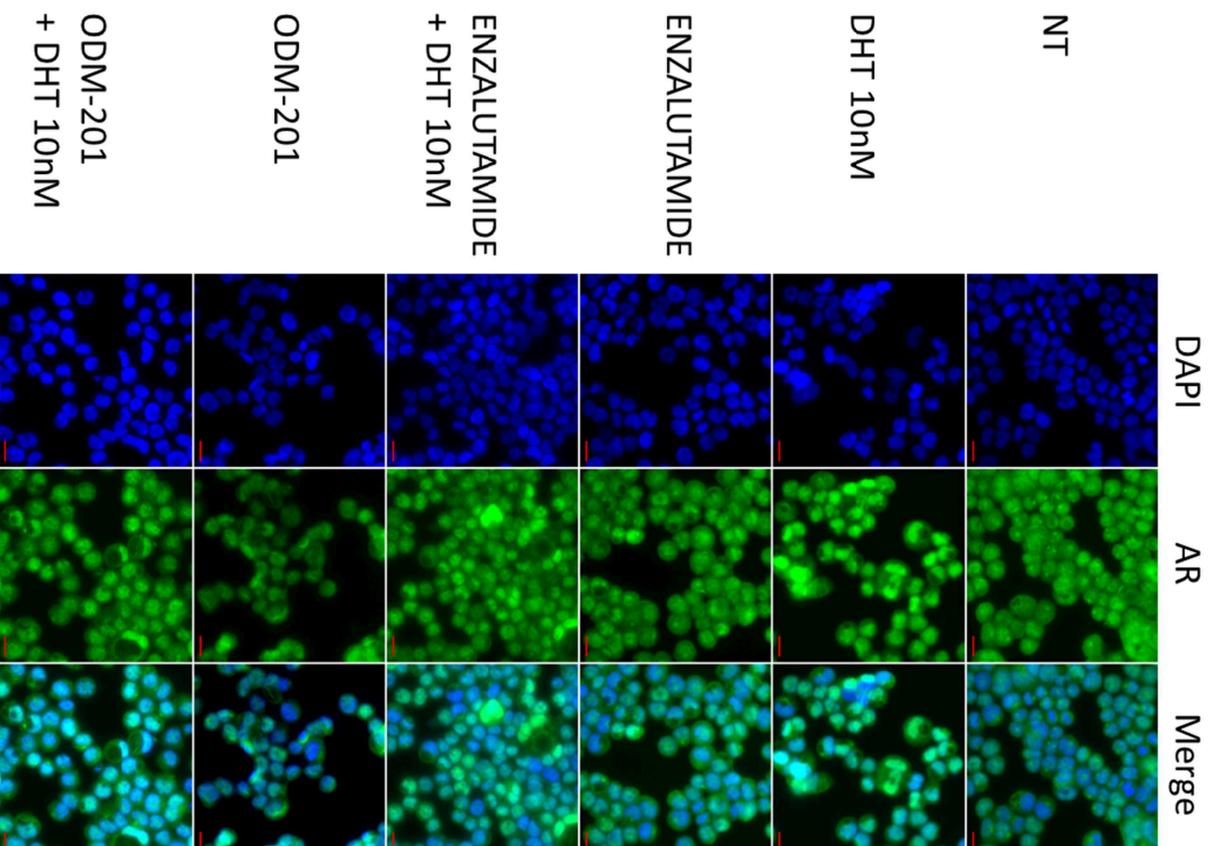
**A**



**B**

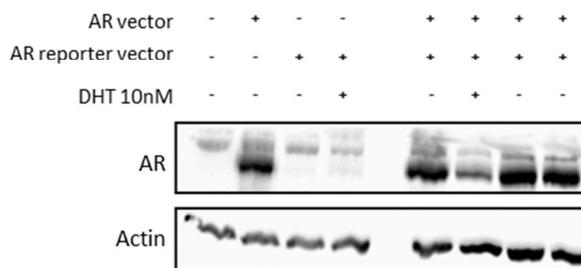


**Figure 3. Visualization of AR localization using fluorescence microscopy with AR-labelled and DAPI-labelled nuclei.** Representation of the number of positive AR-labelled nuclei in the MDA-MB-453 cell line after 2 days of exposure. The number of cells analysed by experiment is given on the figure. The error bars represent the standard error (SEM). One-way Anova with Bonferroni multiple test correction; \*\*\* :  $p < 0,001$ . ODM-201, Enzalutamide at the respective IC50, DHT 10 nM, n=2. NT, not treated.

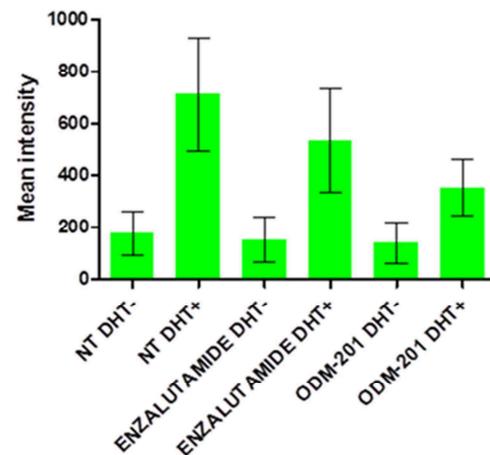


**Figure 4. AR dependence of ODM-201 activity.** **A.** Western blot to verify the expression of AR in MDA-MB-231 cell lines transduced with the AR and +/- AR-reporter (GFP) vector; Ac anti-AR, Abcam ab9474 (1/200); anti-b-actin antibody (1/10000), Sigma, A5441. **B.** Measurement of the transcription factor activity of AR-GFP reporter vector in flow cytometry after 48h of exposure in the MDA-MB-231 cell line transduced by AR vectors and AR activity reporter (GFP). Representation of the average intensity with error bars showing the standard deviation. **C.** Dose-dependent androgenic effect on the action of ODM-201 on AR after 48h of exposure. ODM-201, enzalutamide used at their respective IC50, DHT 10 nM, n=3. NT, not treated.

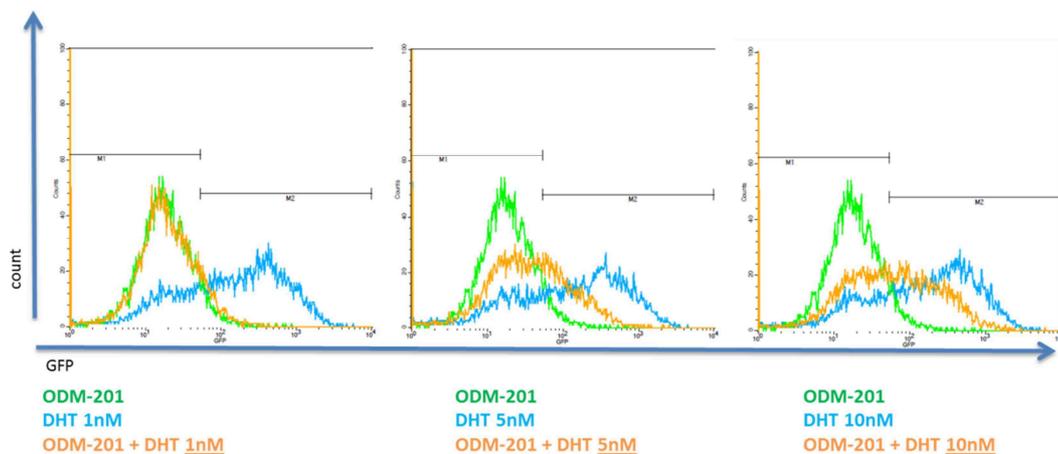
**A**



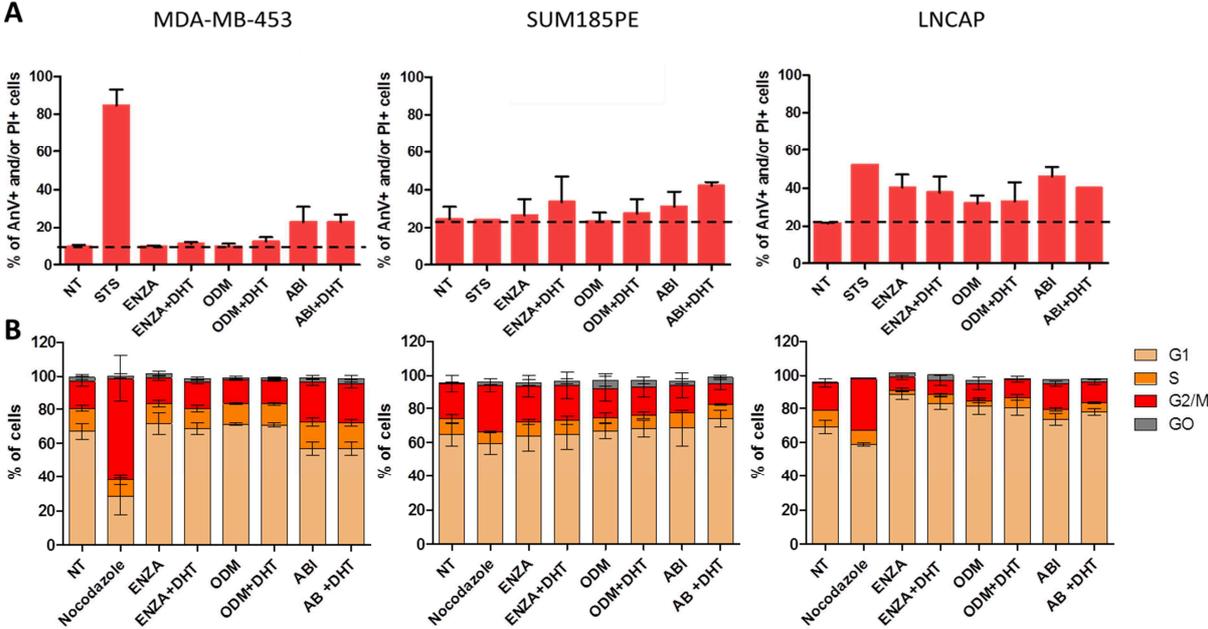
**B**



**C**



**Figure 5. Impact on cell cycle and induction of apoptosis.** **A.** Percentage of apoptotic or necrotic cells labelled with Annexin V (AnV) and/or propidium iodide (PI) in flow cytometry. Positive control, staurosporine (STS, 1  $\mu$ M) **B.** Modification of the cell cycle after labelling with propidium iodide. Positive control, nocodazole (50 ng/mL). The error bars represent the standard error (SEM). Exposure 3 days, ODM-201, enzalutamide and abiraterone used at the respective IC50s, DHT 10 nM, n=3. NT, not treated; ABI, abiraterone; ENZA, enzalutamide; ODM, ODM-201.



## Résultats (suite)

Afin de contourner les limites des modèles cellulaires existants, notamment leurs faibles androgéno-dépendance, nous avons expérimenté la possibilité de travailler sur un modèle de PDX à partir de tumeurs humaines directement injectées dans les canaux galactophoriques de la glande mammaire de souris immunodéficientes (Annexe 3 et 4).

A partir de 31 tumeurs issues de patientes, le taux de succès de prise de greffe en condition orthotopique était de 77% alors même que ces tumeurs ne permettaient pas de prise de greffe en injection sous-cutanée. Nous avons greffé trois tumeurs moléculaires apocrines dont une seule a pu être greffée consécutivement sur trois passages successifs. Le profil IHC de cette tumeur moléculaire apocrine était respecté après ces trois passages. Néanmoins, cette tumeur moléculaire apocrine présente une amplification d'*ERBB2* et un index de prolifération élevé (25 à 35% selon les passages) lui conférant un avantage probable en termes de succès de greffe par rapport aux deux autres tumeurs moléculaires apocrines qui elles sont *ERBB2* non amplifiées.

Nos résultats démontrent la faisabilité d'établir des PDX moléculaires apocrines avec une telle technique, permettant des conditions de greffe plus physiologiques que celles des modèles de greffe en coussinet graisseux (*Fat Pad*) classiquement utilisés.

Enfin, ces travaux démontrent que des traitements ciblés peuvent être testés sur des tumeurs greffées en intracanaulaire mammaire.

## Article 1

Richard E, [Grellety T](#), Velasco V, MacGrogan G, Bonnefoi H and Iggo R.

*The mammary ducts create a favourable microenvironment for xenografting of luminal and molecular apocrine breast tumours.*

*J Pathol, 240:256-261. 2016*

## The mammary ducts create a favourable microenvironment for xenografting of luminal and molecular apocrine breast tumours

Elodie Richard, Thomas Grellety, Valerie Velasco, Gaetan MacGrogan, Hervé Bonnefoi and Richard Iggo\*

INSERM U1218, Bergonie Cancer Institute, University of Bordeaux, 33076, Bordeaux, France

\*Correspondence to: R Iggo, INSERM U1218, Bergonie Cancer Institute, 229 Cours de l'Argonne, 33076 Bordeaux, France.  
E-mail: R.Iggo@bordeaux.unicancer.fr

### Abstract

There is a paucity of models for hormone receptor-positive (HR+) breast cancer because of the difficulty of establishing xenografts from these tumours. We show that this obstacle can be overcome by injecting human tumour cells directly into the mammary ducts of immunodeficient mice. Tumours from 31 patients were infected overnight with a lentiviral vector expressing tdTomato and injected through the nipple into the mammary ducts of NOD-SCID-IL2RG<sup>-/-</sup> mice. Tumours formed in the mice in 77% of cases after the first injection (6/8 luminal A, 15/20 luminal B, and 3/3 molecular apocrine). Four luminal A and one molecular apocrine graft were tested in secondary and tertiary grafts: all were successfully passaged in secondary and 4/5 in tertiary grafts. None of the samples engrafted when injected subcutaneously. The morphology, oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), androgen receptor (AR), and Ki-67 profiles of the clinical samples were maintained in the tertiary grafts. We also show that the intraductal approach can be used to test the response to targeted therapy with fulvestrant and palbociclib, using a genetically defined ER+ model. We conclude that the mammary ducts create a microenvironment that is uniquely favourable to the survival and growth of tumours derived from mammary hormone-sensing cells. This approach opens the door to testing genomically targeted treatment of HR+ tumours in precision medicine programmes.

Copyright © 2016 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** intraductal xenograft; luminal breast cancer; molecular apocrine breast cancer; patient-derived xenograft (PDX)

Received 20 May 2016; Revised 4 July 2016; Accepted 12 July 2016

No conflicts of interest were declared.

### Introduction

Next-generation sequencing technology has the potential to transform the way that doctors manage cancer patients but initial results have been mixed, with some programmes reporting little or no benefit from the use of genomically targeted therapy [1,2]. There are many possible reasons for this, but it is difficult to investigate them without access to live cells that can be manipulated experimentally. This has driven a resurgence of interest in the xenografting of human breast tumours (reviewed in refs 3–5). Hormone receptor-positive (HR+) breast cancer is commonly divided into three groups: low proliferation oestrogen receptor-positive (ER+) luminal A tumours; high proliferation ER+ luminal B tumours; and ER-, androgen receptor-positive (AR+) molecular apocrine tumours [6–8]. The success rate with luminal B tumours has gradually risen, with some groups reporting 40% success rates [9], but successful engraftment of luminal A tumours remains extremely challenging [5,10,11]. Dan Medina's group has described a technique for the injection of human ductal carcinoma *in situ* (DCIS) cells directly into the ducts of immune-deficient

mice [12,13]. The results were excellent, with an 80% success rate for ER+ lesions. We have confirmed that the technique allows xenografting of genetically engineered ER+ tumour cells [14]. Taken together, these results suggest that the microenvironment within the ducts is uniquely favourable to the growth ER+ breast tumour cells. To test this hypothesis, we have performed intraductal injections of HR+ primary breast tumours. During the preparation of this manuscript, Brisken and co-workers reported excellent results with the intraductal approach in ER+ tumours [15]. We report here our own results which independently confirm that this approach achieves much higher rates of engraftment than were previously thought possible.

### Materials and methods

All patients were treated at the Bergonie Cancer Institute. They gave written informed consent to the use of their samples for research after inclusion in the Bergonie Institute Tumour Bank (authorization No AC-2008-812). Tumours were classified according to

the modified St Gallen 2013 criteria [8]. The immunohistochemistry (IHC) protocol and antibodies are described in the supplementary material, Supplementary materials and methods. The tumour morphology and IHC profile were analysed on paraffin sections by a specialist breast cancer pathologist (GMG).

Tumours were digested to single cells and infected overnight with a lentiviral vector expressing tdTomato and then injected through the nipple into the mammary ducts of the fourth (inguinal) mammary glands of female NSG mice (Jackson Laboratory strain number 005557) as previously described [13]. The number of mice tested and the number of cells injected for each tumour are given in the supplementary material, Table S1. Mice were sacrificed for tumour analysis and tumour passage 12 weeks after injection. A detailed protocol with additional references [16–21] is provided in the supplementary material, Supplementary materials and methods. Approval for the animal experiments was granted by the Comité d’Ethique pour l’Experimentation Animal (CEE50) ethics committee, Bordeaux (project number 5012034-A).

To test the response to therapy, normal reduction mammoplasty cells transformed by *CCND1*, *MYC*, *PIK3CA-H1047R*, *sh-p53*, *BMI1*, and *TERT* [14] were injected into the mammary ducts; animals were randomly assigned to different groups and then treated for 3 weeks with palbociclib in lactate buffer (Pfizer, New York, NY, USA), 150 mg/kg by gavage 5 days per week, or fulvestrant (AstraZeneca, London, UK), 5 mg subcutaneously weekly (or with castor oil vehicle; Sigma, St Louis, MO, USA). All mice injected with ER+ tumour cells received a subcutaneous 0.5 mg oestradiol pellet in the neck area.

## Results

We tested samples from a sequential series of 31 untreated luminal and molecular apocrine breast tumours. Figure 1 (top panels) and Figure S1 (supplementary material) show fluorescent stereomicrographs of a gland engrafted with a luminal A tumour (LA-PDX1). Table 1 summarizes the results of the primary intraductal injections. Luminal A, luminal B, and molecular apocrine tumours all gave rise to tumour foci in the ducts at unexpectedly high rates. Tumour cells from sixteen tumours that gave rise to tumour foci in the ducts were also injected subcutaneously into the flanks of NSG mice but tumour foci were not detected at any of the 26 subcutaneous injection sites (supplementary material, Table S1), even in cases where the same cells gave rise to extensive grafts following intraductal injection. The overall success rate after intraductal injection was 77%. Given the low success rate with conventional techniques, it was a surprise that 75% of luminal A tumours gave rise to foci in the ducts. Three molecular apocrine tumours were tested and all gave tumour foci in primary grafts,

suggesting that the results with this subtype will be broadly similar to those with luminal tumours. Four luminal A tumours and one molecular apocrine tumour were tested in sequential grafts: all gave tumour foci in secondary grafts and 4/5 in tertiary grafts (Table 2). To determine whether the intraductal xenografts resembled their tumours of origin, we analysed H&E and IHC sections. Figure 1 shows the H&E stain and IHC for the diagnostic specimen and the primary, secondary, and tertiary xenografts for a luminal A tumour (LA-PDX1). The keratin 7 antibody is human-specific, allowing easy identification of human cells in the mouse. The diagnostic sections show a lobular carcinoma that is ER+, PR+, E-cadherin-negative, and Ki-67 low. The results after grafting are perfectly consistent with the diagnostic results. The remaining tumours also showed preservation of the morphology and IHC profile, apart from one molecular apocrine tumour that was weakly positive for ER in the primary and secondary grafts (Table 2 and supplementary material, Figures S2–S4). We conclude that the environment within the mammary ducts permits grafting of HR+ breast tumours and preserves their morphology and IHC profile.

## Drug testing in the intraductal model

To test whether it is possible to assess the response to drugs in the intraductal model, we performed a proof-of-concept study with our genetically engineered ER+ tumour model [14]. The cells were originally transformed by cyclin D1 (*CCND1*), so we expected them to respond to palbociclib, a cdk4/6 inhibitor. They are ER+ but do not respond to fulvestrant, possibly because the cells are blocked at a step in the lineage before their growth depends on oestrogens [14]. The cells were injected into the ducts of NSG mice, allowed to form tumours for 3 weeks, and then treated with palbociclib, fulvestrant or both for 3 weeks. In this model, the cells normally start to invade between 3 and 6 weeks after injection. Figure 2 shows that treatment with fulvestrant reduced ER expression but did not inhibit tumour growth, whereas treatment with palbociclib reduced Ki-67 expression and tumour growth and abolished conversion of DCIS to invasive cancer. We conclude that the intraductal model can be used to test the response to genomically targeted therapy.

## Discussion

The main conclusion from this study is that HR+ breast tumours are able to survive in mice in the microenvironment created by the mammary ducts. Our results are perfectly consistent with those reported recently by Cathrin Brisken’s group [15]. According to the St Gallen criteria [8], only 3/10 of their tumours were luminal A, so our results more than double the number of luminal A tumours that have been successfully grafted with the intraductal technique. Four of the luminal tumours in our

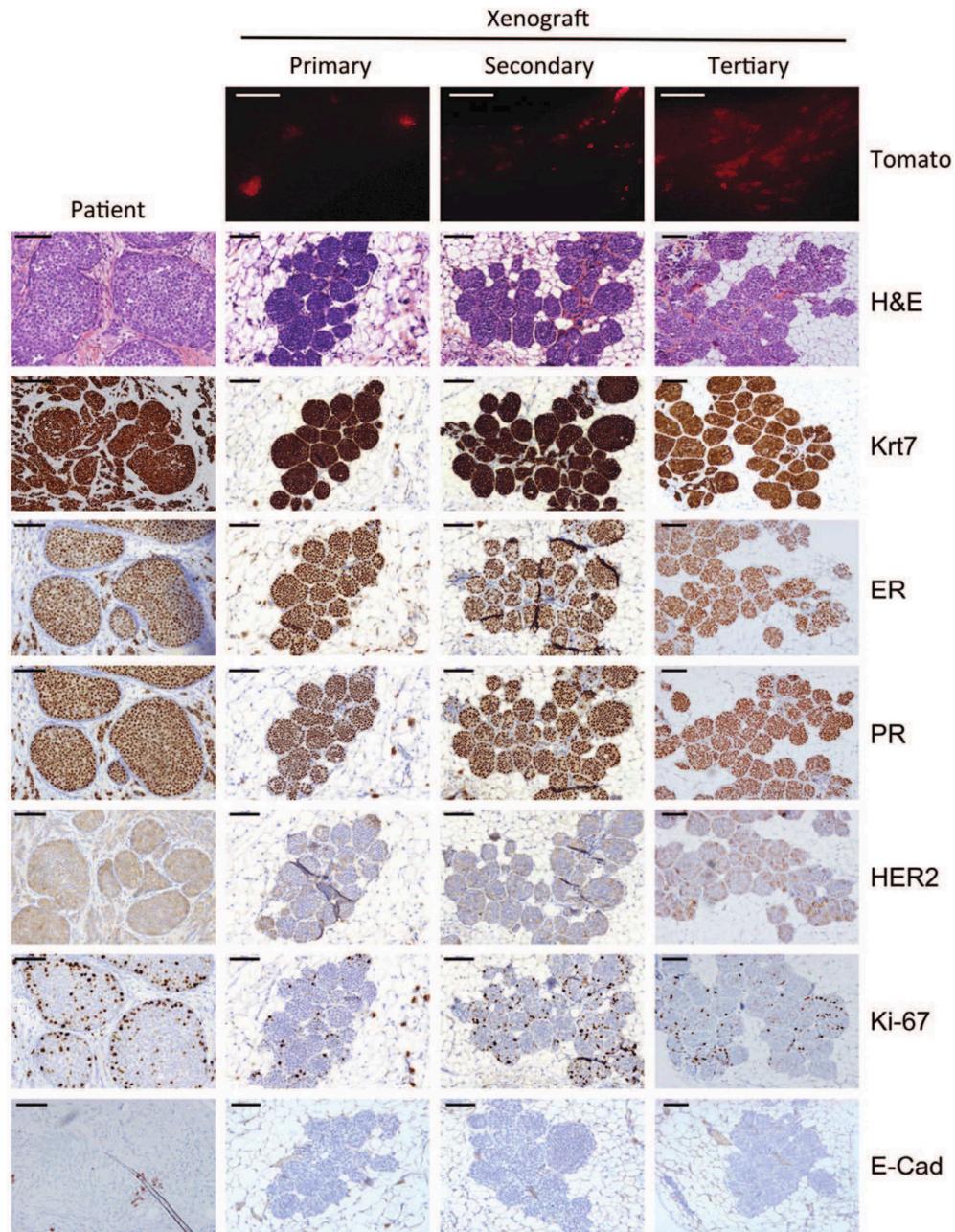


Figure 1. Luminal A tumour before and after xenografting. Luminal A tumour cells (LA-PDX1) were infected with a lentivirus expressing a red fluorescent protein (tdTomato) and then injected into the mammary ducts through the nipple of NSG mice. The panels on the left show the diagnostic specimen. The remaining panels show the primary, secondary, and tertiary grafts 12 weeks after injection. The top panels are stereomicrographs showing mouse mammary glands containing foci of tumour cells expressing tdTomato (scale bars = 2 mm); more detailed stereomicrographs for this PDX are shown in the supplementary material, Figure S1. The lower panels show that the morphology and IHC profile were preserved after grafting. The scale bars for H&E and IHC are 100  $\mu$ m. The keratin 7 antibody is human-specific.

Table 1. Tumour characteristics, patient age, and results of primary grafts. The number of tumours of each type injected intraductally and the rate of primary engraftment are shown. The number of cells injected and the number of mice tested are given in Table S1 (supplementary material)

|                 | Luminal A*    |                              | Luminal B*    |                              | Molecular apocrine* |                              |
|-----------------|---------------|------------------------------|---------------|------------------------------|---------------------|------------------------------|
|                 | Number tested | Primary graft successful (%) | Number tested | Primary graft successful (%) | Number tested       | Primary graft successful (%) |
| Total           | 8             | 6 (75)                       | 20            | 15 (75)                      | 3                   | 3 (100)                      |
| Grade 1         | 2             | 1 (50)                       | 0             | 0                            | 0                   | 0                            |
| Grade 2         | 6             | 5 (83)                       | 7             | 7 (100)                      | 1                   | 1 (100)                      |
| Grade 3         | 0             | 0                            | 13            | 8 (62)                       | 2                   | 2 (100)                      |
| IDC             | 3             | 1 (33)                       | 16            | 12 (75)                      | 3                   | 3 (100)                      |
| ILC             | 4             | 4 (100)                      | 3             | 2 (67)                       | 0                   | 0                            |
| Other type      | 1             | 1 (100)                      | 1             | 1 (100)                      | 0                   | 0                            |
| ER ≥ 10%        | 8             | 6 (75)                       | 20            | 15 (75)                      | 0                   | 0                            |
| PR ≥ 20%        | 6             | 4 (67)                       | 14            | 11 (79)                      | 0                   | 0                            |
| Ki67 < 20%      | 8             | 6 (75)                       | 3             | 2 (67)                       | 1                   | 1 (100)                      |
| HER2+†          | 0             | 0                            | 9             | 7 (78)                       | 1                   | 1 (100)                      |
| AR ≥ 10%        | NT            | NA                           | NT            | NA                           | 3                   | 3 (100)                      |
| Age < 45 years  | 3             | 2 (67)                       | 0             | 0                            | 0                   | 0                            |
| Age 45–55 years | 2             | 1 (50)                       | 11            | 9 (82)                       | 0                   | 0                            |
| Age > 55 years  | 3             | 3 (100)                      | 9             | 6 (67)                       | 3                   | 3 (100)                      |

\*Molecular apocrine if ER < 10% and AR ≥ 10%. Luminal if ER ≥ 10%. Luminal A if HER2-negative and Ki-67 < 14% or (Ki-67 14–19% and PR ≥ 20%), otherwise luminal B. NT = not tested; NA = not applicable.

†Positive according to ASCO CAP guidelines.

Table 2. Comparison of diagnostic specimens and sequential grafts. The luminal A and molecular apocrine tumours with the most extensive primary grafts were grafted sequentially. The ER, PR, HER2, and Ki-67 profile of all luminal A tumours was preserved through three rounds of grafting, except for one tumour that became PR+ and increased Ki-67 transiently. The molecular apocrine tumour was ER- in the patient sample and tertiary graft but became weakly ER+ in the primary and secondary grafts

|         | Patient specimen |        |       |           | Primary xenograft |        |       |           | Secondary xenograft |        |       |           | Tertiary xenograft |        |       |           |
|---------|------------------|--------|-------|-----------|-------------------|--------|-------|-----------|---------------------|--------|-------|-----------|--------------------|--------|-------|-----------|
|         | ER (%)           | PR (%) | HER2* | Ki-67 (%) | ER (%)            | PR (%) | HER2* | Ki-67 (%) | ER (%)              | PR (%) | HER2* | Ki-67 (%) | ER (%)             | PR (%) | HER2* | Ki-67 (%) |
| LA-PDX1 | 90               | 100    | Neg   | 20        | 100               | 100    | Neg   | 10        | 90                  | 100    | Neg   | 15        | 80                 | 100    | Neg   | 10        |
| LA-PDX2 | 100              | 100    | Neg   | 7         | 90                | 90     | Neg   | 15        | 90                  | 90     | Neg   | 15        | 80                 | 5      | Neg   | 10        |
| LA-PDX3 | 100              | 100    | Neg   | 15        | 80                | 80     | Neg   | 5         | 80                  | 80     | Neg   | 15        | NT                 | NT     | NT    | NT        |
| LA-PDX4 | 100              | 5      | Neg   | 8         | 100               | 80     | Neg   | 100       | NT                  | NT     | NT    | NT        | 100                | 100    | Neg   | 5         |

|         | Patient specimen |        |       |           | Primary xenograft |        |       |          | Secondary xenograft |        |       |          | Tertiary xenograft |        |       |          |
|---------|------------------|--------|-------|-----------|-------------------|--------|-------|----------|---------------------|--------|-------|----------|--------------------|--------|-------|----------|
|         | ER (%)           | AR (%) | HER2* | Ki-67 (%) | ER (%)            | AR (%) | HER2* | Ki67 (%) | ER (%)              | AR (%) | HER2* | Ki67 (%) | ER (%)             | AR (%) | HER2* | Ki67 (%) |
| MA-PDX1 | 0                | 100    | Pos   | 25        | 20                | 100    | Pos   | 35       | 5                   | 80     | Pos   | 25       | 0                  | 80     | Pos   | 30       |

\*Positive according to ASCO CAP guidelines.

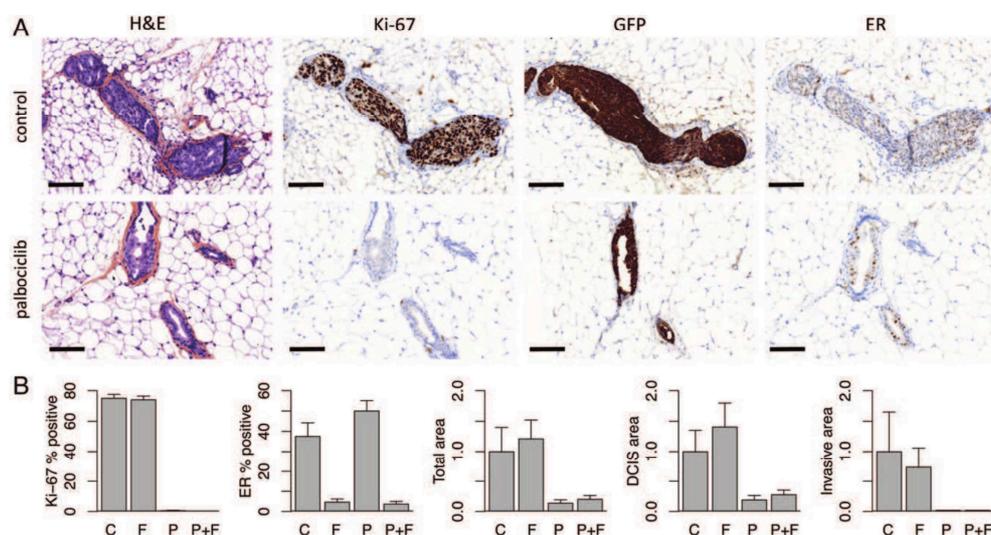
LA = luminal A; MA = molecular apocrine; NT = not tested.

study were invasive lobular carcinomas, again confirming that these tumours engraft well in the ducts.

Mechanistically, it seems likely that the main benefit from intraductal grafting is that the myoepithelial layer protects human cells from direct contact with the murine stromal microenvironment. We previously showed that human ER+ luminal cells can replace the luminal layer in the mouse ducts after intraductal injection [14]. This indicates that murine myoepithelial cells can communicate effectively with human luminal cells. In contrast, human cells cannot create a ductal tree after injection directly into the stroma unless human fibroblasts are provided, suggesting that murine fibroblasts cannot communicate effectively with human myoepithelial cells [22]. In our study, the human cells underwent squamous metaplasia when they exited the ducts and we argued that this might be caused by activation of EGFR [14,23]. The stroma also regulates mammary ductal growth through TGFβ signalling [24], and MCF7

cells have been shown to activate TGFβ signalling and undergo epithelial–mesenchymal transition (EMT) when injected into the stroma [15]. Interestingly, TGFβ receptor inhibition was recently shown to permit expansion of normal ER+ cultures *in vitro* [25], highlighting a likely requirement for the culture of HR+ breast tumours *in vitro*.

We have not tested our tumours genomically, but most studies concur on the fact that the genotype of breast tumours after grafting is similar to that of the primary tumours from which they were derived [9,26,27], although clonal competition within heterogeneous tumours is almost inevitable and has been well documented after transplantation [28]. To show that the intraductal approach can be used to test the response to targeted drugs, we tested a genetically defined model based on transformation of normal mammary cells by *CCND1* [14]. We tested palbociclib in this model because cyclin D1 activates cdk4/6, the target of the drug. Treatment



**Figure 2.** Targeted therapy with fulvestrant and palbociclib. Genetically defined ER+ tumour cells were injected into the ducts and allowed to form tumours for 3 weeks and then treated with fulvestrant or palbociclib for 3 weeks. Palbociclib inhibited Ki-67 expression and tumour growth. (A) H&E then IHC for Ki-67, GFP, and ER (scale bar = 100  $\mu$ m). GFP is a surrogate marker for the injected human cells. (B) Bar plots showing Ki-67 and ER % positive tumour cells and then total area, DCIS area, and invasive area relative to control (C, control,  $n=5$ ; F, fulvestrant,  $n=5$ ; P, palbociclib,  $n=6$ ; P + F,  $n=3$ ). Error bars are SEM. A  $t$ -test for the pre-specified end-points for tumour response gave  $p=0.0022$  and  $0.0066$  for the total area,  $p=0.0034$  and  $0.0073$  for the DCIS area, and  $p=0.0005$  and  $0.019$  for the invasive area (C versus P; F versus P + F, respectively). The ER response to fulvestrant gave  $p<0.02$ ; the Ki-67 response to palbociclib gave  $p<0.0001$ ; the other comparisons were not significant.

with palbociclib abrogated Ki-67 expression, dramatically reduced the DCIS area, and abolished conversion of DCIS to invasive cancer (Fig. 2). It is inherent in the approach that an effective drug will block progression of DCIS to invasive ductal carcinoma (IDC) but the striking effect does raise the question of whether palbociclib, a relatively non-toxic targeted therapy, might find a place in the treatment of DCIS.

The disappointing initial results with genomically guided therapy [1,2] point to the need for functional testing of genomic predictions before applying them in the clinic. Drug treatment of intraductal PDX could solve this problem but the workload, complexity, and mouse burden are so great that clinical application of functional testing will remain a niche activity until methods for *in vitro* culture catch up with the *in vivo* models. The intraductal grafting results highlight the importance of paracrine signalling in the mammary gland [29,30], provide important clues to the requirements for growth of luminal A cells, and suggest that future *in vitro* culture systems should aim to reproduce the ductal microenvironment.

### Acknowledgements

We thank Pfizer for supplying palbociclib under the Compound Transfer Program ([http://www.pfizer.com/research/rd\\_partnering/compound\\_transfer\\_program](http://www.pfizer.com/research/rd_partnering/compound_transfer_program)).

Copyright © 2016 Pathological Society of Great Britain and Ireland.  
Published by John Wiley & Sons, Ltd. [www.pathsoc.org](http://www.pathsoc.org)

We thank Alban Giese (Histology Platform, University of Bordeaux) for scanning the slides and Benoit Rousseau (Animalerie A2, University of Bordeaux) for supplying and caring for the mice. We thank the 'Fondation pour la lutte contre le cancer et pour des recherches medico-biologiques', the IDEX-FAC2014-INCa-DGOS-INSERM 6046 SIRIC BRIO grant, and the French Cancer League (Comité de la Charente Maritime) for financial support.

### Author contribution statement

ER performed viral and animal experiments. VV and ER performed IHC. GMG provided tissue and analysed sections. ER, TG, and RI chopped and froze tissue. TG obtained consent. RI, HB, and GMG supervised the work. RI conceived the study and wrote the manuscript. All authors saw and approved the final version of the manuscript.

### References

- Andre F, Bachelot T, Commo F, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol* 2014; **15**: 267–274.
- Le Tourneau C, Delord JP, Goncalves A, et al. Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional

*J Pathol* 2016; **240**: 256–261  
[www.thejournalofpathology.com](http://www.thejournalofpathology.com)

- therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; **16**: 1324–1334.
3. Landis MD, Lehmann BD, Pietenpol JA, *et al.* Patient-derived breast tumor xenografts facilitating personalized cancer therapy. *Breast Cancer Res* 2013; **15**: 201.
  4. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, *et al.* Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 2014; **4**: 998–1013.
  5. Whittle JR, Lewis MT, Lindeman GJ, *et al.* Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res* 2015; **17**: 17.
  6. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; **406**: 747–752.
  7. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, *et al.* Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; **24**: 4660–4671.
  8. 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* 2014; **16**: R65.
  9. 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* 2012; **135**: 415–432.
  10. Cottu P, Marangoni E, Assayag F, *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.
  11. du Manoir S, Orsetti B, Bras-Goncalves R, *et al.* Breast tumor PDXs are genetically plastic and correspond to a subset of aggressive cancers prone to relapse. *Mol Oncol* 2014; **8**: 431–443.
  12. Valdez KE, Fan F, Smith W, *et al.* Human primary ductal carcinoma *in situ* (DCIS) subtype-specific pathology is preserved in a mouse intraductal (MIND) xenograft model. *J Pathol* 2011; **225**: 565–573.
  13. Behbod F, Kittrell FS, LaMarca H, *et al.* An intraductal human-in-mouse transplantation model mimics the subtypes of ductal carcinoma *in situ*. *Breast Cancer Res* 2009; **11**: R66.
  14. Verbeke S, Richard E, Monceau E, *et al.* Humanization of the mouse mammary gland by replacement of the luminal layer with genetically-engineered preneoplastic human cells. *Breast Cancer Res* 2014; **16**: 504.
  15. Sfomos G, Dormoy V, Metsalu T, *et al.* A preclinical model for ER $\alpha$ -positive breast cancer points to the epithelial microenvironment as determinant of luminal phenotype and hormone response. *Cancer Cell* 2016; **29**: 407–422.
  16. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, *et al.* A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 2009; **4**: e6529.
  17. Duss S, Andre S, Nicoulaz AL, *et al.* An oestrogen-dependent model of breast cancer created by transformation of normal human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res* 2007; **9**: R38.
  18. Iggo R, Richard E. Lentiviral transduction of mammary epithelial cells. In *Methods in Molecular Biology: Mammary Stem Cells*, Vivanco MdM (ed). Humana Press: New York, 2015; 137–160.
  19. Ince TA, Richardson AL, Bell GW, *et al.* Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer Cell* 2007; **12**: 160–170.
  20. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001; **23**: 291–299.
  21. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, *et al.* Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 2011; **103**: 1656–1664.
  22. Kuperwasser C, Chavarría T, Wu M, *et al.* Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 4966–4971.
  23. Pasic L, Eisinger-Mathason TS, Velayudhan BT, *et al.* Sustained activation of the HER1–ERK1/2–RSK signaling pathway controls myoepithelial cell fate in human mammary tissue. *Genes Dev* 2011; **25**: 1641–1653.
  24. Daniel CW, Robinson S, Silberstein GB. The role of TGF- $\beta$  in patterning and growth of the mammary ductal tree. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1996; **1**: 331–341.
  25. Fridriksdottir AJ, Kim J, Villadsen R, *et al.* Propagation of oestrogen receptor-positive and oestrogen-responsive normal human breast cells in culture. *Nature Commun* 2015; **6**: 8786.
  26. Zhang X, Claerhout S, Prat A, *et al.* A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res* 2013; **73**: 4885–4897.
  27. Li S, Shen D, Shao J, *et al.* Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. *Cell Rep* 2013; **4**: 1116–1130.
  28. Eirew P, Steif A, Khattra J, *et al.* Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution. *Nature* 2015; **518**: 422–426.
  29. Rosen JM, Roarty K. Paracrine signaling in mammary gland development: what can we learn about intratumoral heterogeneity? *Breast Cancer Res* 2014; **16**: 202.
  30. Brisken C, O'Malley B. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**: a003178.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

### Supplementary materials and methods

### Supplementary figure legends

**Figure S1.** Mouse mammary gland showing LA-PDX1 primary xenograft

**Figure S2.** Images of additional luminal A primary xenografts

**Figure S3.** Images of additional luminal B primary xenografts

**Figure S4.** Images of additional molecular apocrine primary xenografts

**Table S1.** Number of cells injected intraductally and subcutaneously

## **Supplementary materials and methods**

### **Intraductal injection**

All patients were treated at the Bergonie Cancer Institute. The pathologist placed a fragment of untreated tumour not required for diagnostic use in DMEM/F12 (Gibco-ThermoFisher, Waltham, MA, USA) with penicillin/streptomycin (Gibco-ThermoFisher). The fragment was chopped to 1 mm<sup>3</sup> fragments with scalpels, digested in 10 ml 1 mg/ml Collagenase A (Roche-Sigma, St Louis, MO, USA) in DMEM/F12 with penicillin/streptomycin at 37° for 3-16 h depending on the hardness of the tissue, washed twice in PBS 2% FCS and frozen in 10% DMSO in Cryo3 (5617, StemAlpha, 69610 Saint Genis, France). Intraductal injections were only performed when viable cells were recovered after freezing. It was possible to recover viable cells in 31/38 (82%) of cases. Failure was commoner early in the study when tumours were not digested sufficiently; recovery is better when the tumour organoids can be easily pipetted with a P1000 tip. After thawing, the organoids were digested at 37 °C for 2 min with 0.25% trypsin (Gibco-ThermoFisher), then with 5 mg/ml DNase (Roche-Sigma) and 5mg/ml dispase (Gibco-ThermoFisher) for 2 min, pipetted against the side of the tube to break up clumps, 2% calf serum in PBS was added, the cells were passed through a 70 µm cell strainer (Falcon, Corning-ThermoFisher) and plated on 6 cm Primaria plates (Corning-ThermoFisher) at 300,000 cells/ml in svWIT medium [14, 19].

The lentiviral vector (pER305) expresses tdTomato from the PGK promoter in pLenti PGK Blast DEST (w524-1, Addgene 19065) [16]. Lentivirus was produced by transfection of 293T cells [18]. The tumour cell suspension was infected at a multiplicity of infection of 10 and incubated overnight at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>. The cells were then washed to remove virus and resuspended in svWIT before intraductal injection. A 30 gauge Hamilton syringe of 50µl capacity, with a blunt-ended 1/2-inch needle was used to deliver the cells. The mice were anaesthetised using isoflurane, and an abdominal Y-incision was made to allow the skin covering the inguinal mammary glands to be peeled back to expose the fourth glands of female NSG mice (Jackson Laboratory strain number 005557). The nipple of the inguinal gland was snipped so that the needle could be directly inserted through the nipple. Tumour cells were resuspended in 10 µl of cell-culture medium with 1% patent blue dye (Sigma) to allow verification of successful injection by visual inspection. The skin was closed with surgical clips. Subcutaneous injections were performed in the flank. The number of cells injected is given in Supplementary Table S1 (it ranged from 60 000 to 750 000 cells).

Approval was granted for the animal experiments by the Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale (CEEA50) ethics committee, Bordeaux (project number 5012034-A). The study was performed in accordance with European Community Standards of Care and Use of Laboratory Animals under level 2 containment (animal house authorization number A33063916). Based on preliminary experiments, we decided to use mice aged 6-8 wk, to inject the tumour cells without fibroblasts or Matrigel, to inject the largest possible number of cells, and to insert a 0.5 mg subcutaneous oestradiol pellet in the neck area as previously described [17]. Engrafted mammary glands were harvested 12 wk after intraductal injections and either fixed in 3.7% buffered formaldehyde for IHC, or regrafted. To regraft the tumours the regions containing red fluorescent foci were dissected under a stereomicroscope, digested with collagenase for 20 min then dissociated to single cells as described above, and reinjected into the ducts. Sequential grafting was performed every 12 wk. Stereomicrographs were acquired with a Leica MZ-FLIII fluorescence stereomicroscope.

### **Histology and immunohistochemistry**

Paraffin-embedded tissue was sectioned at 4 µm, deparaffinized and boiled in pH 6.0 citrate buffer to retrieve antigens. Immunohistochemical staining was performed on a Benchmark-ULTRA (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) according to the manufacturer's protocol with the following antibodies: ERα (SP1, Ventana, 32 min, pre-diluted), progesterone receptor (1E2, Ventana, 12 min, pre-diluted), keratin 7 (SP52, Ventana, 32 min, pre-diluted), Ki67 (30-9, Ventana, 32 min, pre-diluted), GFP (B-2, Santa Cruz sc-9996, 32 min, 1:1000), E-cadherin (EP700Y, Ventana, 12 min, pre-diluted), HER2 (4B5, Ventana, 16 min, pre-diluted) and AR (SP107, Ventana, 32 min, pre-diluted). In these conditions the keratin 7 and ER antibodies are human specific [14]. High quality images were made with a Zeiss MIRAX slide scanner. Zeiss .mrxs files were converted into .tif files (225 million pixels per section, 0.62 µm<sup>2</sup> per pixel) with Panoramic Viewer 1.15 (3DHISTECH, Budapest, Hungary). Total tumour area was calculated by automated image recognition by QuantaCell (www.quantacell.com, Pessac, France) as follows. GFP staining with diaminobenzidine (DAB) was used to identify the tumour cells. Colour deconvolution to identify DAB-positive cells (brown) was performed with the algorithm in [20]. The total area in the brown channel was summed after background subtraction, elimination of objects less than 1000 pixels and infill of spaces under 5000 pixels. One section was scanned per gland. The number of mice in each group was 5 (control), 5 (fulvestrant), 6 (palbociclib) and 3 (palbociclib + fulvestrant). Tumour morphology, IHC, DCIS area and IDC area were scored by a specialist breast cancer

pathologist (GMG). DCIS and IDC area were calculated from the product of the largest and smallest diameters of each tumour focus measured individually in Pannoramic Viewer. The Pearson correlation for measurement of total area by the pathologist versus QuantaCell is 0.97. Tumours were classified according to the modified St Gallen criteria [8]: luminal if ER was  $\geq 10\%$ , subdivided into luminal A if HER2 was negative and [Ki-67  $< 14\%$  or [Ki-67 14-19% and PR  $\geq 20\%$ ]], otherwise luminal B. They were classified as molecular apocrine if ER was  $< 10\%$  and AR was  $\geq 10\%$ . HER2 was classified according to American Society of Clinical Oncology College of American Pathologists IHC guidelines, with FISH in equivocal cases. Ki-67 was scored as described in [21] by counting at least 1000 tumour nuclei per sample after staining with anti-Ki-67 antibody.

## Supplementary figure legends

**Figure S1.** Mouse mammary gland showing LA-PDX1 primary xenograft. Stereomicrographs showing white light (top panel) and red fluorescence (lower panels). The upper panels show an entire mouse mammary gland. The lower panels show progressive enlargements of the central region of the gland. The red balls are clusters of cells within the ducts. Each cluster contains several hundred cells. This is a different mouse from the one shown in Figure 1 but the phenotype is the same. Adipocytes overlying the tumour cells act as spherical lenses that degrade the image. Scale bars from top: 3 mm, 3 mm, 800  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ .

**Figure S2.** Images of additional luminal A primary xenografts. Mice were sacrificed 12 weeks after intraductal injection of the tumour cells. PDXs were examined by H&E and IHC for the indicated proteins. Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ .

**Figure S3.** Images of additional luminal B primary xenografts. Mice were sacrificed 12 weeks after intraductal injection of the tumour cells. PDXs were examined by H&E and IHC for the indicated proteins. Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ .

**Figure S4.** Images of additional molecular apocrine primary xenografts. Mice were sacrificed 12 weeks after intraductal injection of the tumour cells. PDXs were examined by H&E and IHC for the indicated proteins. Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ .

Figure S1

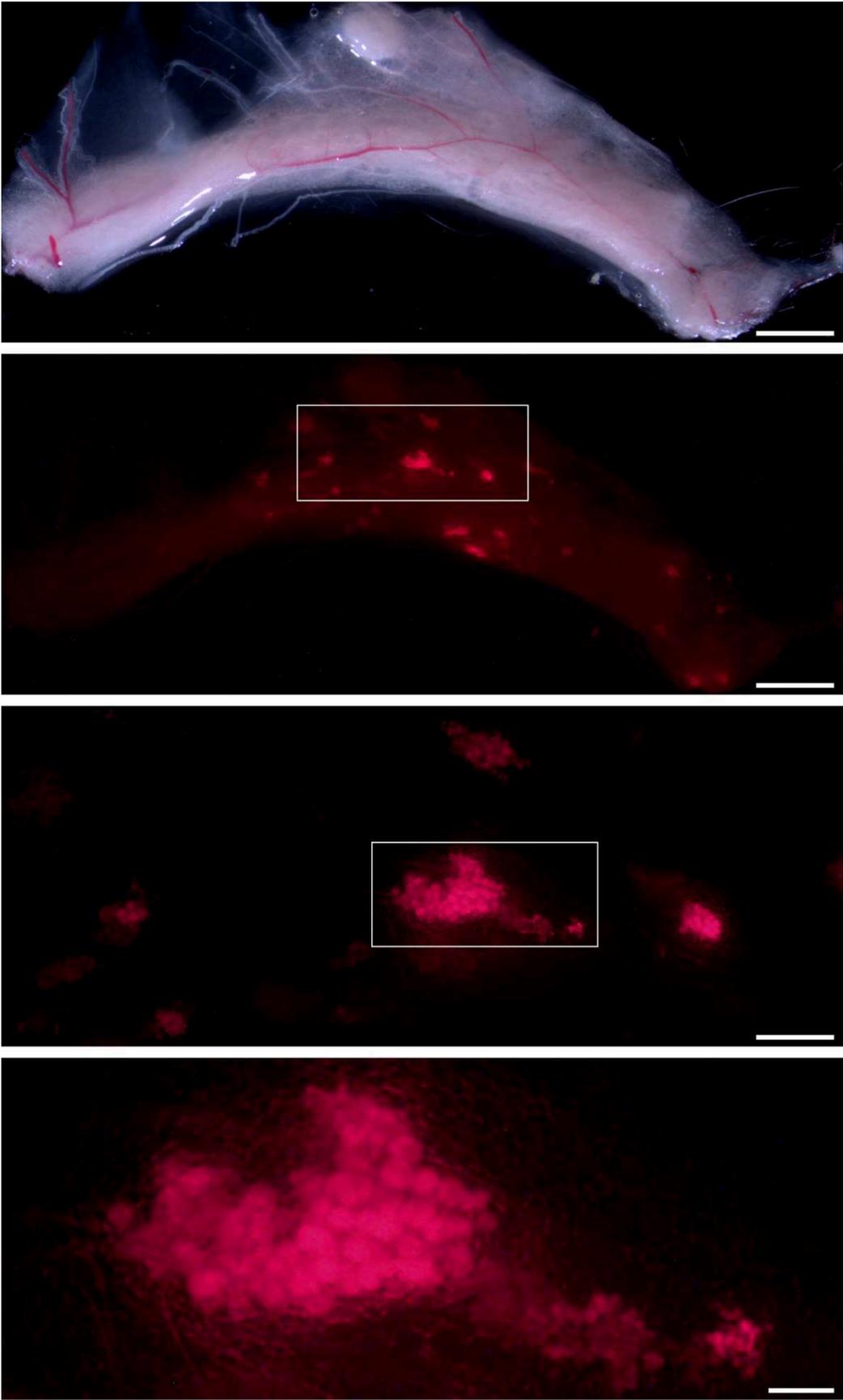
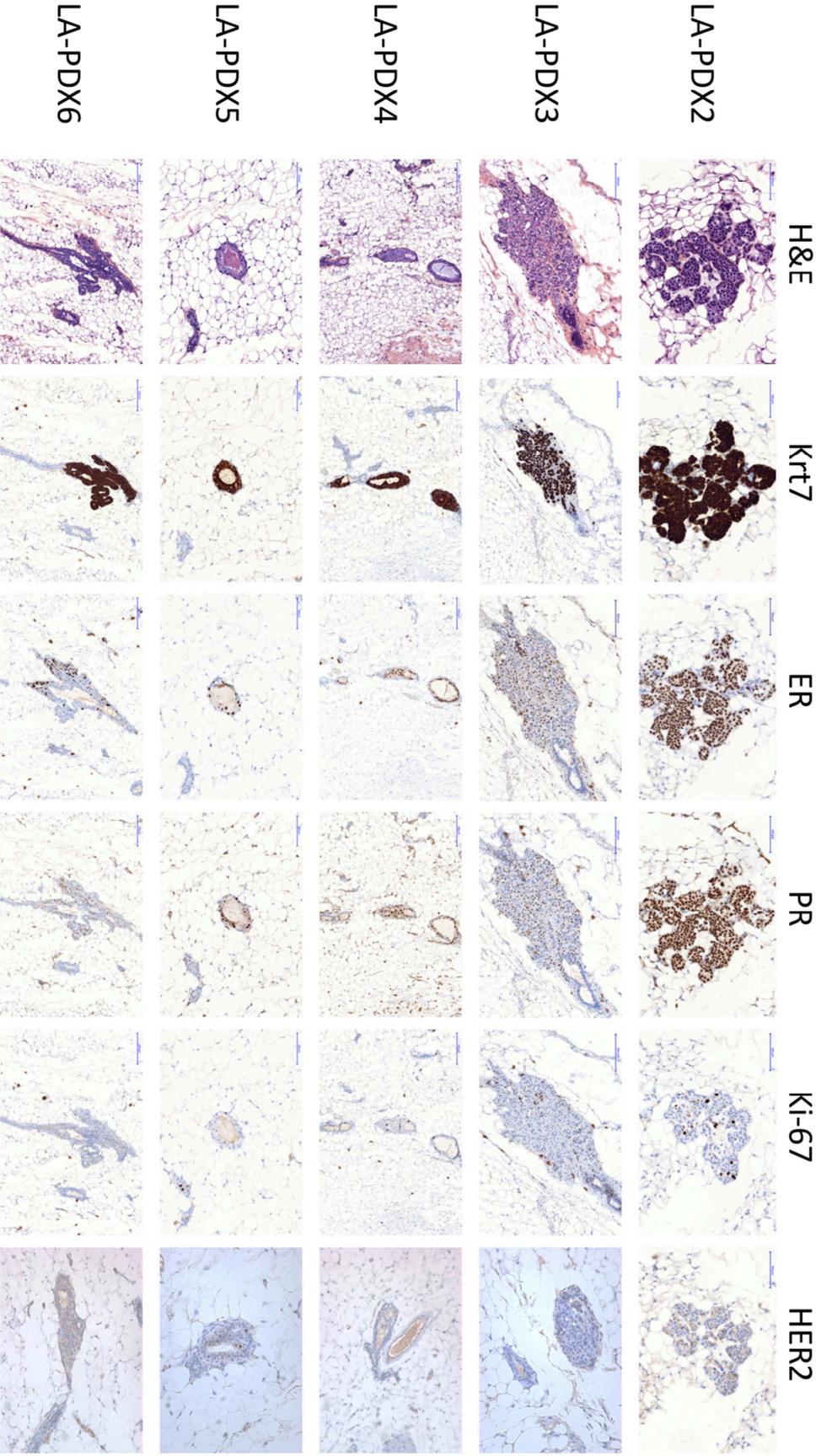


Figure S2



**Figure S3**

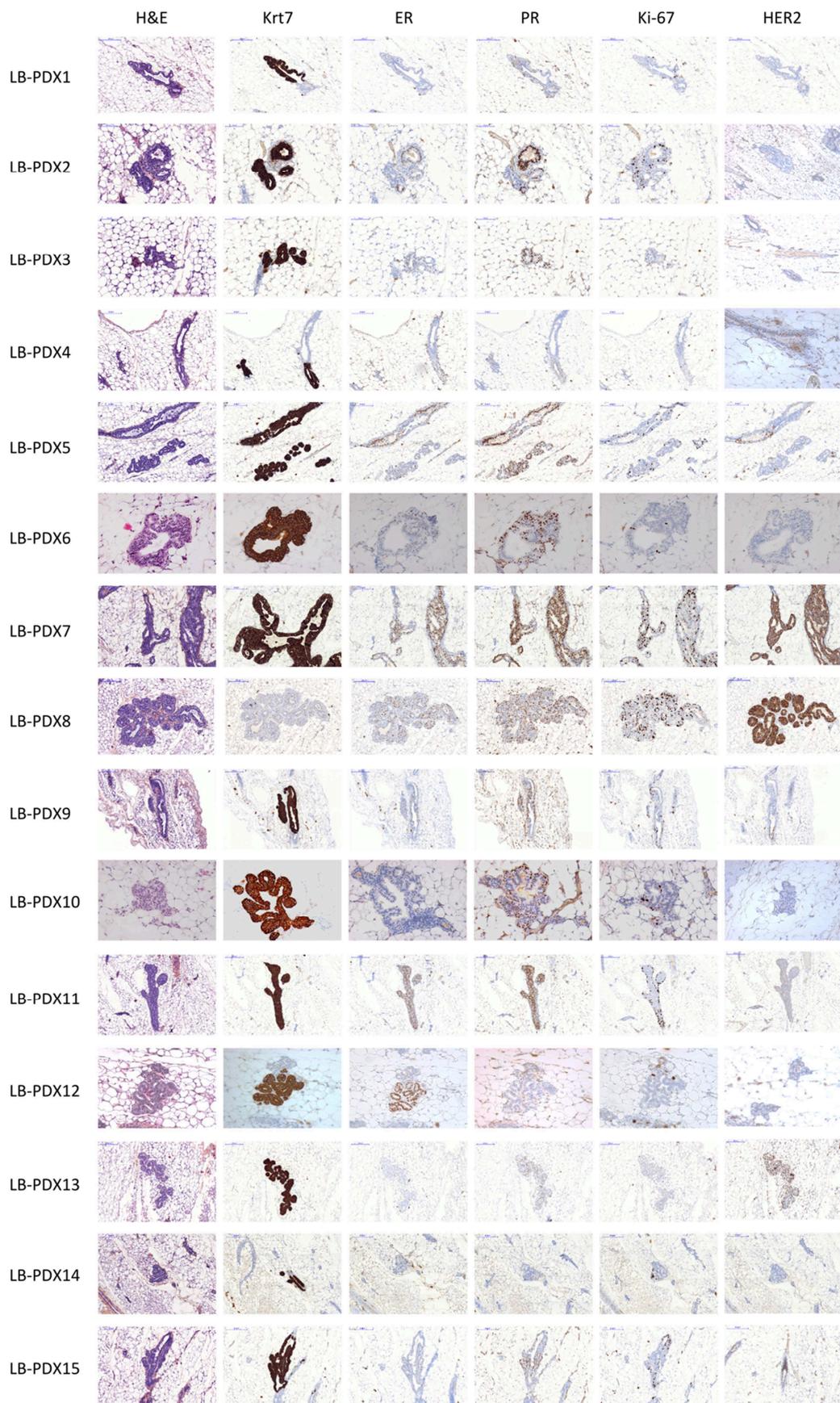
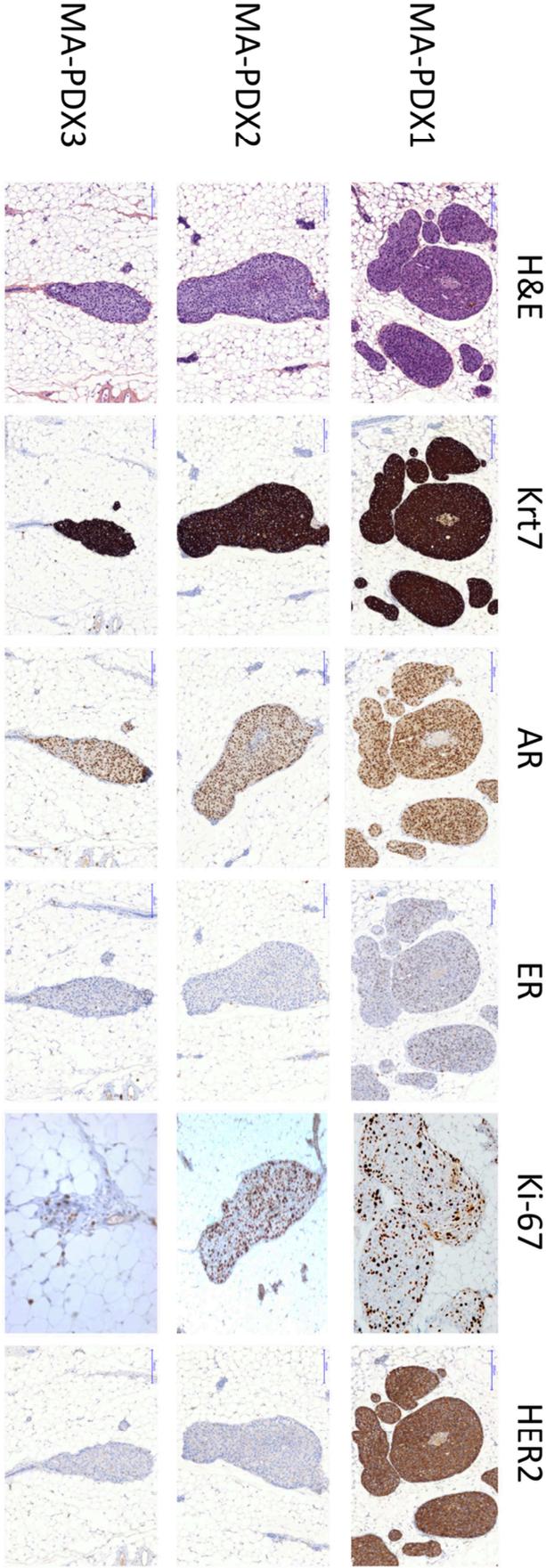


Figure S4



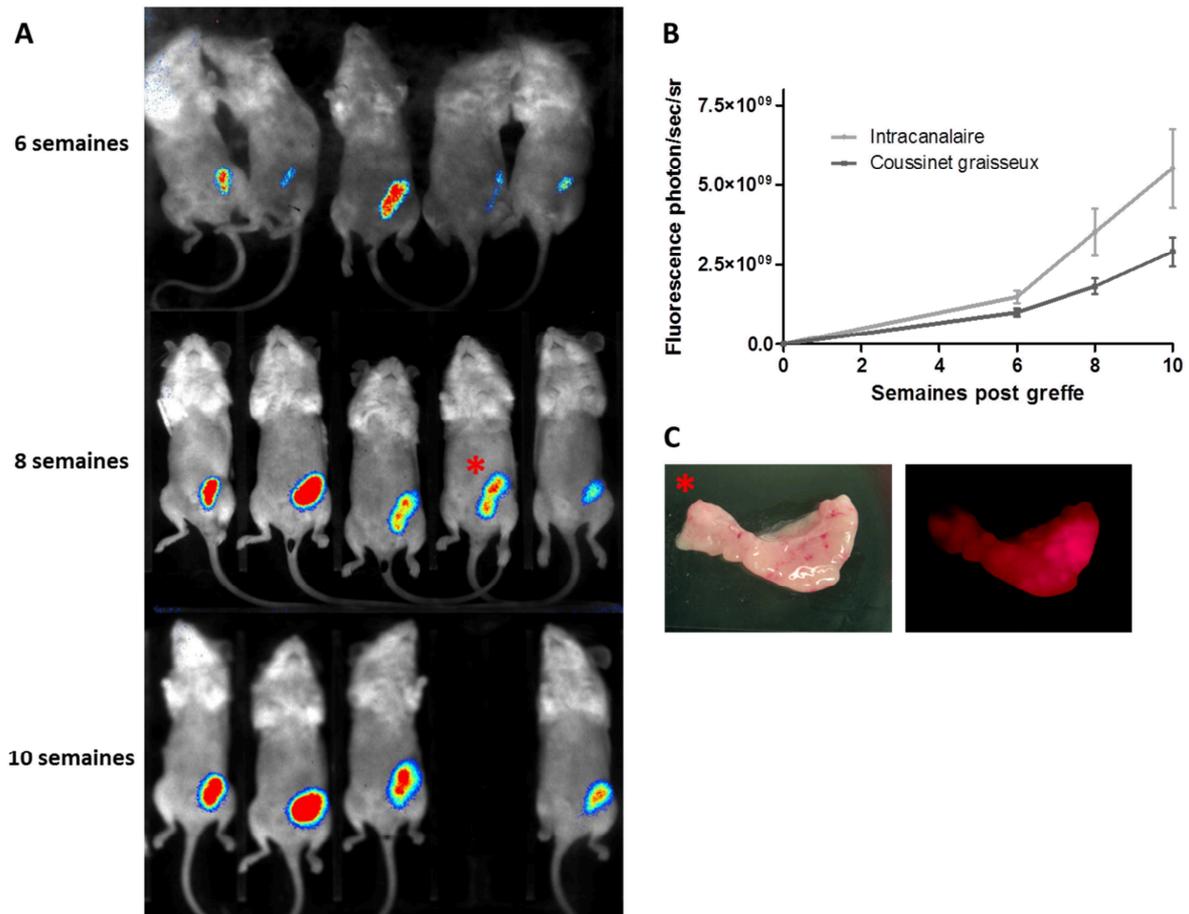
**Table S1**

| <b>Table S1. Number of cells injected intraductally and subcutaneously</b> |                               |                         |              |  |
|--|-------------------------------|-------------------------|--------------|--|
| The number of mice injected with each technique is shown.                  |                               |                         |              |  |
| PDX name   | Number of cells per injection | Number of mice injected |              |  |
|  |                               | Intraductal             | Subcutaneous |  |
| LA-PDX1  | 690 000                       | 7                       | 3            |  |
| LA-PDX2  | 500 000                       | 3                       | 1            |  |
| LA-PDX3  | 350 000                       | 5                       | 0            |  |
| LA-PDX4  | 575 000                       | 6                       | 2            |  |
| LA-PDX5  | 140 000                       | 2                       | 0            |  |
| LA-PDX6  | 230 000                       | 2                       | 1            |  |
|  |                               |                         |              |  |
| LB-PDX1  | 140 000                       | 2                       | 0            |  |
| LB-PDX2  | 410 000                       | 3                       | 2            |  |
| LB-PDX3  | 470 000                       | 3                       | 2            |  |
| LB-PDX4  | 150 000                       | 2                       | 0            |  |
| LB-PDX5  | 650 000                       | 4                       | 2            |  |
| LB-PDX6  | 210 000                       | 2                       | 1            |  |
| LB-PDX7  | 185 000                       | 2                       | 0            |  |
| LB-PDX8  | 280 000                       | 3                       | 1            |  |
| LB-PDX9  | 540 000                       | 3                       | 2            |  |
| LB-PDX10   | 760 000                       | 7                       | 2            |  |
| LB-PDX11   | 200 000                       | 2                       | 1            |  |
| LB-PDX12   | 260 000                       | 2                       | 1            |  |
| LB-PDX13   | 60 000                        | 1                       | 0            |  |
| LB-PDX14   | 180 000                       | 2                       | 1            |  |
| LB-PDX15   | 225 000                       | 3                       | 1            |  |
|  |                               |                         |              |  |
| MA-PDX1  | 750 000                       | 8                       | 3            |  |
| MA-PDX2  | 95 000                        | 2                       | 0            |  |
| MA-PDX3  | 90 000                        | 2                       | 0            |  |
|  |                               |                         |              |  |
| Total  |                               | 78                      | 26           |  |

## Résultats (suite)

Nous avons effectué des tests complémentaires afin de comparer la technique d'injection intracanaulaire mammaire de cellules tumorales établies MDA-MB-453 à l'injection dans le coussinet graisseux dit en *fat pad* avec apport exogène d'androgènes. Ces expériences nous ont permis de définir quel était le meilleur site de greffe à envisager avec la lignée MDA-MB-453 afin de l'utiliser pour notre deuxième projet ; projet pour lequel l'utilisation des PDX n'était pas réalisable logistiquement.

La lignée MDA-MB-453 transfectée avec un lentivirus d'expression de la Tomato (vecteur pER305 exprimant tdTomato avec promoteur PGK dans un pLenti PGK Blast DEST (w524-1, Addgene 19065) (293) a été utilisée dans le but de suivre l'évolution tumorale par Photon-Imager chez la souris (figure 16). Cette expérience a permis de démontrer que la prise de greffe et la croissance mesurée par fluorescence étaient plus importantes en intracanaulaire qu'au niveau du coussinet graisseux. Nous avons mis en évidence la faisabilité de suivre la croissance tumorale par fluorescence alors même que les mesures directes par un pied à coulisse ne sont pas réalisables du fait de tumeurs se développant à l'intérieur des glandes mammaires.

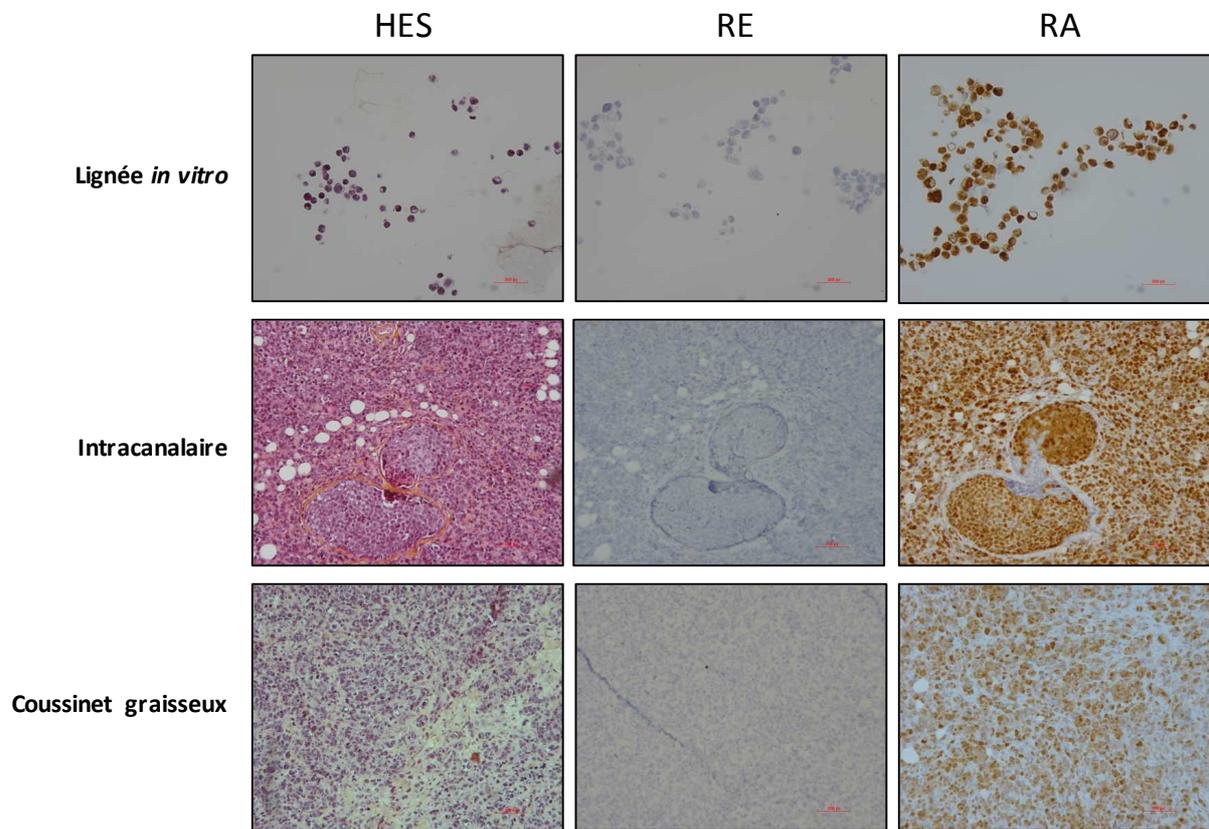


**Figure 16. Suivi de croissance de la prise de greffe de la lignée MDA-MB-453.**

**A.** Visualisation du marquage Tomato de la lignée MDA-MB-453 par Photon-imager entre 6 et 10 semaines post-greffe intracanalairre mammaire. **B.** Courbe de suivi comparatif de fluorescence (photon/sec/sr) entre les 2 techniques de greffe, intracanalairre et coussinet grasiseux (*fat pad*), moyenne et erreur-type, N=6 par groupe. **C.** Exemple de glande mammaire (souris\*) au sacrifice ; photographie faite en stéréomicroscopie (x1,2) retrouvant une glande massivement envahie (8 semaines post-greffe).

L'analyse histologique des tumeurs greffées en intracanalairre retrouve un envahissement canalaire mais également un franchissement des canaux, signifiant le caractère invasif de ces tumeurs (rupture de la continuité du marquage CK14 en IHC) tout en respectant le phénotype initial de la lignée (RE-, RA+) (figure 17). Les tumeurs ainsi formées présentent beaucoup plus de ressemblance avec une tumeur humaine dans son évolution locale que les tumeurs dans les coussinets grasiseux

qui forment simplement un nodule tumoral dans du tissu graisseux murin sans rapport à priori avec le micro-environnement.



**Figure 17. Immunohistochimie comparative entre lignée MDA-MB-453 cultivée *in vitro* et tumeurs *in vivo* au sacrifice après 8 semaines de greffe intracanaulaire versus coussinet graisseux (*fat pad*).**

Echelle, 100µM. HES : hématoxyline éosine safran; RE : récepteurs estrogènes; RA : récepteurs aux androgènes.

Ces résultats ont validé l'intérêt de réaliser les expériences *in vivo* par la méthode d'injection intracanaulaire. Ces résultats confortent les données de notre publication de modèle de PDX de tumeurs moléculaires apocrines à partir de tumeurs humaines, décrit dans l'article 1 de cette thèse (Robert E, Grellety T, et al. *The mammary ducts create a favourable microenvironment for xenografting of luminal and molecular apocrine breast tumours. J Pathol, 2016*).

## **Projet 2**

**Etude ancillaire de l'essai clinique UCBG 12-1 :**

**Recherche de facteurs prédictifs de réponse à  
l'abiratérone et recherche de cibles thérapeutiques**

## Résumé des travaux effectués

### 1. Contexte

Les tumeurs moléculaires apocrines sont définies par certaines caractéristiques morphologiques histologiques des tumeurs mammaires dites apocrines ainsi que des profils d'expression compatibles avec une signalisation androgénique prééminente, ce qui les différencie des autres tumeurs RE-négatives (les tumeurs basales) (32,36). Il a récemment été démontré que les lignées cellulaires de tumeurs moléculaires apocrines présentent une cartographie des gènes cibles du RA très analogue à celle de cancer de la prostate (154). L'ensemble de ces données biologiques produit un rationnel fort pour cibler la voie des androgènes dans les carcinomes moléculaires apocrines mammaires, en se basant sur des molécules déjà approuvées dans les cancers de prostate. De plus, il y a un besoin important de définir de nouvelles options thérapeutiques étant donné que ces tumeurs présentent un taux de rechute métastatique d'environ 30% à 5 ans (37). Actuellement, dans cette situation, les seuls traitements ayant une autorisation de mise sur le marché sont des chimiothérapies aux résultats souvent limités.

À ce jour, trois essais évaluant des traitements anti-androgènes ont été rapportés avec des résultats prometteurs : deux d'entre eux utilisent des antagonistes du RA et le troisième cible directement la synthèse des androgènes (123,241,242). Notre groupe a choisi de supprimer directement la synthèse des androgènes au lieu de cibler le RA dans l'essai UCBG 12-1. Cet essai multicentrique de phase II chez des femmes atteintes d'un cancer du sein triple négatif RA-positif localement avancé métastatique ou inopérable, a été conçu pour évaluer l'efficacité et l'innocuité de l'acétate d'abiratérone associé à la prednisone (123). Les résultats de cet essai montrent un taux de bénéfice clinique à 6 mois de 20,0% (intervalle de confiance 95% : 7,7%-38,6%), comprenant 1 réponse complète, 1 réponse partielle et 4 stabilités persistant 6 mois ou plus. Le bénéfice apparaît cliniquement significatif pour une patiente sur cinq.

## 2. Résultats

Les objectifs de ce deuxième projet nécessitaient la définition d'hypothèse biologique. Pour ce faire nous avons étudiés le cas d'une patiente en réponse complète sous abiratérone dans l'essai UCBG12-1. Les analyses de la tumeur de cette patiente en réponse complète d'une rechute métastatique sous abiratérone depuis plus de 4 ans ont mis en évidence plusieurs pistes permettant de mieux identifier les patientes en réponse à l'abiratérone.

Ainsi, cette tumeur présente des caractéristiques apocrines histologiques majeures avec une forte positivité en IHC des marqueurs FOXA1, GGT1 et GCDFP15. Son profil génomique est peu remanié et retrouve une mutation activatrice de *PIK3CA* sans mutation délétère de *TP53*.

L'importance de la durée de cette réponse à l'abiratérone est les pistes biologiques décrivent ont été publiées afin d'attester de l'intérêt majeur d'un tel traitement chez des patientes dont la sélection reste néanmoins à améliorer.

## Article 2

Grellety T, MacGrogan G, Chakiba C, Kind M and Bonnefoi H.

*Long term complete response of an androgen receptor-positive triple-negative metastatic breast cancer to abiraterone acetate.*

*JCO Precision Oncology, 2018*

# Long-Term Complete Response of an Androgen Receptor–Positive Triple-Negative Metastatic Breast Cancer to Abiraterone Acetate

## INTRODUCTION

Several gene expression array studies have identified a new breast cancer subtype characterized by the expression of the androgen receptor (AR), absence of the estrogen receptor  $\alpha$  (ER), and paradoxical expression of many genes that are typically expressed in ER-positive luminal tumors.<sup>1,3</sup> Two thirds of this tumor subtype are human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive. The remainder are HER2 negative, part of the triple-negative breast cancer (TNBC) group, and the focus of this report. These AR-positive and triple-negative tumors have been identified as a stable subtype in two series of TNBCs.<sup>4,5</sup> Of note, AR is also expressed in approximately 75% of ER-positive/HER2-negative breast cancers.<sup>6</sup> However, clinical and preclinical data suggest that ARs act as a tumor suppressor gene in ER-positive tumors and as an oncogene in ER-negative tumors.<sup>7</sup>

In both retrospective series<sup>8</sup> and prospective clinical trials,<sup>9-11</sup> the following immunohistochemistry (IHC) definition is classically used to identify this breast cancer subtype: AR positive and ER, progesterone receptor (PR) negative, and HER2 negative. There is no universal consensus on defining AR positivity to date, although the accepted definition of AR positivity is  $\geq 10\%$ .

Preclinical *in vitro*<sup>2,12-14</sup> and *in vivo*<sup>14,15</sup> data suggest that androgens are involved in the development and growth of the MDA-MB-453 cell line, which is used as an *in vitro* model for the AR-positive TNBC subtype.<sup>2</sup> Consequently, in three prospective clinical trials, either competitive antagonists of the AR (bicalutamide or enzalutamide) or androgen synthesis suppressor, CYP17 inhibitor (abiraterone acetate, AA), were evaluated in AR-positive TNBCs. Clinical

benefit rates (CBR) at 6 months ranging from 19% to 29% with an excellent tolerability profile were reported.<sup>9-11</sup> A few objective responses were also reported: one complete response (CR) in a case report,<sup>16</sup> five partial responses and two CRs in the enzalutamide trial,<sup>10</sup> and one partial response and one CR in the abiraterone trial.<sup>11</sup> Here, we report the case of a patient who was part of recently published<sup>11</sup> Unicancer Breast Group (UCBG) 2012-1 trial (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01842321), who is in a long-term complete response after 4 years on AA treatment.

## PATIENT CONSENT

This patient is a participant of an ethics committee-approved phase II trial (Committee for Patient Protection, Bordeaux, France) and consented to that report. Clinical data and tumor tissue biomarkers were obtained as part of this trial's preplanned ancillary study.

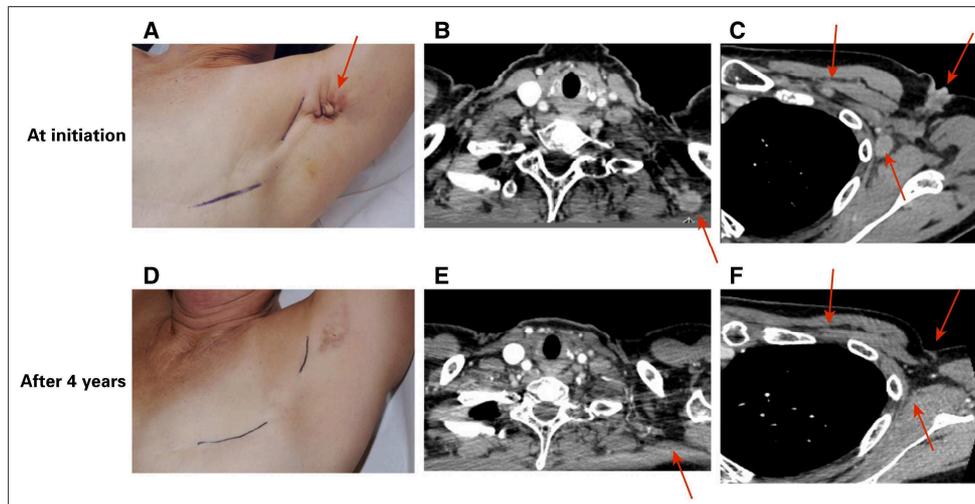
## CASE REPORT

In March 2006, a 55-year-old postmenopausal woman was diagnosed with a cT2cN1M0 left breast cancer. The initial Tru-Cut biopsy specimen showed an ER-, PR-, and HER2-negative grade 2 invasive ductal breast carcinoma. She received neoadjuvant chemotherapy (three cycles of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide followed by three cycles of docetaxel) followed by mastectomy and axillary lymph node dissection (level 1 and 2). The tumor was then classified ypT1ypN1, with two out of eleven axillary nodes involved. She underwent chest wall, ipsilateral supraclavicular, and internal mammary chain radiotherapy. A few months earlier, in January 2006, the patient was diagnosed with

Thomas Grellety  
Gaetan MacGrogan  
Camille Chakiba  
Michele Kind  
Hervé Bonnefoi

Author affiliations and support information (if applicable) appear at the end of this article.

**Corresponding author:**  
Thomas Grellety, MD,  
Institut Bergonié, 229  
cours de l'Argonne,  
Bordeaux, Aquitaine  
33000, France; e-mail:  
t.grellety@bordeaux.  
unicancer.fr.



**Fig 1.** Comparative image and computed tomography scan (A-C) before, and (D-F) after 4 years of abiraterone acetate and prednisolone treatment. The arrows show the index masses with changes with therapies.

multiple sclerosis and administered interferon at a dose of 30 µg per week.

In November 2007, the patient was diagnosed with an ipsilateral axillary lymph node relapse without distant metastasis. She underwent a complete surgical excision of a 13-mm lymph node involving a TNBC. No further treatment was proposed.

In July 2013, she presented with a 4-cm left axillary mass with skin involvement (Fig 1A) and two supraclavicular 1-cm lymph nodes; a core biopsy of the axillary mass confirmed TNBC, with a proliferation index (Ki-67) of 15%. All tumor cells (100%) were AR positive as determined by IHC. On the computed tomography scan (Figs 1B and 1C), in addition to the axillary mass, several chest soft tissue masses were observed; no visceral or bone metastasis was observed. The patient was included in the UCBG 2012-1 trial and received experimental treatment with 1,000 mg of AA and 10 mg of prednisone administered orally, daily. After 2 months, there were no specific toxicities, and the patient showed a partial response. Ten months after the treatment initiation, clinical and computed tomography scan evaluations showed that the patient achieved a CR (on the basis of the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors criteria). After 4 years, the patient is still receiving the treatment with AA and low-dose prednisone, with a prolonged

CR (Figs 1D-1F). Concomitantly, she has been receiving interferon treatment for multiple sclerosis.

Further IHC analyses later performed on the 2006 mastectomy and the 2007 axillary relapse showed that 100% of cells were AR positive. Furthermore, IHC analyses on additional markers in the 2013 axillary relapse confirmed a pronounced apocrine feature with marked forkhead box A1 and gross cystic disease fluid protein 15 expression. Next-generation sequencing of the 2007 axillary relapse revealed only the classic PI3KCA H1047R mutation without TP53 mutation and no other targetable alteration. Genome-wide copy number analysis using OncoScan (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) on this formalin-fixed tumor sample confirmed the lack of ERBB2 amplification; the loss of heterozygosity of *PTEN*, *CDKN2A*, *TP53*, and *MAP2K4*; and no *FGFR* or *CCND1* amplification.

## DISCUSSION

In patients with metastatic AR-positive TNBCs treated with antiandrogens, a limited number of CRs have been reported either as case reports<sup>16</sup> or in the context of prospective trials.<sup>10,11</sup> To our knowledge, this is the first report of a patient with this tumor subtype with a long-term CR on a new-generation antiandrogen treatment.

**Table 1.** Ongoing Clinical Trials on AR-Positive Triple Negative Breast Cancer in Metastatic Setting

| Antiandrogen           | Single Agent   | Combination  |
|------------------------|--|--|
| AR antagonist          | Enzalutamide (phase III, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02929576, withdrawn)  | Bicalutamide plus CDK4/6 inhibitor ribociclib (phase I/II, ClinicalTrials.gov identifier: NCT03090165, recruiting)   |
|                        | Bicalutamide v chemotherapy (phase III/first line, ClinicalTrials.gov identifier: NCT03055312, recruiting)                       | Bicalutamide plus CDK4/6 inhibitor palbociclib (phase I/II, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02605486, recruiting)  |
|                        | Darolutamide v chemotherapy (randomized phase II, first and second line, ClinicalTrials.gov identifier: NCT03383679, recruiting) | Enzalutamide plus PI3K $\alpha$ inhibitor alpelisib (phase I, ClinicalTrials.gov identifier: NCT03207529, not yet recruiting) or plus PI3K $\alpha$ inhibitor taselisib (phase I/II, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02457910, recruiting) |
| CYP17A1 inhibitors     | Orteronel (TAK-700; phase II, ClinicalTrials.gov identifier: NCT01990209, recruiting)  |  |
|                        | Seviteronel (phase I/II, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02580448, recruiting)   |  |
| Selective AR modulator | CR1447 (phase II, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02067741, recruiting)  | Enobosarm plus pembrolizumab (phase II, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02971761, recruiting)  |
|                        | Enobosarm (phase II, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02368691, terminated)   |  |

Abbreviations: AR, androgen receptor; CDK, cyclin-dependent kinase; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase.

From a clinician's perspective, the CBRs at 6 months (19% to 29%) observed in this breast cancer subtype in the three prospective trials testing AR antagonist or androgen synthesis inhibitor are modest but clinically relevant. The first question is how to identify these patients in the clinic among the other TNBCs. Patients with AR-positive TNBCs seem to be older compared with the whole TNBC population.<sup>9-11,17</sup> They also tend to relapse after a long interval after the primary tumor treatment. In these patients whose tumors behave more like luminal ER- and/or PR-positive tumors, AR status needs to be determined. Given the efficacy results, antiandrogen treatment could be considered up front, preferentially in the context of a clinical trial (Table 1) or outside. In our opinion, in AR-positive TNBCs, treatment choice between antiandrogens and chemotherapy could take into account different factors, including disease-free interval, tumor burden, and the need for rapid disease/symptom control, similar to luminal ER- and/or PR-positive tumors. Of note, it is important to remember that progression-free survival for first-line chemotherapy is merely 4 to 6 months.<sup>18,19</sup>

From a researcher's perspective, CBRs at 6 months with antiandrogens in this tumor subtype are much lower than those observed with anti-aromatase inhibitors used as single agents

in luminal ER- and/or PR-positive cancers. In the latter group, the historical CBRs range from 49% to 59% for first-line and from 24% to 37% for second-line treatments, respectively.<sup>20</sup> Hence, there is a need to improve these results in AR-positive TNBCs, and we briefly outline four key areas that could be improved.

First, IHC is probably not ideal to identify this breast cancer subtype. In the three prospective trials,<sup>9-11</sup> AR positivity was defined as  $\geq 10\%$ , although there is no consensus. Of note, in the enzalutamide trial,<sup>10</sup> patients with low AR (1% to 9%) were included in an exploratory cohort, and some of these patients responded. In two large series of TNBCs analyzed by gene expression array, 11% and 17% of tumors were AR positive.<sup>4,5</sup> In a TNBC series analyzed by IHC, 22% to 35% of patients were AR positive.<sup>8</sup> It is difficult to explain this difference. Hence, there is a need to better identify this subtype in clinical practice, for example, by using RNA signatures with a selected number of transcripts.<sup>5</sup>

Second, predictors of antiandrogen treatment sensitivity in this breast cancer subtype should be developed. A response predictor (PREDICT AR) using next-generation RNA sequencing from the enzalutamide trial has shown promising results.<sup>21</sup> A full publication of this study is warranted before drawing any conclusions.

Third, there is a need to better understand AR-positive TNBC androgen dependency by going back to the bench. New preclinical models are needed; the reliability of the MDA-MB-453 cell line has been in question because of genomic alterations, such as AR mutation.<sup>22,23</sup> This AR Q865H mutation in its ligand-binding domain is reported to decrease sensitivity to dihydrotestosterone, limiting its use to test antiandrogen therapy.<sup>22</sup> A new patient-derived xenograft model of molecular apocrine tumors, directly derived from patients, could be a solution.<sup>24</sup>

Finally, we need better drugs and combinations. Ongoing trials on AR-positive TNBCs (Table 1) should help identify better treatments. Of note, our patient was cotreated with interferon for multiple sclerosis. To the best of our knowledge,

there are no data available on the potential role of interferon treatment in AR-positive TNBCs. However, both enzalutamide and abiraterone have shown to improve the sensitivity of TNBC cell lines toward immune-mediated lysis, providing potential rationale for combination of immunotherapy with antiandrogen therapy.<sup>25</sup>

In conclusion, we believe that this patient's case is important for clinicians. It demonstrates long-term efficacy of antiandrogen treatment and should stimulate further research in this specific tumor subtype.

DOI: <https://doi.org/10.1200/PO.17.00223>  
Published online on [ascopubs.org/journal/po](http://ascopubs.org/journal/po) on February 13, 2018.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Conception and design:** Thomas Grellety, Hervé Bonnefoi  
**Provision of study material or patients:** Hervé Bonnefoi  
**Collection and assembly of data:** Thomas Grellety, Gaetan MacGrogan, Michele Kind, Hervé Bonnefoi  
**Data analysis and interpretation:** Thomas Grellety, Camille Chakiba, Hervé Bonnefoi  
**Manuscript writing:** All authors  
**Final approval of manuscript:** All authors  
**Accountable for all aspects of the work:** All authors

**Gaetan MacGrogan**  
**Honoraria:** Genentech  
**Consulting or Advisory Role:** Genentech  
**Speakers' Bureau:** Genentech  
**Travel, Accommodations, Expenses:** Genentech

**Camille Chakiba**  
No relationship to disclose

**Michele Kind**  
No relationship to disclose

**Hervé Bonnefoi**  
**Consulting or Advisory Role:** AbbVie, Astellas Pharma, Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Innocrin Pharmaceuticals, Puma Biotechnology  
**Research Funding:** Bayer (Inst)  
**Travel, Accommodations, Expenses:** Roche, Pfizer

#### AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to [www.asco.org/rwc](http://www.asco.org/rwc) or [ascopubs.org/po/author-center](http://ascopubs.org/po/author-center).

**Thomas Grellety**  
**Consulting or Advisory Role:** Novartis

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Ravi Nookala, PhD, of Institut Bergonié for the medical writing service.

#### Affiliations

**Thomas Grellety** and **Hervé Bonnefoi**, Institut Bergonié Unicancer, Université Bordeaux, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1218, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale CIC1401; and **Thomas Grellety**, **Gaetan MacGrogan**, **Camille Chakiba**, **Michele Kind**, and **Hervé Bonnefoi**, Institut Bergonié, Bordeaux, France.

#### Support

Supported by the Fondation pour la lutte contre le cancer pour les recherches medico-biologiques, Site de Recherche Intégrée sur le Cancer-Bordeaux Recherche Intégrée Oncologie, and Groupement Interrégional de Recherche Clinique et d'Innovation Sud-Ouest Outre-Mer Grant No. API-K, GRCI-SOHO 2015. Janssen-Cilag contributed to the UCBG 2012-1 study with an educational grant to Unicancer and by providing abiraterone acetate. The sponsor of the UCBG 12-1 trial (Unicancer) designed and coordinated the trial.

## REFERENCES

1. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al: Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 24:4660-4671, 2005
2. Doane AS DM, Danso M, Lal P, et al: An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 25:3994-4008, 2006
3. Guedj M, Marisa L, de Reynies A, et al: A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene* 31:1196-1206, 2012
4. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al: Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 121:2750-2767, 2011
5. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, et al: Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 21:1688-1698, 2015
6. Vera-Badillo FE, Templeton AJ, de Gouveia P, et al: Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 106:djt319, 2014
7. Hickey TE, Robinson JL, Carroll JS, et al: Minireview: The androgen receptor in breast tissues: Growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? *Mol Endocrinol* 26:1252-1267, 2012
8. McNamara KM, Yoda T, Takagi K, et al: Androgen receptor in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 133:66-76, 2013
9. Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, et al: Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 19:5505-5512, 2013
10. Traina TA, Miller K, Yardley DA, et al: Results from a phase 2 study of enzalutamide (ENZA), an androgen receptor (AR) inhibitor, in advanced AR+ triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; abstr 1003)
11. Bonnefoi H, Grellety T, Tredan O, et al: A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). *Ann Oncol* 27:812-818, 2016
12. Birrell SN, Bentel JM, Hickey TE, et al: Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:459-467, 1995
13. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, et al: PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res* 16:406, 2014
14. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, et al: Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res* 16:R7, 2014
15. Ni M, Chen Y, Lim E, et al: Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell* 20:119-131, 2011
16. Arce-Salinas C, Riesco-Martinez MC, Hanna W, et al: Complete response of metastatic androgen receptor-positive breast cancer to bicalutamide: Case report and review of the literature. *J Clin Oncol* 34:e21-e24, 2016
17. Gelmon K, Dent R, Mackey JR, et al: Targeting triple-negative breast cancer: Optimising therapeutic outcomes. *Ann Oncol* 23:2223-2234, 2012
18. O'Shaughnessy J, Schwartzberg L, Danso MA, et al: Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 32:3840-3847, 2014
19. Miles DW, Diéras V, Cortés 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

20. Smith IE, Dowsett M: Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med* 348:2431-2442, 2003
21. Parker JS, Peterson AC, Tudor IC, et al: A novel biomarker to predict sensitivity to enzalutamide (ENZA) in TNBC. *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; abstr 1083)
22. Moore NL, Buchanan G, Harris JM, et al: An androgen receptor mutation in the MDA-MB-453 cell line model of molecular apocrine breast cancer compromises receptor activity. *Endocr Relat Cancer* 19:599-613, 2012
23. Vranic S, Gatalica Z, Wang ZY: Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. *Oncol Lett* 2:1131-1137, 2011
24. Richard E, Grellety T, Velasco V, et al: The mammary ducts create a favourable microenvironment for xenografting of luminal and molecular apocrine breast tumours. *J Pathol* 240:256-261, 2016
25. Kwilas AR, Ardiani A, Gameiro SR, et al: Androgen deprivation therapy sensitizes triple negative breast cancer cells to immune-mediated lysis through androgen receptor independent modulation of osteoprotegerin. *Oncotarget* 7:23498-23511, 2016

## Résultats (suite)

En partant des pistes biologiques issues de l'étude de notre cas de réponse complète à l'abiratérone, nous avons recherché des facteurs prédictifs potentiels de réponse à l'Abiratérone à partir des extractions ARN, ADN et de la réalisation d'un TMA (immunohistochimies) sur les blocs tumoraux FFPE des patientes incluses dans l'essai clinique (Annexe 5 et 6). Deux groupes de patientes sont considérées en fonction de leurs réponses au traitement selon les critères de l'étude (non-progression à 6 mois de traitement, patientes répondeuses et non-répondeuses).

Un score immunohistochimique basé sur 4 marqueurs apocrines (RA, FOXA1, GGT1 et GCDFP15, *IHC4 apocrine score*) a été identifié comme discriminant les patientes en fonction de leurs réponses. Par ailleurs, le profil génomique des patientes en réponse retrouve un taux important de mutation *PIK3CA* et un taux faible de mutation *TP53*. Les patientes répondeuses présentent ainsi des tumeurs répondant très fortement à la définition initiale des tumeurs moléculaires apocrines.

La deuxième partie de ce travail a consisté à rechercher des cibles potentielles pour améliorer l'efficacité de l'abiratérone. L'analyse transcriptomique des tumeurs des patientes traitées par l'abiratérone a mis en évidence 31 gènes différentiellement exprimés entre répondeuses et non répondeuses (FDR<5%). Neuf d'entre eux sont liés à la prolifération et à la réparation des dommages à l'ADN et sont tous réprimés chez les répondeuses (dont *CHEK1*) corroborés à une expression IHC du KI67 faible chez ces répondeuses versus les non-répondeuses.

*CHEK1* ayant été identifié comme réprimé chez les répondeuses, nous avons établi une collaboration avec le laboratoire GENENTECH (MTA ID: OR-216276, Annexe 7) pour obtenir un inhibiteur de Chk1 actuellement à l'essai chez l'Homme en phase 1. Nous avons mis en évidence que la combinaison abiratérone plus inhibiteur de Chk1 induit de manière spécifique un effet additif et/ou synergique sur la réduction de viabilité cellulaire, l'accumulation de cassure double brin de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de mort cellulaire sur la lignée MDA-MB-453. Cet effet a été confirmé par un second inhibiteur de Chk1, ainsi que sur une deuxième lignée cellulaire moléculaire apocrine (SUM185PE) avec un effet au minimum additif de ces

combinaisons. Ces résultats ont été validés par expérience *in vivo* définissant ainsi le rationnel scientifique d'un futur essai thérapeutique de combinaison par abiratérone et inhibiteur de Chk1.

### Article 3

**Grellety T**, Callens C, Richard E, Briaux A, Velasco V, Pulido M, Gncalves A, Gestraud P, MacGrogan G, Bonnefoi H and Cardinaud B.

Enhancing abiraterone acetate efficacy in androgen receptor-positive triple negative breast cancer: Chk1 as a potential target

*Clinical cancer Research, Under Review (CCR 18-1469)*

## **Enhancing abiraterone acetate efficacy in androgen receptor-positive triple negative breast cancer: Chk1 as a potential target**

Grellety T<sup>1,2,3</sup>, Callens C<sup>4</sup>, Richard E<sup>1</sup>, Briaux A<sup>4</sup>, Velasco V<sup>1,5</sup>, Pulido M<sup>6</sup>, Gonçalves A<sup>7</sup>, Gestraud P<sup>8</sup>, MacGrogan G<sup>1,5</sup>, Bonnefoi H<sup>1,2,3</sup>, Cardinaud B<sup>1,9</sup>

<sup>1</sup>INSERM UNIT U1218, Institut Bergonié, Bordeaux, France;

<sup>2</sup>University of Bordeaux, Bordeaux, France;

<sup>3</sup>Department of Medical Oncology, Institut Bergonié, Comprehensive Cancer Centre Bordeaux, France;

<sup>4</sup>Pharmacogenomic Unit, Genetics Laboratory, Institut Curie, Paris, France;

<sup>5</sup>Department of Pathology, Institut Bergonié, Comprehensive Cancer Centre Bordeaux, France;

<sup>6</sup>Clinical and Epidemiological Research Unit, Institut Bergonié, INSERM CIC1401, Bordeaux, France.

<sup>7</sup>Department of Medical Oncology, Institut Paoli-Calmettes, 232 Boulevard de Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France.

<sup>8</sup>Institut Curie, PSL Research university, Mines Paris Tech, Bioinformatics and Computational Systems Biology of Cancer, INSERM U900, F-75005 Paris, France;

<sup>9</sup>Bordeaux Institut National Polytechnique, Bordeaux, France.

**Running title:** Abiraterone and Chk1 inhibitor in AR-positive TNBC

**Key words:** breast cancer; androgen receptor-positive triple negative breast cancer; abiraterone acetate; Chk1; apocrine features

### **Corresponding Author:**

**Thomas Grellety, MD**

INSERM UNIT U1218 and Department of Medical Oncology,  
Institut Bergonié, Comprehensive Cancer Centre Bordeaux,  
229, cours de l'Argonne  
33076 BORDEAUX,  
FRANCE

Phone: +33556333279 ; Fax: +33547306061

t.grellety@bordeaux.unicancer.fr

## **Statement of translational relevance**

Androgen receptor (AR)-positive triple negative breast cancer (TNBC) could be targeted by different antiandrogens, including abiraterone, albeit with limited clinical benefits. Detection of apocrine marker expression, and tumor RNA and DNA analysis allowed identification of a subset of AR-positive TNBCs with pronounced apocrine features, in which abiraterone showed clinical benefit. If validated on a larger cohort, this would be useful to better select patients who could benefit from the treatment. In addition, using differentially expressed genes in responders and non-responders, we demonstrated that Chk1 inhibition improves abiraterone efficacy in vitro (measurements on two AR-positive TNBC cell lines) and in vivo. This could be a rationale for clinical trials evaluating Chk1 inhibitor plus antiandrogen combination in AR-positive TNBCs.

## Abstract

**Purpose:** Our aim was to identify predictive factors of abiraterone acetate (AA) efficacy and putative new druggable targets in androgen receptor (AR)-positive triple-negative breast cancer (TNBC) treated in the UCBG 2012-1 trial.

**Experimental Design:** We defined AA response as either complete or partial response, or stable disease at 6 months. Using Ampliseq, we sequenced 91 general and breast cancer-associated genes from the tumor DNA samples. We analyzed transcriptomes from the extracted RNA samples on a Nanostring platform and performed immunohistochemistry (IHC) on tumor samples using tissue microarrays. We assessed AA and CHK1 inhibitors (GDC-0575 and AZD7762) efficacies, either alone or in combination, on cell lines grown in vitro and in vivo.

**Results:** Classical IHC apocrine markers, including AR, FOXA1, GGT1 and GCDFP15, allowed identifying AA responders and non-responders. All responders have clear apocrine features. Transcriptome analysis revealed that 31 genes were differentially expressed in the two subgroups, 9 of them being linked to proliferation and DNA damage repair. One of the most significant differences was the overexpression in non-responders of CHEK1, a gene encoding Chk1, a protein kinase that can be blocked by specific inhibitors. In vitro, AA and Chk1 inhibitor combination showed additive or slightly synergistic effect on cell viability, cell cycle, apoptosis and accumulation of DNA damages. In vivo, orthotopic xenograft experiments confirmed the efficacy of this combination therapy.

**Conclusions:** This study suggests that apocrine features can be helpful in the identification of AA-responders. We identified Chk1 as a putative drug target in AR-positive TNBCs.

## Introduction

Gene expression array (GEA) studies identified a breast cancer subtype characterized by the expression of the androgen receptor (AR) and the absence of the estrogen receptor  $\alpha$  (ER) (1–3). These tumors were identified "molecular apocrine" (MA) as they have increased androgen signaling and some morphological hallmarks of apocrine tumors (1). These tumors could either be human epidermal growth receptor 2 (HER2) positive or negative. In this report we focus on the latter, that are part of the triple negative breast cancer (TNBC) group (4,5).

Although this subtype has been identified by GEA, the following immunohistochemistry (IHC) definition is classically used in prospective clinical trials to identify these tumors: AR-positive and ER, progesterone receptor (PR) and HER2-negative. The cut-off retained for AR-positivity by the three clinical trials published so far is  $\geq 10\%$  (6–8). Based on this IHC definition, the frequency of AR-positive TNBC in early breast cancer series ranges from 22-35.9% of TNBC (9,10).

Preclinical data show androgen-dependent growth of the classical AR-positive TNBC subtype model, the MDA-MB-453 cell line (2,11,12). Three clinical trials assessed AR-antagonists (bicalutamide or enzalutamide) and an androgen synthesis inhibitor (abiraterone acetate, AA) in patients with metastatic AR-positive TNBC (6–8). In these trials, clinical benefit rates (CBR) at 6 months range from 19-29% with excellent toxicity profiles (6–8). Seven and two objective responses were reported in the enzalutamide and in the AA trial, respectively (7,8). The complete response (CR) obtained with AA is still ongoing after 4 years of treatment (13). However, the majority of patients with AR-positive TNBC do not benefit from anti-androgen treatment.

Therefore, we decided to perform an ancillary study using samples from patients included in the UCBG 12-1 trial with the aim to identify: (i) predictive markers of response to AA; (ii) new druggable targets.

We believe that this study is a good example of translational research. First, using tumor samples from patients, we identified CHEK1 as one of the most underexpressed genes in the responders group. This gene belongs to the DNA Damage Repair (DDR) pathway and codes for Chk1 protein, a serine/threonine kinase, essential for the maintenance of genomic integrity. Thus, Chk1 could be a potential new target in AR-positive TNBC. Second, we went back to bench and showed that in vitro AA combined with Chk1 inhibitors (AZD7762 and GDC0575) led to synergistic or additive effects. Moreover, anti-tumor activity of AA is enhanced when combined with GDC-0575 in an orthotopic xenograft.

## Material and methods

### Study design, eligibility and treatment

This ancillary study was a planned analysis within the UCBG 12-1 trial. Patients eligible for the UCBG 12-1 trial were women with metastatic or un-resectable locally advanced breast cancer centrally assessed as AR-positive ( $\geq 10\%$ ), ER, PR negative

( $\geq 10\%$ ) and HER2 negative (0 or 1+ in IHC, 2+ IHC with negative FISH), on a formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor sample (from the primary tumor or a metastasis). Treatment with AA (1000 mg once a day) was administered orally on a continuous daily schedule plus prednisone (5 mg twice a day). This treatment continued until disease progression or unacceptable toxicity. The primary endpoint was the CBR, defined as the proportion of patients presenting either a CR, a partial response (PR), or a stable disease (SD) at 6 months.

For the sub-study that is the subject of this report, a subgroup of the UCBG 12-1 trial initial population was included based on the following criteria: (i) patients eligible and evaluable for treatment efficacy defined as having received at least one complete cycle of treatment and at least disease assessment recorded at 8 weeks from the start of the treatment; (ii) patients for whom tumor material showed more than 20% of tumor cells (supplementary Fig. S1).

Responders were defined as patients whose tumor achieved a clinical benefit at 6 months (CR, PR, SD  $\geq 6$  months.). Non-responders were defined as patients whose tumor progressed before 6 months of abiraterone treatment.

A cohort of patients for whom the central pathology assessment showed an AR-negative TNBC (ineligible patients) was included in the immunohistological part of this sub-study. These patients have consented for IHC central review and additional research on their samples.

The trial was registered at ClinicalTrials.gov (NCT01842321) and approved by a national ethics committee (CPP Bordeaux) and by local institutional review board of all participating centers. Before registration, all patients signed an informed consent for the trial and for research on tumor samples collected.

### **Histopathological assessment**

FFPE tumor samples were collected for central pathology assessment before inclusion in the clinical trial. Tumor cellularity was assessed by a senior pathologist (GMG) on an H&E slide. For each case, three different areas with cellularity of more than 20% were isolated, one for tissue microarray (TMA) drilling, one for DNA extraction, and one for RNA extraction.

### **Construction of tissue microarrays, immunohistochemical methods and interpretation**

Three representative triplicates spots of 1mm cores of tumor FFPE tissue were taken for TMA construct. TMAs were produced using a Tissue Arrayer MiniCore 3 (Excilone). When surgical specimens were not available, samples were analyzed on whole sections of Tru-Cut biopsies. Immunohistochemistry was performed on 4 $\mu$ m-thick paraffin-embedded tissue sections. Slides were treated on Benchmark@ULTRA (Ventana) with UltraView Universal DAB (760-500) detection kit.

A total of 15 apocrine features or cancer-associated markers were assessed: AR, FOXA1, GCDFP15, GGT1, L1CAM, KI-67, GATA3, EGFR, CK14, CK17, CK5/6, PTEN, MAPK (ERK1/2), p-S6, CCND1. Primary antibodies used are listed in supplementary material 1. A senior pathologist (GMG) performed the analyses.

Twelve markers were semi-quantitatively assessed using the H score which combines staining intensity and the percentage of positive cells, determined by the following formula: 3 x percentage of highly staining cells + 2 x percentage of moderately staining cells + percentage of weakly staining cells, as previously described (14). The percentage of positive nuclei was quantified for Ki67 immunostaining. AR was quoted as the percentage of positive cells (whatever the intensity of nuclei staining). EGFR was quoted by multiplying the strongest intensity of staining and percentage of that staining. All IHC results are presented as median and extreme values.

### **DNA analysis**

Selected zones of FFPE blocks were macro-dissected. After deparaffinization, tissues were incubated overnight at 56°C with proteinase K; genomic DNA was extracted using a GENE READ DNA FFPE Kit (Qiagen, Valencia, CA) and quantified with the Qubit® dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA), according to manufacturer's instructions. Targeted sequencing of 91 cancer-associated genes was performed using Illumina HiSeq2500 technology on a custom made panel (supplementary material 2). Data were aligned to the human reference genome (hg19) using Bowtie2 algorithm (15). Two samples (2/26) were removed from the analyses because of low coverage (<30% of targeted genes covered at a depth of 100X). Coding variants occurring in 5% or more and at a depth of coverage of at least 100X were considered. SNVs and indels were identified using GATK UnifiedGenotyper. We retained COSMIC confirmed non-synonymous, exonic/splice variants observed at a frequency lower than 0.1% in population. The potential pathogenicity of the identified variants was estimated using different public databases (cancer hotspot (16), oncoKB (17), cbiportal (18), tumorportal (19), IARC TP53 (20), UMD BRCA (21)). We only retained confirmed pathogenic variant and variant of unknown significance if they were reported at least once in cbiportal and/or tumorportal for this analysis.

Affymetrix OncoScan® FFPE assay was carried out, as previously described (22), to obtain genomic information including copy number variations and SNPs from the DNA of 4/6 responders patients. Analyses were performed with Chromosome Analysis Suite 3.3 (ChAS 3.3, ThermoFisher).

### **RNA extraction and gene expression array analysis**

Samples macro-dissected from FFPE blocks were deparaffinized in xylene and precipitated in ethanol. Tissues were digested for 3 days at 55° in lysis buffer containing proteinase K, and triton X100, and total RNA was then extracted following the manufacturer's protocol (High Pure FFPE RNA Micro kit, Roche Applied Science). Quantifications were performed using a NanoDrop Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA). NanoString nCounter platform (version 3.0, NanoString Technologies, Seattle, USA) was used to measure the expression levels of transcripts (23). The nCounter PanCancer Pathways panel includes 730 genes; 30 supplementary genes were added because of their relevance in

transcriptional studies for identifying AR-positive ER-negative breast cancer (1,2) (supplementary material 3). RNA labeling and hybridization reactions were performed according to the manufacturer's instructions. A gene was kept in the analysis if its expression was at least 50 counts, in at least 4 samples. Data normalization was performed internally using positive and negative controls and housekeeping genes (24). The R package NanoStringDiff V1.4 (25), that estimates a generalized linear model with a negative binomial family (24), was used to identify differentially expressed genes and to estimate fold change and compute significance. P values were corrected for multiple testing by the Benjamini Hochberg procedure (26). For the responder versus non-responder supervised analysis, we retained genes with significant differential expression, at false discovery rate 5%. All heatmaps were generated on filtered data. For heatmaps with selected genes, only the intersections with expressed genes were used. Clustering was generated with Pearson's correlation distance and Ward's criterion. Heatmaps displayed scaled expression values by gene. Pathway and network analyses of the transcriptome data were performed with Ingenuity Pathway Analysis software (IPA, Qiagen Redwood City, [www.qiagen.com/ingenuity](http://www.qiagen.com/ingenuity)) (27).

### **Cells and cells culture**

MDA-MB-453 were purchased from ATCC (ATCC® HTB-131™) and cultured in Advanced DMEM (Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA) with 1 % Foetal calf serum, Glutamax 1% and Penicillin/Streptomycin 1 %. SUM185PE were kindly provided by Dr Lehmann-Che and Dr De Cremoux (CNRS UMR7212/INSERMU944; Hôpital Saint-Louis; Paris, France) and cultured in DMEM (Thermofisher Scientific, Waltham, MA USA) with 10 % Fetal calf serum and Penicillin/Streptomycin 1 %.

### **Reagents**

The different antiandrogens used were: a CYP17A1 inhibitor (AA) and two AR antagonists, enzalutamide (Enza) and darolutamide (ODM-201). All three were purchased from Selleckchem (ref. S2246, S1250, S7569). Two Chk1 inhibitors were used: AZD-7762 purchased from Selleckchem (ref. S1532) and GDC-0575 that was obtained from Genentech (MTA ID: OR-216276). AA was diluted in ethanol while Enza, ODM-201, AZD-7762 and GDC-0575 were diluted in DMSO.

### **Cell viability assays**

Cells (~1800) were seeded in 96-well plates for 24 h and then treated for 5 days with a range of increasing concentrations of drugs, used either alone or in combination. Methyl Thiazolyl Tétrazolium (MTT, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was applied for 3 h (final concentration: 0.5 mg/mL). Then, supernatants were discarded and 100 µL of dimethylsulfoxide was added to the wells. Absorbance was measured on a microplate-photometer (Bio-Tek Instruments, Colmar, France) using a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. Concentration–response curves were plotted and the concentrations causing 50 % inhibition of

viability compared to vehicle control (IC<sub>50</sub>) were interpolated from nonlinear regressions of the data (Prism 5; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Drug combination assays were carried out following the Chou-Talalay method, based on the median-effect equation (28). Cells were incubated in nine serial dilutions of the two tested drugs, using concentrations chosen above and below of the IC<sub>50</sub> determined earlier. Cell viabilities were assessed using MTT, following the same protocol used for single drugs assays. IC<sub>50</sub> were determined, and the effects of drug combinations were analyzed by calculating the combination index (CI) with the following equation,  $CI = a/A + b/B$  (where A and B are the single agent IC<sub>50</sub>s and a and b are the respective combination IC<sub>50</sub>s of drug A and B). Synergistic, additive and antagonistic effects are characterized by  $CI < 1$ ,  $CI = 1$ , and  $CI > 1$ , respectively.

### **Confocal microscopy**

Cells were seeded in 12-well Chamber microscopy glass slide (Ibidi, Planegg / Martinsried, Germany) and incubated with drugs for 72 h. Slides were then washed twice with PBS, fixed in 4% formaldehyde, permeabilized with Triton X-100 and incubated with anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) monoclonal antibody (Rabbit mAb #2577, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) overnight, and then with a goat anti-rabbit Alexa fluor 488 antibody (Invitrogen, Paisley, United Kingdom). Slides were then counterstained by 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Quantification was performed with ImageJ software version 1.51n.

### **Fluorescent cell sorting analysis**

Apoptosis and cell cycle were evaluated using Fluorescent Activating Cell Sorting analysis. Cells (1x10<sup>6</sup>) were seeded in 6-wells plates and incubated with drugs for 72 h. For apoptosis/necrosis assay, cells were exposed to FITC-Annexin and propidium iodide (PI) according the manufacturer's protocol (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). For cell cycle analysis, cells were fixed and permeabilized in absolute ethanol with PBS over-night at -20°C, then rinsed and incubated with RNase and PI (50 µg/mL) (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

### **Orthotopic animal model**

Approval for the animal experiments was granted by the Comité d'éthique pour l'expérimentation Animale (CEEA50) ethics committee; Bordeaux (project number 2017051116491638 -V2 APAFIS #9883). The study was performed in accordance with European Community Standards of Care and Use of Laboratory Animals under level 2 containment (animal house authorization number A33063916).

MDA-MB-453 cells were transduced at a multiplicity of infection of 5 with a lentiviral vector allowing the expression of firefly Luciferase (MND-Luc, kindly provided by the Vectorology platform, SFR Transbiomed, Bordeaux University). Two hundred thousand cells were injected through the nipple into the mammary ducts of the fourth (inguinal) mammary glands of female NSG mice (Jackson Laboratory strain number 005557), as previously described (29). A total of 40 mice were injected. Tumor-bearing mice were randomized into four groups (10 mice in each group) after 10 days

and treated by oral gavage as follows: (1) vehicle control (in a solution supplied by Roche/Genentech), (2) AA (400 mg/kg) 5 days/7, (3) GDC-0575 (25 mg/kg) 2 days/7, and (4) combination of AA plus GDC-0575, using the same doses. Tumor growth was measured by bioluminescence imaging twice a week using a cryogenically cooled imaging system (PhotonIMAGER, Photo-acquisition and 3D Vision software, Biospacelab, France). Tumor progression and doubling time were analyzed with GraphPad Prism software. After 3 weeks of treatment, mice were sacrificed and mammary glands were retrieved, and then fixed in 4% buffered formaldehyde for IHC. Human specific CK7 staining (SP52, Roche Ventana) was applied on whole gland section. High quality images were made with Slides scanner-Nanozoomer (Hamamatsu NANOZOOMER 2.0 HT). Areas of invasive carcinoma were delimited on each whole gland section by image analysis (NDP.view 2 version 2.6.13); the ratios of the infiltrating carcinomas to the whole gland areas were calculated.

### **Statistical analysis**

The Exact Wilcoxon two-sample test was performed to assess comparisons of values between groups of patients for the IHC markers analysis (SAS software version 9.4). The effects of drugs or drug combinations on cell death, phospho-H2AX labeling and tumor growth in vivo were all analyzed using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA). Histograms and error bars represent mean  $\pm$  SEM, respectively, except otherwise stated in the figures legends. The tests used to assess the statistical significance of the differences are indicated in the figures legends. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .

## **RESULTS**

### **Patient and tumor characteristics**

Tumor material was available from 28 eligible and evaluable patients included in UCBG 12-1 trial (Flow Chart, supplementary figure S1). Clinical and pathological characteristics are reported in supplementary table S1.

Responders were older than non-responders (median age: 76 years versus 62 years, respectively). Other patient and tumor characteristics were similar in the two groups although the numbers are small.

Tumor material was available for TMA construct in 26 patients, for DNA analysis in 26 patients and for RNA analysis in 22 patients (Flow Chart, supplementary figure S1).

### **A four apocrine-marker immunohistochemistry score predicts AA response**

Fourteen markers were assessed by IHC in AR-positive TNBC patients included in the trial ( $n=26$ ; 6 responders and 20 non-responders) and in AR-negative TNBC patients ( $n=17$ ).

First, we compared the selected markers in AR-positive ( $n=26$ ) and AR-negative ( $n=17$ ) TNBC groups (Table 1). The median percentage of positivity of GCDFP15,

FOXA1, GGT1, CCND1 and GATA3, was statistically higher in the AR-positive TNBC group (table 1).

Second, we compared in the AR-positive group the median positivity of AR and fourteen markers between responders (n=4; all markers were analyzed in 4 responders, AR in 6, GCDFP15 and FOXA1 in 5) and non-responders (n=20). Only AR, FOXA1 and GGT1 showed statistically significant differential expression (overexpression) in the responders group (table 1 and figure 1A). GCDFP15 median expression was numerically higher in the responders group but did not reach statistical significance (p=0.062) (table 1). We then created an IHC score by adding the percentage of AR positive cells and H scores of FOXA1, GGT1 and GCDFP15. We named this IHC4 apocrine score. With median values of 79.6 (Min-Max: 75-82.5) versus 46.0 (Min-Max: 2.5-75), this IHC4 apocrine score significantly distinguished responders (n=4) from non-responders (n=20) (p=0.0025, Mann Whitney test, figure 1B). Morphological apocrine characteristics (abundant eosinophilic and granular cytoplasm, large nuclei with prominent nucleoli) evaluated on HES-stained slides were present in all responders (6/6) and in majority of non-responders (66%, 15/22) (data not shown).

### **NGS identified targetable alterations in 71% of patients**

DNA was analyzed in 26 patients. Two samples were excluded from the analyses due to low coverage. A panel of 91 genes was sequenced in 24 tumors from 6 responders and 18 non-responders. We identified 225 variants in 70/91 sequenced genes. The median number of variants per case was 3 (min-max: 0-61) and only one patient had no variants (non-responder).

Potentially targetable variants (defined by OncoKB database (17)) were identified in 17/24 patients (71%). These include, alterations of *PIK3CA* in 12 (4 responders and 8 non-responders), *AKT1* E17K variant in 3 (1 responder and 2 non-responders), mTOR S2215F variant in 1 (non-responder) and *ERBB2* L755S variant in 1 (non-responder).

The TP53 mutation rate was 17% (1/6) in the responders group and 61% (11/18) in the non-responders group, respectively (p=0.035). The rate of *PIK3CA* mutations was 67% (4/6) in the responders group and 44% (8/18) in the non-responders group (figure 1C), a difference not reaching statistical significance. Other identified variants (targetable or not) did not allow segregating patients based on the status of abiraterone response.

### **DNA damage repair transcripts, including CHEK1, are underexpressed in responders**

RNA extracted from 22 patients' tumors (4 responders and 18 non-responders) was analyzed using a NanoString platform. We measured the expression levels of 760 transcripts that are known to be implicated in various cancers (based on the Nanostring Pancancer Pathways panel). After filtering the results, 576 out of 760 transcripts were retained in the analysis. Gene expression profiles of 3 non-responders patients were removed from the dataset (one was flagged at the first

quality control step and two were outliers in the principal component analysis). Therefore, we further analyzed the gene expression profiles from 19 patients (4 responders and 15 non-responders).

Tumors did not cluster according to their response status using an unsupervised analysis (data not shown). The analysis was repeated using a restricted list of 41 transcripts present in our custom NanoString panel and in the list of transcripts of the first two studies which identified the MA sub-type (1) and the ER- class A sub-type (2). This did not allow clustering responders from non-responders either (supplementary figure S2).

A supervised analysis (responders versus non-responders) identified 31 genes with differential expression in the two groups, with a false discovery rate of <5% (figure 2A). Among them, nine genes, underexpressed in responders, were particularly interesting: four are linked to proliferation (*CDC6*, *CCNE2*, *CDC25C*, *E2F5*) and five to DDR (*FANCA/PALB2*, *FANCB*, *BRCA1*, *CHEK1*, and *RAD21*). This was indirectly confirmed by a pathway and network analysis (figure 2B) which showed that the most differentially expressed pathways (P-value  $\leq 0.001$ ) between responders and non-responders concern proliferation (4 pathways concerning cell cycle checkpoint control and regulation) and DDR (2 pathways concerning role of CHK proteins and ATM signaling pathways).

*CHEK1* was one of the most differentially expressed genes (figure 2A) and was underexpressed in responders versus non-responders (fold change=0.28,  $p=0.000041$ ). In order to gain an insight into the mechanism of this underexpression, we decided to focus on case #02. This patient achieved a CR to AA, lasting for more than 4 years and still ongoing at the time of writing of this manuscript (13). We assessed the copy number profile of this tumor by OncoScan comparative genomic hybridization-like (CGH) microarray assay. The CGH profile of the tumor revealed a loss of heterozygosity of several loci, including a deletion of *CHEK1* (11q24.2), as well as *ATM* (11q22.3) and *CDC6* (17q21) (figure 2C). This loss of heterozygosity could explain the observed underexpression of the *CHEK1* transcript in this patient. One on three other responders analyzed also present a loss of heterozygosity of *CHEK1*, so we cannot rule out the existence of transcriptional regulatory mechanisms explaining the underexpression observed.

### **Combining abiraterone and Chk1 inhibitor led to additive or synergistic effect on AR-positive TNBC cell lines in vitro**

Our gene expression analysis suggests that *CHEK1* could play a role in the sensitivity of AR-positive TNBC to AA. Consequently, we decided to test the activity of Chk1 inhibitors used alone or in combination with anti-androgens in AR-positive TNBC preclinical models.

We first studied the effects of three anti-androgens (AA, enzalutamide and darolutamide (ODM-201)) and of two Chk1 inhibitors (GDC-0575 and AZD7762) used alone on the viability of two AR-positive TNBC models, the MDA-MB-453 and SUM185PE cell lines (figure 3A and supplementary figure S3). With an IC<sub>50</sub> of about 5  $\mu$ M on the two cell lines, AA was the most potent antiandrogen. Chk1 inhibitors

have low IC50s of about 50 nM. Activity of the two Chk1 inhibitors was verified by detecting decrease in the ratio of phospho-Chk1 S296 on total Chk1 expression by western blotting (not shown).

We then treated cells with the three anti-androgens combined with the two Chk1 inhibitors to determine their combination index (CI) in the two cell lines. Results showed that AA plus Chk1 inhibitor combinations led to slightly synergistic effects (CI <1) in both cell lines for GDC-0575 and in SUM185PE for AZD7762 and an additive effect (CI close to 1) with AZD7762 in MDA-MB-453 (figure 3B). This was not observed with the two other antiandrogens, enzalutamide and ODM-201, wherein the CIs rather pointed to antagonist effects (CI >1). Thus, we decided not to perform further studies with these two anti-androgens.

AA used alone (at 5  $\mu$ M) had no effect on the cell cycle. Both Chk1 inhibitors (at 0.1  $\mu$ M) led to a reduction in G1 and an accumulation in S phase (figure 3C). There was a slight increase in this effect when AA was combined both with GDC0575 and AZD7762 in both cell lines.

AA used alone had a weak effect on the percentage of apoptotic (AnnexinV-positive) and dead cells (PI-positive). Both Chk1 inhibitors induced at least a doubling of that percentage, reaching statistical significance in MDA-MB-453. The addition of Chk1 inhibitors to AA increased the percentage of apoptotic cells in MDA-MB-453 cell line but not in SUM185PE cell line (figure 3D). This effect was only statistically significant for AZD7762 in MDA-MB-453 cell line.

DNA damage and DNA replication stress were assessed using  $\gamma$ H2AX labeling at serine 139 phosphorylation (figure 4 A-B). AA used alone has no effect on  $\gamma$ H2AX labeling. As expected, both GDC-0575 and AZD7762 used alone induced a sharp and significant increase in  $\gamma$ H2AX labeling in the two AR-positive TNBC cell lines (figure 4 A-B). When AA was added to GDC-0575, the effect of GDC-0575 was significantly increased in MDA-MB-453 cell line, ( $p < 0.001$ ) (figure 4A). The addition of AA to AZD7762 did not increase AZD7762 effect in both cell lines.

Taken together, these in vitro observations suggest that Chk1 inhibitor potentiates the effects of AA, especially in the MDA-MB-453 cell line. The AA-GDC-0575 combination was significantly effective on the cell viability in both cell lines and strongly increased DNA damage in MBA-MB-453 cell line. It also increased the apoptosis although it was not statistically significant. Based on these results, we decided to test the effect of AA alone, GDC-0575 alone and AA combined with GDC-0575 on MDA-MB-453 cells growth in vivo.

### **Enhanced anti-tumor activity of AA combined with GDC-0575 in an orthotopic xenograft**

MDA-MB-453 cells expressing luciferase were injected orthotopically through the nipple into the mammary gland ducts of NSG mice. After 10 days, the animals were divided into four groups, receiving each a specific treatment. Treatment with AA significantly reduced tumor growth, measured by luciferase activities during the first 7 days ( $p < 0.001$  at day 7), but its effect did not last after (figure 5A). Compared to vehicle or AA, GDC-0575 induced a clear reduction in tumor growth, from day 4 of

treatment to the end of the experiment (figure 5A). The effect of AA combined with GDC-0575 was more pronounced than AA alone (but not than GDC-0575 alone), and reached statistical significance ( $p \leq 0.01$ ). Regarding the tumor doubling times (figure 5B), the combination treatment significantly delayed the tumor development compared to either AA ( $p < 0.001$ ) or GDC05-75 ( $p < 0.01$ ) alone.

The engrafted mammary glands were dissected out, fixed and tumor development was assessed by identifying MDA-MB-453 cells in sections using an anti-CK7 antibody. Two types of tumoral components were identified within the mammary gland: cells lining the mammary ducts showing no sign of infiltration in the surrounding tissues (in situ carcinoma) and massive infiltrating carcinomas. The areas of the infiltrative component were measured and compared (figure 5C). The effect of the treatments on the ratio [infiltrating carcinoma/whole gland] is shown on figure 5C. These are consistent with the luciferase activity measurements made on live animals (figure 5A). Again, the combination treatment was the most effective in delaying tumor development.

## Discussion

This translational research study comprised of two aspects. First, we aimed to identify predictive markers of response to AA and new druggable co-target(s) of the AR pathway using tumor samples from patients included UCBG 12-1 trial (7). Second, we went back to preclinical models to validate our findings.

Regarding the first part, we searched for predictive markers and new targets by analyzing tumor samples at the protein, DNA and RNA levels. At the protein level, a modest positive predictive value of AR has been demonstrated in a large prospective series of patients treated with enzalutamide (30). In addition to AR, we analyzed (using IHC) 14 markers including those previously identified in AR-positive triple negative tumors such as FOXA1 and GCDP15 (31) or GGT1 (32). AR expression alone did not accurately segregate responders from non-responders to AA. Hence, we identified a score with four IHC markers (AR, GCDP15, FOXA1 and GGT1) which allowed discriminating responders from non-responders. This score could be improved by morphological apocrine characteristics that show high negative predictive value. However, the number of responders in this study was very small and this score needs to be tested in an independent data set of AR-positive TNBCs.

At the DNA level, we performed targeted sequencing of 91 cancer-associated genes. Only TP53 gene segregated responders from non-responders as it was mutated in 17% and 61%, respectively; however, the number of responders was small. Interestingly, NGS analyses identified a targetable alteration in 71% of patients. A majority of these alterations are related to the PI3KCA pathway supporting previous findings of high rate of PI3KCA pathway mutation among AR-positive TNBC (11,33,34). Preclinical data of antiandrogen plus PI3K inhibitor combination have also been published (11) based on those findings and clinical trials are ongoing.

Gene expression analysis revealed that several genes linked to DDR, including CHEK1, are overexpressed in non-responders compared to responders. *CHEK1*

activation transiently delays cell-cycle progression through the S and G2/M phases, allowing DNA breaks to be efficiently repaired (35). Interestingly, non-responders to AA present a high rate of *TP53* mutation, while P53 inactivation could be a predictive marker of Chk1 inhibitor efficacy as described in sarcoma (36). Chk1 expression has been linked to early local recurrence in patients with breast cancer (37). In addition, AR mediates regulation of DDR in classical AR-driven cancer model: prostate cancer (38). Blocking Chk1 using an inhibitor (AZD7762, also tested in the present study) led to promising results in a prostate cancer model when used associated with an antiandrogen (enzalutamide) (39). In prostate cancer, targeting different DDR effectors such as inhibition of PARP or Chk1 in combination with antiandrogens is then under investigation (41).

These results and data encouraged us to go back to preclinical models and to test for the efficacy of combinations of Chk1 inhibitors and antiandrogens in AR-positive TNBC models. In vitro, the two Chk1 inhibitors (GDC-0575 or AZD7762) had very potent effects on the AR-positive cell line viability, with IC50 in the nanomolar range. This is in concordance with Bryant et al. study (40), who reported an IC50 of 100nM for AZD7762 in MDA-MB-453 cells. Moreover, we show that Chk1 inhibitors had slightly synergistic or additive effects when used in combination with AA (but not with other antiandrogens) on cell viability, cell cycle progression through S or G2/M phases, accumulation of apoptotic/necrotic cells and accumulation of DNA breaks. We further validated the efficacy of AA plus Chk1 inhibition combination using a previously described orthotopically engrafted mice model (41,42). Direct injection in the mammary gland allowed growing cells in their natural location and micro-environment. AA-GDC-0575 combination showed a substantial delay in in vivo tumor development compared to monotherapy confirming our in vitro findings.

The lack of additive or synergistic effect of Chk1 inhibitors with the two AR-antagonists tested (enzalutamide and ODM-201) could be explained by a different mechanism of action compared to AA. AA is an antiandrogen acting as a CYP17A1 inhibitor. One could argue on the interest to use it on in vitro assays, related to its enzymatic effect. However, AA activity in prostate preclinical model was demonstrated to be also linked to a competitive binding to the AR (43,44). Although the synergies we measured in vitro were not as pronounced as the ones described using chemotherapy combinations, they were in line with the effects of combinations using antiandrogens reported in MDA-MB-453 cells (11,45).

In conclusion, this study identified Chk1 as a potential target in AR-positive TNBCs. The sensitization of cells with a Chk1 inhibitor might be an innovative therapeutic strategy. A clinical trial in patients with AR-positive TNBC evaluating AA combined with a Chk1 inhibitor should be considered.

### **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

The authors have declared no conflicts of interest.

### **Author Contributions**

Conception and design: T Grellety, H Bonnefoi

Development of methodology: T Grellety, H Bonnefoi, G MacGrogan and C Callens

Acquisition of data: T Grellety, G MacGrogan, C Callens, A Briaux, A Gonçalves, P Gestraud, V Velasco and E Richard

Analysis and interpretation of data: T Grellety, H Bonnefoi, G MacGrogan, C Callens, A Gonçalves, P Gestraud, M Pulido, E Richard and B Cardinaud

Writing of the manuscript: T Grellety, H Bonnefoi and B Cardinaud

Review and/or revision of the manuscript: all authors.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Audrey Laroche for her helpful advices on the Chk1 inhibitors assays, Benoit Rousseau and Julien Izotte (Animal facility, University of Bordeaux) for supplying and caring of the mice. We thank Richard Iggo for his logistical support. We thank Genentech for kindly providing GDC-0575. We thank Ravi Nookala of Institut Bergonié for the medical writing service.

### **Funding**

Janssen-Cilag contributed to UCBG 2012-1 study with an educational grant to Unicancer and by providing abiraterone acetate. The sponsor of UCBG 2012-1 trial (Unicancer) designed and coordinated the trial.

We thank the SIRIC BRIO (Site de Recherche Intégrée sur le Cancer-Bordeaux Recherche Intégrée Oncologie) and GIRCI-SOOM (Groupement Interrégional de Recherche Clinique et d'Innovation Sud-Ouest Outre-Mer) for their financial support (Grant API-K, GIRCI-SOOM 2015).

## References

1. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005;24:4660–71.
2. Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 2006;25:3994–4008.
3. Guedj M, Marisa L, de Reynies A, Orsetti B, Schiappa R, Bibeau F, et al. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene* 2012;31:1196–206.
4. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750–67.
5. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:1688–98.
6. Gucaip A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:5505–12.
7. Bonnefoi H, Grellety T, Tredan O, Saghatchian M, Dalenc F, Mailliez A, et al. A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). *Ann Oncol* 2016;27:812–8.
8. Traina TA, Miller K, Yardley DA, Eakle J, Schwartzberg LS, O’Shaughnessy J, et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:884–90.
9. Collins LC, Cole KS, Marotti JD, Hu R, Schnitt SJ, Tamimi RM. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses’ Health Study. *Mod Pathol* 2011;24:924–31.
10. Loibl S, Müller BM, von Minckwitz G, Schwabe M, Roller M, Darb-Esfahani S, et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130:477–87.
11. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, Pendleton CS, Tang L, Johnson KC, et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res* 2014;16:406.
12. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, Cittelly DM, Howe EN, D’Amato NC, et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res* 2014;16:R7.
13. Grellety T, MacGrogan G, Chakiba C, Kind M, Bonnefoi H. Long-Term Complete Response of an Androgen Receptor-Positive Triple-Negative Metastatic Breast Cancer to Abiraterone Acetate. *JCO Precis Oncol* 2018:2.

14. McCarty KS, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:716–21.
15. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012;9:357–9.
16. Chang MT, Asthana S, Gao SP, Lee BH, Chapman JS, Kandoth C, et al. Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat Biotechnol* 2016;34:155–63.
17. Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, Kundra R, Zhang H, Wang J, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* 2017;2017.
18. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013;6:pl1.
19. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 2014;505:495–501.
20. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat* 2016;37:865–76.
21. Bérout C, Letovsky SI, Braastad CD, Caputo SM, Beaudoux O, Bignon YJ, et al. BRCA Share: A Collection of Clinical BRCA Gene Variants. *Hum Mutat* 2016;37:1318–28.
22. Foster JM, Oumie A, Togneri FS, Vasques FR, Hau D, Taylor M, et al. Cross-laboratory validation of the OncoScan® FFPE Assay, a multiplex tool for whole genome tumour profiling. *BMC Med Genomics* 2015;8:5.
23. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 2008;26:317–25.
24. Wang H, Horbinski C, Wu H, Liu Y, Sheng S, Liu J, et al. NanoStringDiff: a novel statistical method for differential expression analysis based on NanoString nCounter data. *Nucleic Acids Res* 2016;44:e151.
25. Hong Wang and Chi Wang. NanoStringDiff: Differential Expression Analysis of NanoString nCounter Data. R package version 1.4.0 [Internet]. 2015. Available from: <http://bioconductor.bdmg.com.ar/packages/3.4/bioc/manuals/NanoStringDiff/man/NanoStringDiff.pdf>
26. Benjamini Y and Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, Vol. 57, No. 1 (1995), p. 289-300.
27. Krämer A, Green J, Pollard J, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* 2014;30:523–30.
28. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22:27–55.

29. Behbod F, Kittrell FS, LaMarca H, Edwards D, Kerbawy S, Heestand JC, et al. An intraductal human-in-mouse transplantation model mimics the subtypes of ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res* 2009;11:R66.
30. Kumar V, Yu J, Phan V, Tudor IC, Peterson A, Uppal H. Androgen Receptor Immunohistochemistry as a Companion Diagnostic Approach to Predict Clinical Response to Enzalutamide in Triple-Negative Breast Cancer. *JCO Precis Oncol* 2017;1: 1-19.
31. Lehmann-Che J, Hamy A-S, Porcher R, Barritault M, Bouhidel F, Habuellelah H, et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res* 2013;15:R37.
32. Cha YJ, Jung W-H, Koo JS. The clinicopathologic features of molecular apocrine breast cancer. *Korean J Pathol* 2012;46:169–76.
33. Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann Oncol* 2018; 29:895-902
34. Millis SZ, Gatalica Z, Winkler J, Vranic S, Kimbrough J, Reddy S, et al. Predictive Biomarker Profiling of > 6000 Breast Cancer Patients Shows Heterogeneity in TNBC, With Treatment Implications. *Clin Breast Cancer* 2015;15:473–81.e3.
35. Syljuåsen RG, Sørensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, et al. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* 2005;25:3553–62.
36. Laroche-Clary A, Lucchesi C, Rey C, Verbeke S, Bourdon A, Chaire V, et al. CHK1 Inhibition in Soft-Tissue Sarcomas: Biological and Clinical Implications. *Ann Oncol* 2018;
37. Alsubhi N, Middleton F, Abdel-Fatah TMA, Stephens P, Doherty R, Arora A, et al. Chk1 phosphorylated at serine345 is a predictor of early local recurrence and radio-resistance in breast cancer. *Mol Oncol* 2016;10:213–23.
38. Karanika S, Karantanos T, Li L, Corn PG, Thompson TC. DNA damage response and prostate cancer: defects, regulation and therapeutic implications. *Oncogene* 2015;34:2815–22.
39. Karanika S, Karantanos T, Li L, Wang J, Park S, Yang G, et al. Targeting DNA Damage Response in Prostate Cancer by Inhibiting Androgen Receptor-CDC6-ATR-Chk1 Signaling. *Cell Rep* 2017;18:1970–81.
40. Bryant C, Rawlinson R, Massey AJ. Chk1 inhibition as a novel therapeutic strategy for treating triple-negative breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* 2014;14:570.
41. Richard E, Grellety T, Velasco V, MacGrogan G, Bonnefoi H, Iggo R. The mammary ducts create a favourable microenvironment for xenografting of luminal and molecular apocrine breast tumours. *J Pathol* 2016;240:256–61.
42. Sflomos G, Dormoy V, Metsalu T, Jeitziner R, Battista L, Scabia V, et al. A Preclinical Model for ER $\alpha$ -Positive Breast Cancer Points to the Epithelial

Microenvironment as Determinant of Luminal Phenotype and Hormone Response. *Cancer Cell* 2016;29:407–22.

43. Richards J, Lim AC, Hay CW, Taylor AE, Wingate A, Nowakowska K, et al. Interactions of abiraterone, eplerenone, and prednisolone with wild-type and mutant androgen receptor: a rationale for increasing abiraterone exposure or combining with MDV3100. *Cancer Res* 2012;72:2176–82.

44. Soifer HS, Souleimanian N, Wu S, Voskresenskiy AM, Collak FK, Cinar B, et al. Direct regulation of androgen receptor activity by potent CYP17 inhibitors in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2012;287:3777–87.

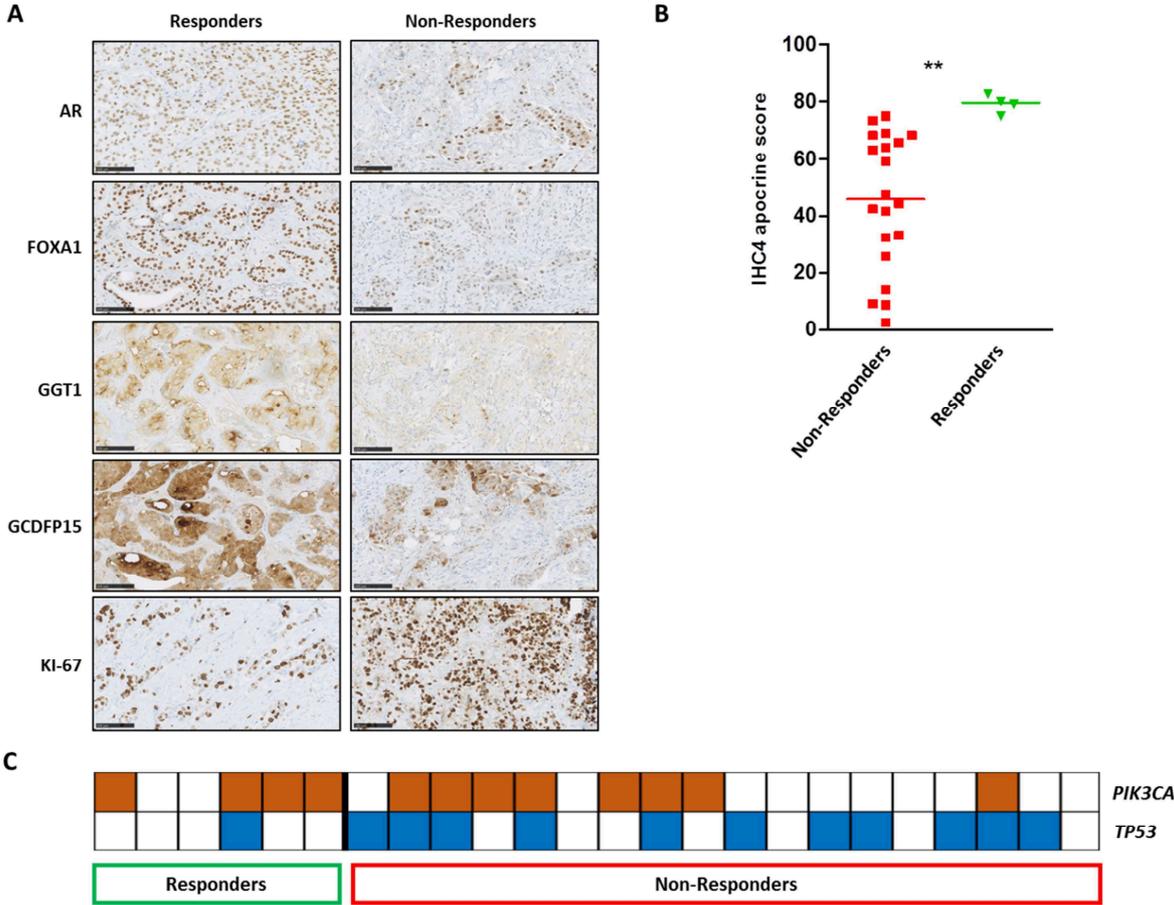
45. Gordon MA, D'Amato NC, Gu H, Babbs B, Wulfkuhle J, Petricoin EF, et al. Synergy between Androgen Receptor Antagonism and Inhibition of mTOR and HER2 in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 2017; 16:1389-1400.

## Figures and Table legend

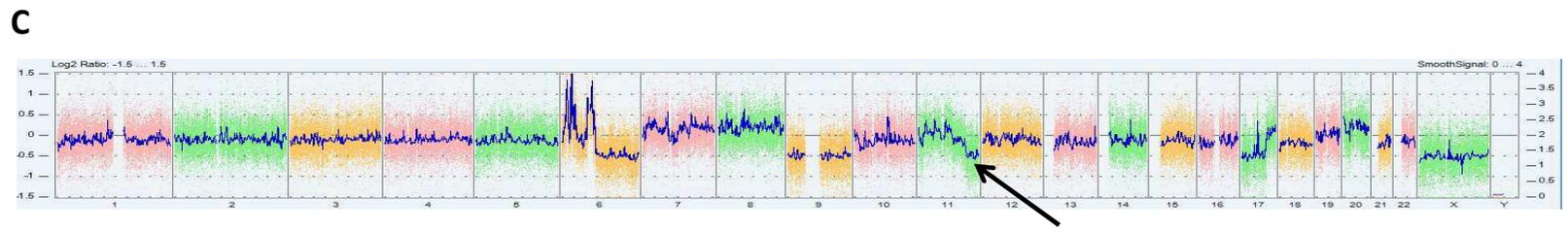
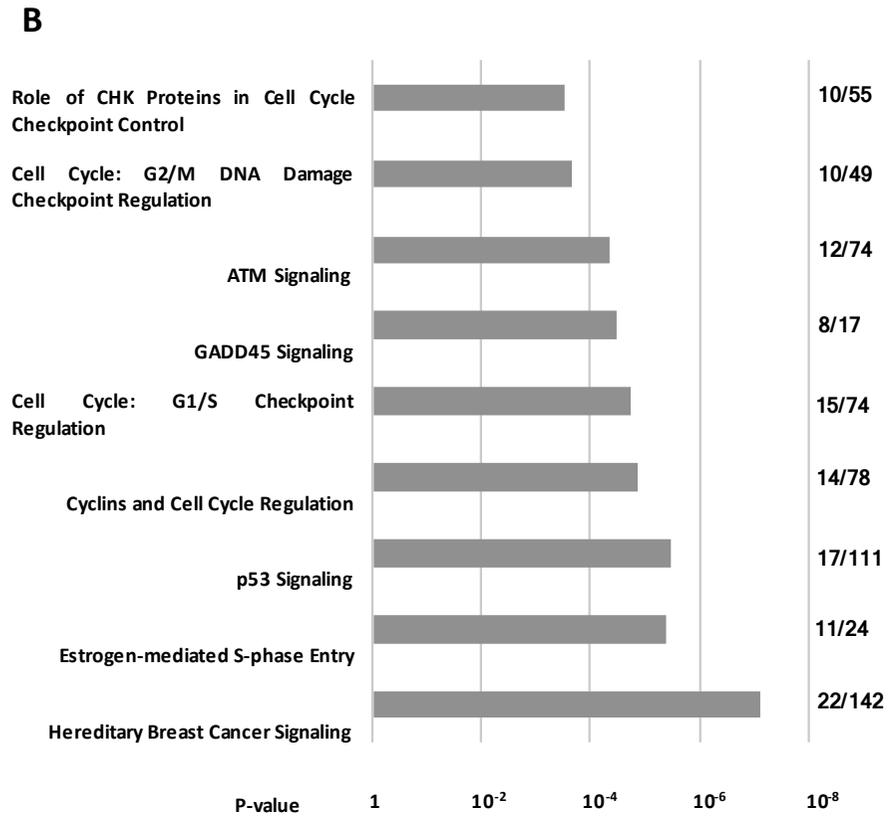
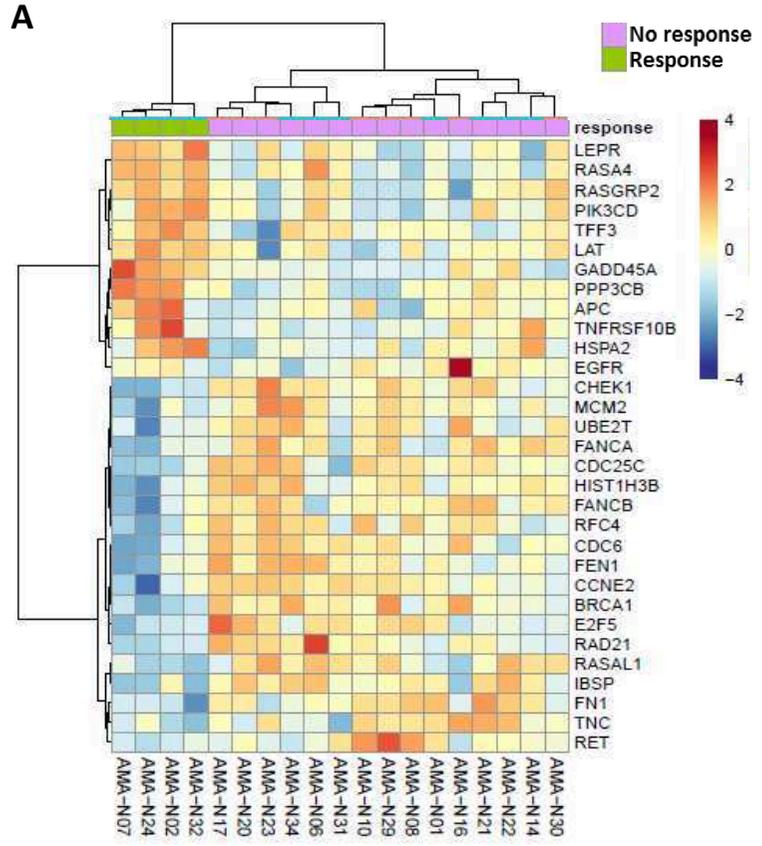
**Table 1. Histopathological assessment of AR-positive and -negative TNBCs, and AA responders and non-responders.** All markers were analyzed for 4/6 responders patients (\*), except AR for 6/6 responders patients (#), and GCDFP15 and FOXA1 for 5/6 responders patients (§).

|                          | AR-positive<br>TNBC<br>(n=26) | AR-negative<br>TNBC<br>(n=17) | Pvalue         | Responders<br><br>(n=4) | Non-<br>responders<br><br>(n=20) | Pvalue        |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|-------------------------|----------------------------------|---------------|
|                          | Median (min-max)              |                               |                | Median (min-max)        |                                  |               |
| <b>AR</b>                | -                             | -                             | -              | 100<br>(90-100)#        | 80<br>(7-100)                    | <b>0.0067</b> |
| <b>FOXA1</b>             | 60<br>(0-100)                 | 17<br>(0-40)                  | <b>0.0003</b>  | 95<br>(90-100)*         | 50<br>(0-90)                     | <b>0.0048</b> |
| <b>GCDFP15</b>           | 60<br>(0-100)                 | 0<br>(0-10)                   | <b>0.0001</b>  | 83<br>(70-90)§          | 43<br>(0-100)                    | 0.0624        |
| <b>L1CAM</b>             | 0<br>(0-0)                    | 10<br>(0-60)                  | <b>0.0039</b>  | 0<br>(0-0)#             | 0<br>(0-50)                      | 0.8748        |
| <b>KI67 (%)</b>          | 27.5%<br>(5-70)               | 65 %<br>(15-80)               | <b>0.0025</b>  | 15%<br>(5-35)*          | 30%<br>(5-70)                    | 0.0987        |
| <b>GATA3</b>             | 17<br>(0-100)                 | 0<br>(0-40)                   | <b>0.0110</b>  | 23<br>(17-34)*          | 12<br>(0-100)                    | 0.2136        |
| <b>EGFR</b>              | 7<br>(0-100)                  | 7<br>(0-60)                   | 0.6206         | 7<br>(0-80)*            | 10<br>(0-100)                    | 0.7670        |
| <b>CK14</b>              | 0<br>(0-34)                   | 40<br>(0-34)                  | <b>0.0002</b>  | 0<br>(0-34)*            | 0<br>(0-26)                      | 0.1864        |
| <b>CK17</b>              | 1<br>(0-100)                  | 43<br>(0-100)                 | <b>0.0128</b>  | 0<br>(0-13)*            | 2<br>(0-100)                     | 0.3372        |
| <b>CK5/6</b>             | 23<br>(0-100)                 | 30<br>(0-100)                 | 0.2219         | 34<br>(13-37)*          | 18<br>(0-100)                    | 0.3739        |
| <b>GGT1</b>              | 30<br>(0-83)                  | 0<br>(0-7)                    | <b>0.0004</b>  | 50<br>(17-83)§          | 22<br>(0-70)                     | <b>0.0195</b> |
| <b>PTEN</b>              | 15<br>(0-50)                  | 17<br>(0-67)                  | 0.9386         | 30<br>(0-47)*           | 10<br>(0-50)                     | 0.2967        |
| <b>MAPK<br/>(ERK1-2)</b> | 30<br>(0-83)                  | 47<br>(0-87)                  | 0.8487         | 68<br>(34-70)*          | 13<br>(0-83)                     | 0.0962        |
| <b>p-S6</b>              | 72<br>(0-100)                 | 53<br>(4-93)                  | 0.2296         | 75<br>(50-100)*         | 70<br>(0-100)                    | 0.8405        |
| <b>CCND1</b>             | 67<br>(0-100)                 | 27<br>(0-80)                  | <b>0.01010</b> | 83<br>(60-90)*          | 63<br>(0-100)                    | 0.1082        |

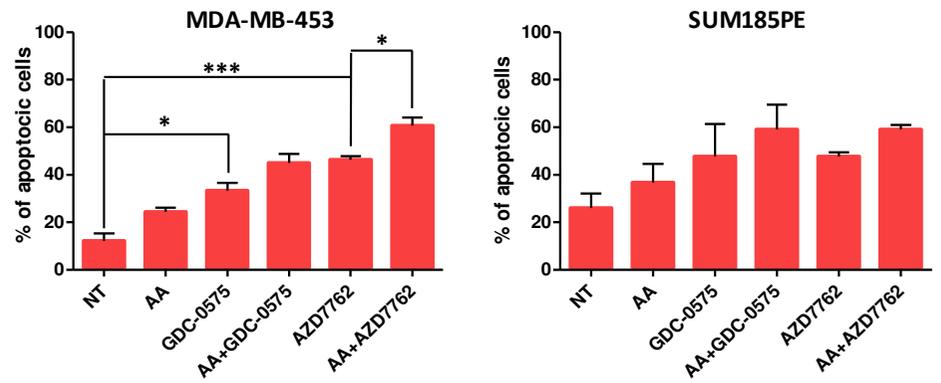
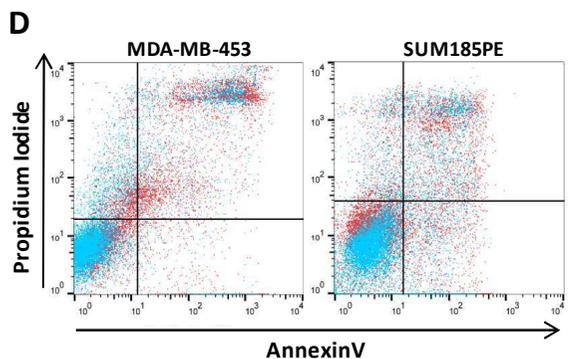
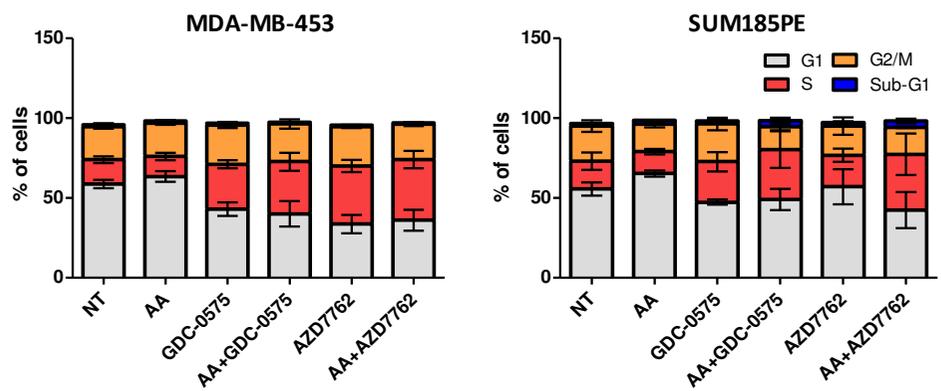
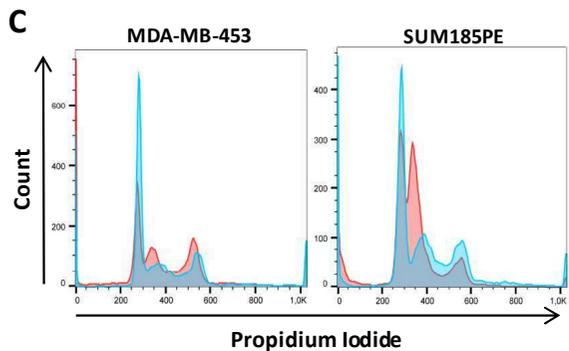
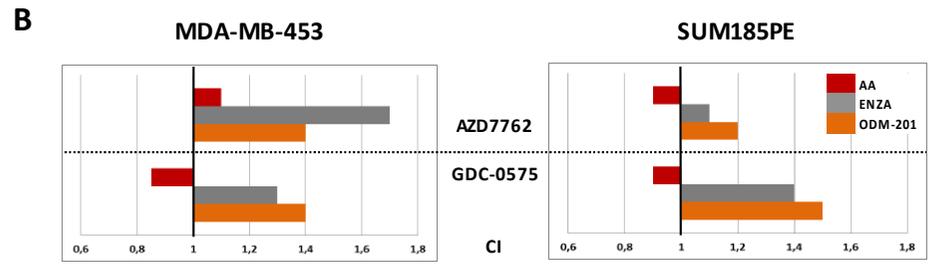
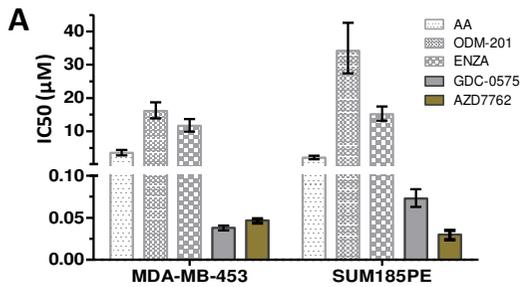
**Figure 1. Tumors from responders express predominant apocrine features and different genomic profiles. A.** Representative IHC results of molecular apocrine markers (AR, FOXA1, GGT1 and GCDFP15) obtained on tumors from responders and non-responders (x20, scale=100µm). **B.** Representation of the IHC4 apocrine scores obtained by combining the IHC staining quantifications of 4 apocrine markers (AR, FOXA1, GCDFP15 and GGT1) in non-responders (n=20) and responders (n=4). Bars indicate median. \*\* p=0.0025 (Mann Whitney test). **C.** Mutational profile of *PIK3CA* (mutated if orange) and *TP53* (mutated if blue) in n=24 included patients.



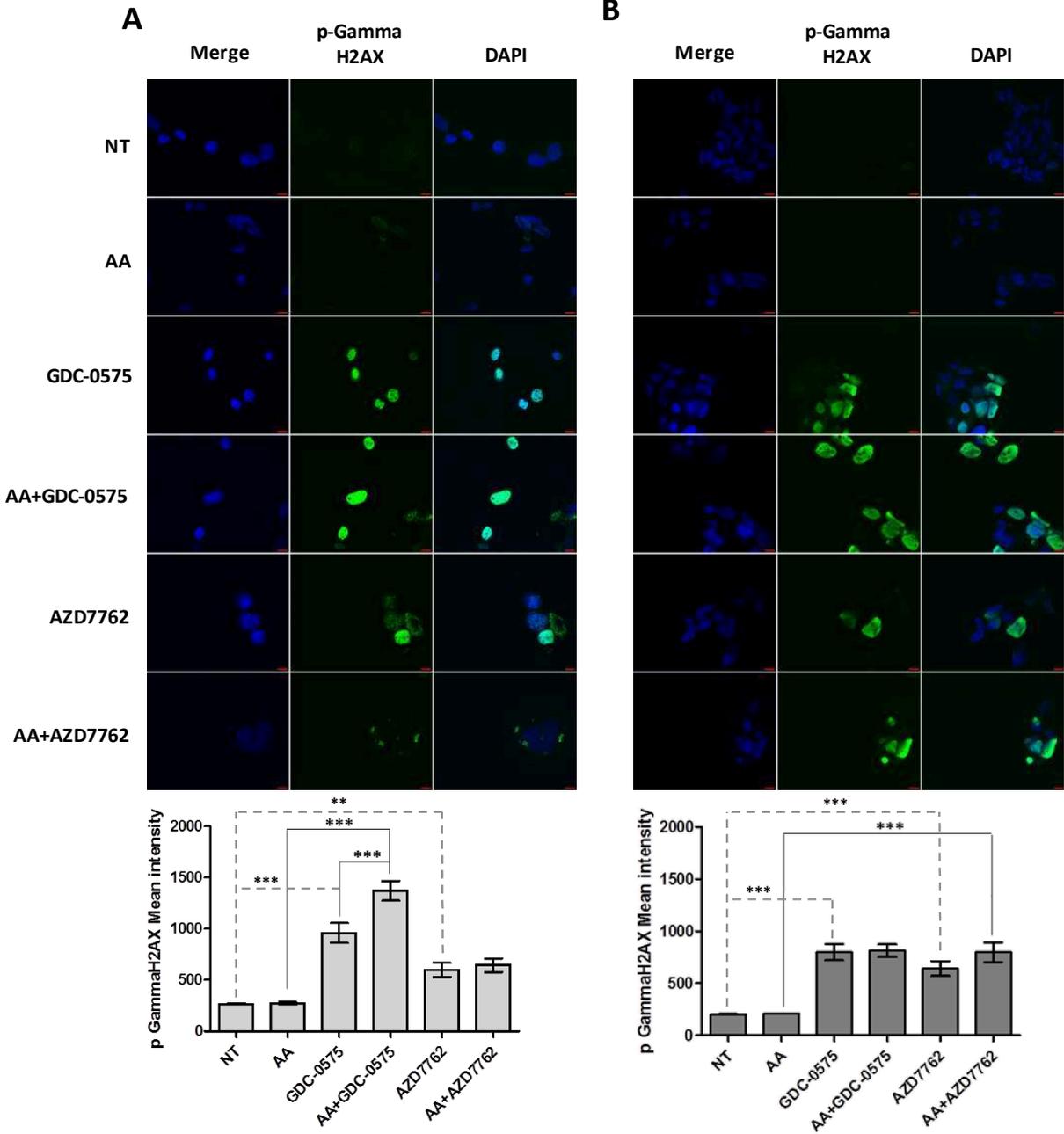
**Figure 2. Relative overexpression of genes associated with proliferation and DNA Damage Repair in non-responders to AA.** **A.** Heatmap of the genes differentially expressed (supervised analyze, FDR<5%) between responders (n=4) and non-responders (n=15). **B.** Differentially expressed pathways (with a P-value  $\leq$  0.001) identified by *Ingenuity Pathway* analysis. For each pathway, the numerator is the observed number of differentially expressed genes and the denominator is the total number of genes belonging to the pathway. **C.** Genomic profile of the case #02, who present a complete response to AA. The arrow indicates a copy loss of the region containing the *CHEK1* locus (11q24.2) and *ATM* locus (11q22.3).



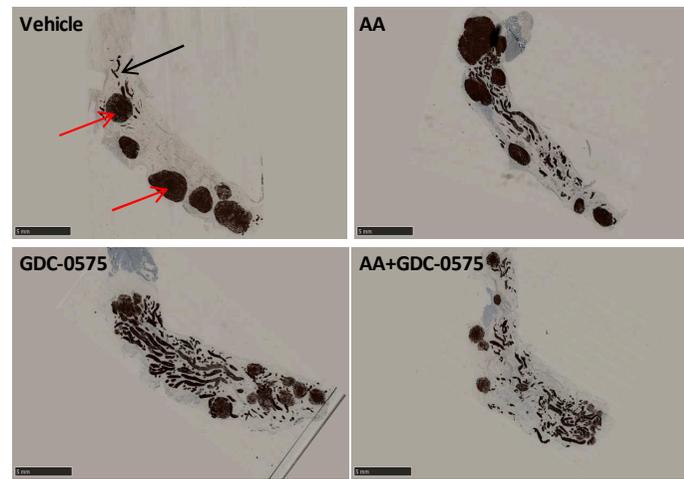
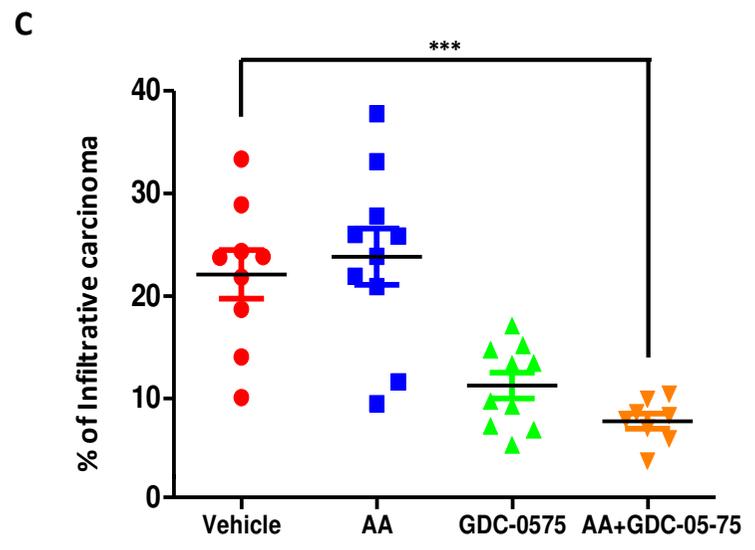
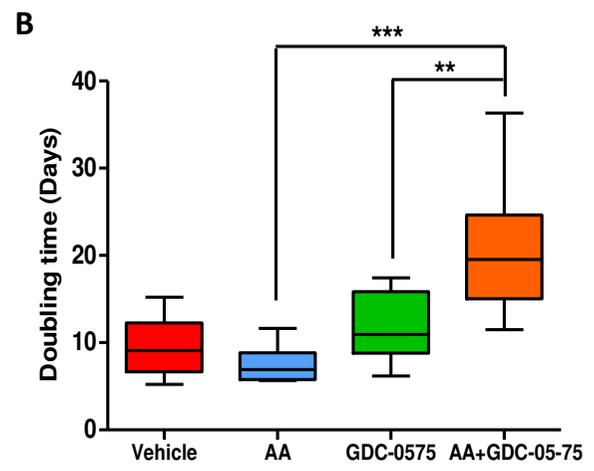
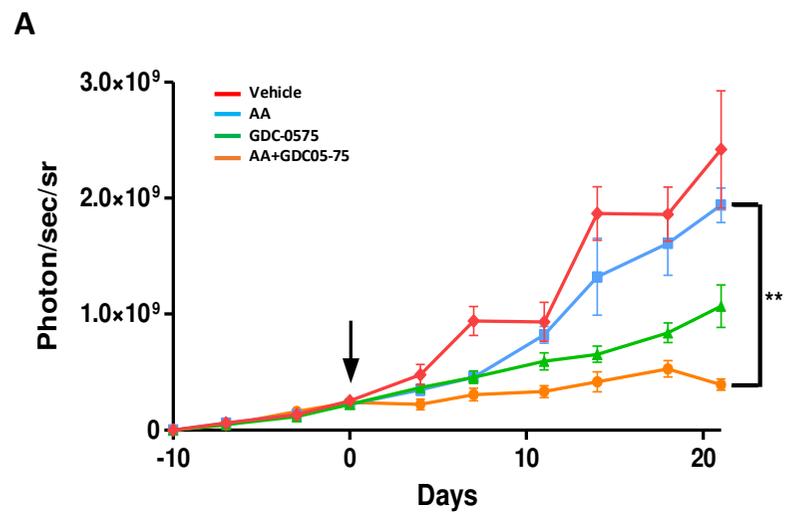
**Figure 3. Efficacy of AA and Chk1-inhibitors combination in two AR-positive TNBC cell lines.** **A.** Growth suppression effect of different anti-androgens and Chk1 inhibitors on MDA-MB-453 and SUM185PE cells. The effects of a range of concentrations of three antiandrogens (enzalutamide, ENZA; darolutamide, ODM-201; and abiraterone acetate, AA) and two Chk1 inhibitors (GDC-0575 and AZD7762) were assessed by MTT. Histograms represent the respective IC50s (mean of n = 3-4 experiments; error bars show the 95%CI). **B.** Combination indexes (CI) obtained for different drugs combinations tested on the two cell lines (independent triplicate). **C.** Left: representative propidium iodide labeling of MDA-MB-453 and SUM185PE cells treated with GDC-0575 (blue) and AA+GDC-0575 (red). Right: quantification of the cell cycle distributions of MDA-MB-453 and SUM185PE cells treated for 3 days with AA (5  $\mu$ M), GDC-0575 (0.1  $\mu$ M) and AZD7762 (0.1  $\mu$ M) used alone or in combination; N=3. **D.** Drug-induced cell apoptosis and death quantified by annexin-V and propidium iodide labeling. Left: representative graphs of flow cytometry data obtained in MDA-MB-453 and SUM185PE cells. Right: quantification of apoptotic/cell death induction by 3 days of treatments (same experimental conditions than in figure 3C). Apoptotic cells are defined by the either AnnexinV positive and/or PI positivity. \* P<0.05, \*\*\* P<0.001; one way Anova, Tukey's Multiple Comparison Test.



**Figure 4. Effect of drugs used alone or in combinations on phospho-gamma H2AX labeling.** Representative IF images of MDA-MB-453 (A) and SUM185PE (B) cells stained for phospho-gamma H2AX, after 3 days of treatment by AA (5 μM), GDC-0575 (0.1 μM), AZD7762 (0.1 μM) used alone or in combination. Histograms represent the results of the quantification of phospho-gamma H2AX mean intensities. \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001 (one way Anova, Tukey’s Multiple Comparison Test). Capture at 63x, scale =10 μM. n=3.



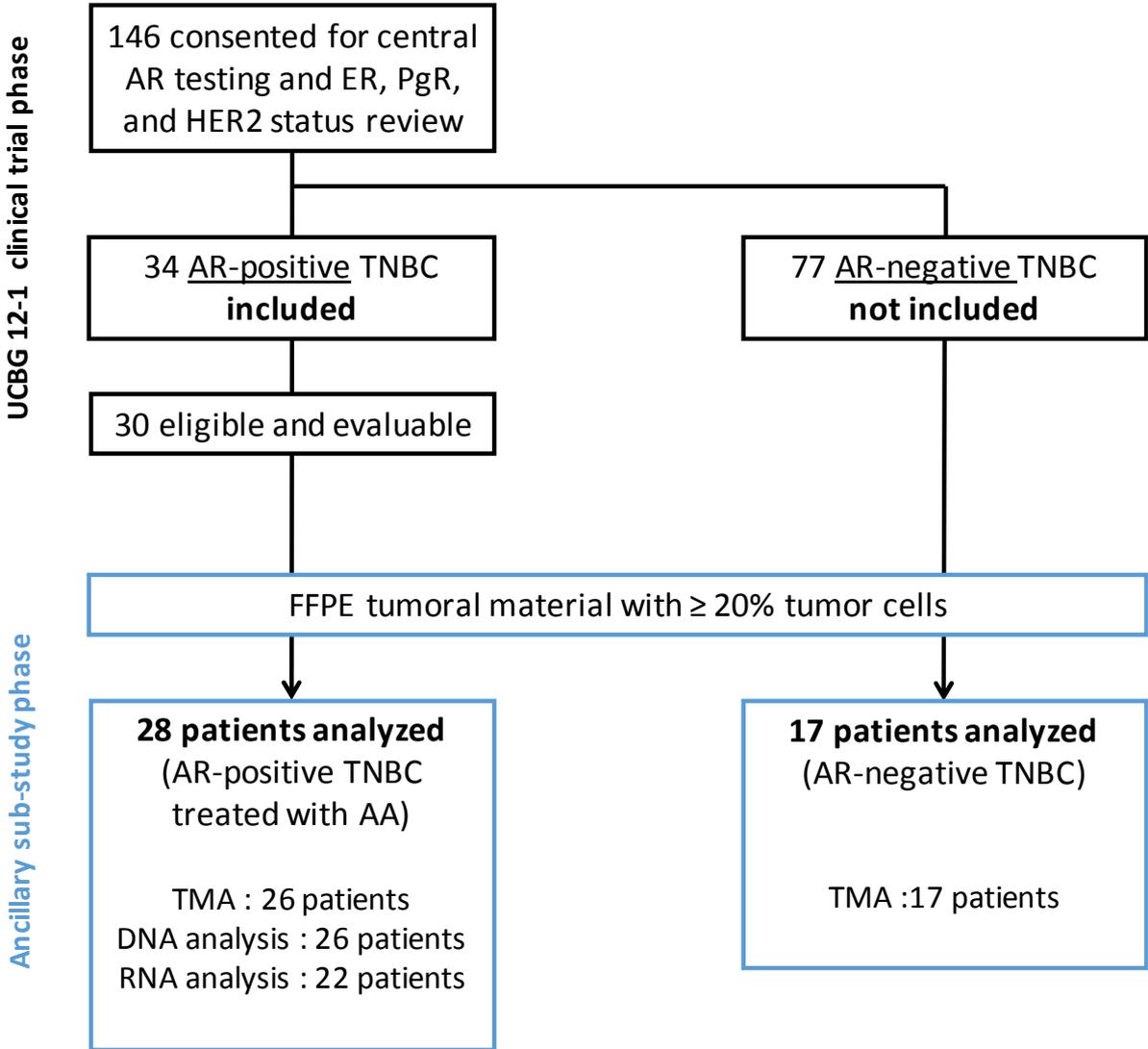
**Figure 5. AA and GDC-0575 combination reduces tumor growth in orthotopic xenograft.** Luciferase-expressing MDA-MB-453 cells were engrafted into the mammary glands of NSG mice. After 10 days, mice (n=10 per group) were treated with vehicle (red), AA (blue), GDC-0575 (green), or a combination of the two drugs (orange). **A.** Effect of the treatments on the tumor growth were assessed by bioluminescence measurements (photon/second/steradian). \*\* P<0.01 (one way Anova, Tukey's Multiple Comparison Test). **B.** Representation of the doubling time of the tumors, calculated from the tumor progression curves assessed by bioluminescence; error bars represent min-max values per group; \*\* P<0.01. \*\*\* P<0.001 (one way Anova, Tukey's Multiple Comparison Test), **C.** Left: Quantification of the ratio of the infiltrating carcinoma over the total surface of the gland, assessed by IHC (CK7 labeling). \*\*\* P<0.001 (one way Anova, Tukey's Multiple Comparison Test). Right: Representative CK7 labeling of sections of mammary glands retrieved from animals treated for 21 days. On the section corresponding to the vehicle-treated mouse, red arrows indicate representative examples of CK7-labeled infiltrating carcinoma and black arrows indicate in situ carcinoma.



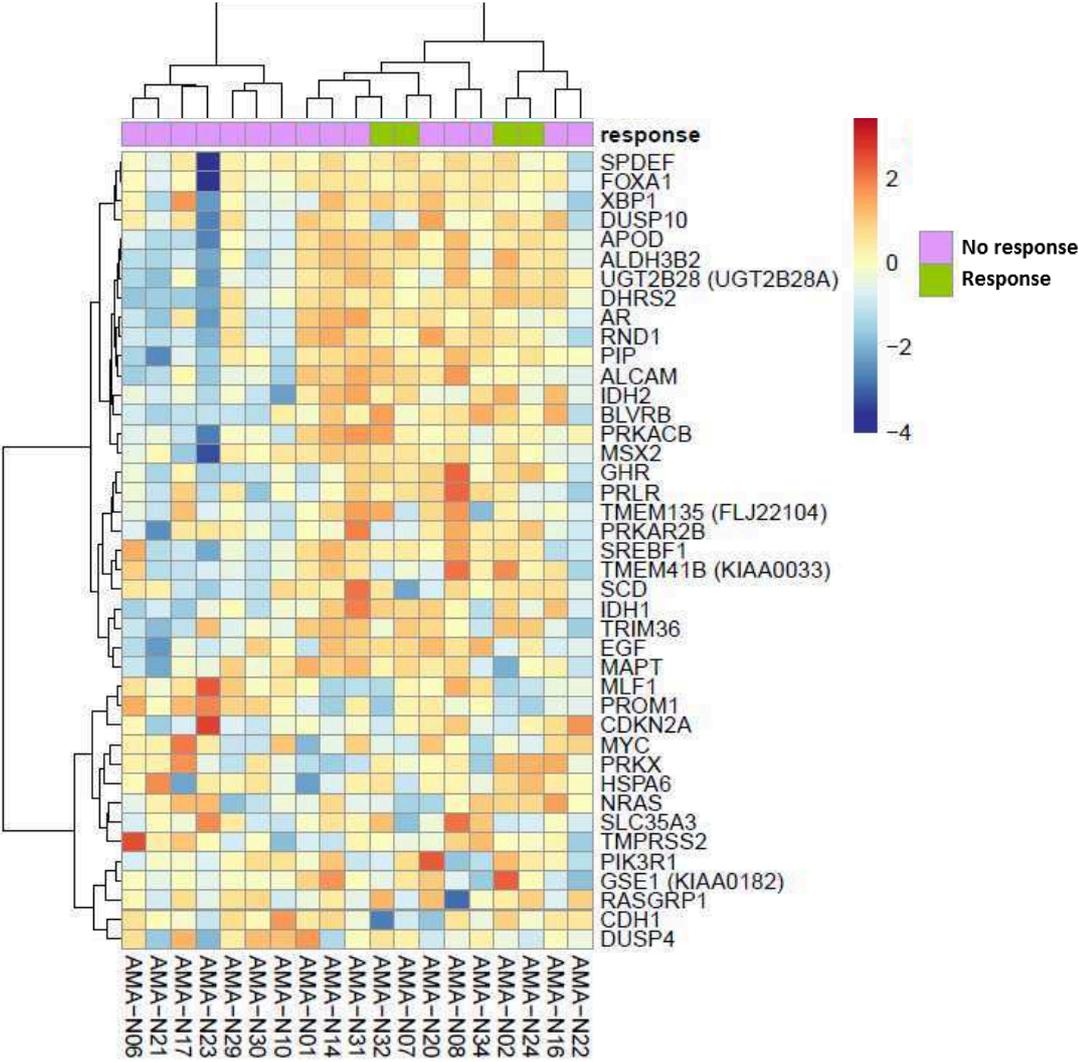
**Supplementary data**

**Supplementary figure S1. Flow chart of the sub-study of the UCBG 12-1 trial.**

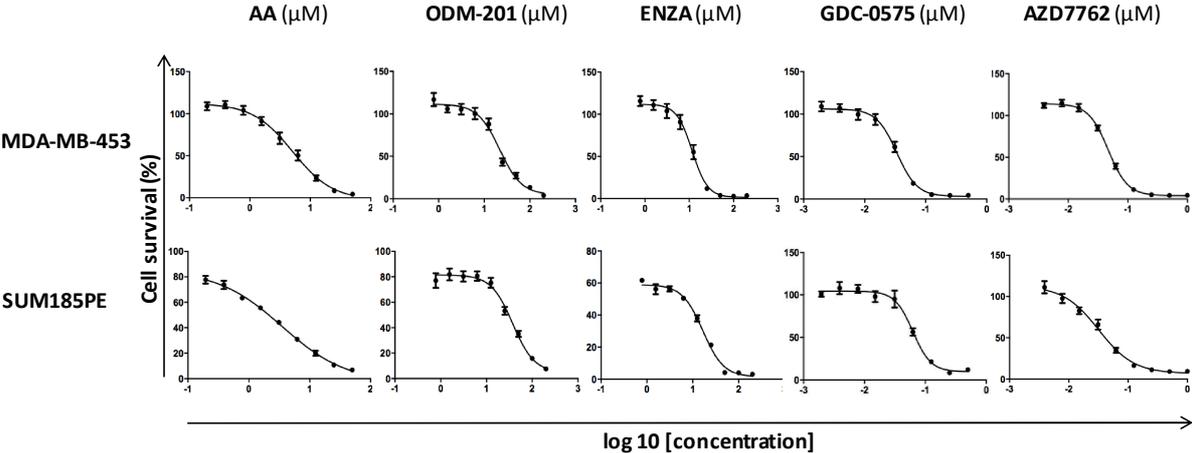
AR, androgen receptor; ER, estrogen receptor; PgR, progesterone receptor; AA, abiraterone acetate; TNBC, triple negative breast cancer; TMA, tissue microarray.



**Supplementary figure S2. Distribution of patients by response status based on a restricted list of 41 transcripts present in our custom NanoString panel and in the list of transcripts of the first two studies which identified the MA sub-type (1) and the class A sub-type (2). Non-supervised Heatmap of genes discriminating molecular apocrine versus basal tumors in the Farmer et al. and Doane et al. papers, n=41 genes, and present in the Nanostring PanCancer pathway panel.**



**Supplementary figure S3. Dose-response curves.** Cell viability assay using MTT. Representation of dose-response curves of monotherapy in the 2 cell lines (MDA-MB-453 and SUM185PE) used to calculate IC50s based on 9 serial dilutions of the tested drugs. Y-axis: Cell survival (%); X- axis: log 10 [concentration], n=3-4.



**Supplementary Table S1. Characteristics of patients included in the sub-study of the UCBG 12-1 trial. NA: data not available**

|  | <b>Responders (n=6)</b>    | <b>Non-Responders (n=22)</b>        |
|--|----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Age</b><br>Median (min-max)   | 76 (61-85)                 | 62 (39-86)                          |
| <b>Menopausal status</b><br>Pre-menopausal<br>Post-menopausal                  | 0 (0)<br>6 (100)           | 4 (18)<br>18 (82)                   |
| <b>ECOG</b><br>0<br>1<br>2   | 4 (66)<br>2 (34)<br>0 (0)  | 8 (36)<br>10 (46)<br>4 (18)         |
| <b>Histological type</b><br>Ductal<br>Lobular<br>Other                         | 3 (50)<br>1 (17)<br>2 (33) | 18 (82)<br>3 (14)<br>1 (4)          |
| <b>Apocrine morphological feature</b><br>No<br>Yes                             | 0<br>6 (100)               | 7 (34)<br>15 (66)                   |
| <b>Grade Elston &amp; Ellis</b><br>SBR1<br>SBR2<br>SBR3<br>SBRX (Non gradable) | 4 (66)<br>0<br>0<br>2 (34) | 1 (4)<br>7 (32)<br>13 (60)<br>1 (4) |
| <b>Metastatic</b><br>No<br>Yes   | 0<br>6 (100)               | 3 (14)<br>19 (86)                   |
| <b>Distant lymphatic nodes</b><br>No<br>Yes<br>NA                              | 6 (100)<br>0<br>0          | 12 (55)<br>9 (40)<br>1 (5)          |
| <b>Bone</b><br>No<br>Yes<br>NA   | 2 (33)<br>4 (67)<br>0      | 11 (49)<br>10 (46)<br>1 (5)         |
| <b>Liver</b><br>No<br>Yes<br>NA  | 6 (100)<br>0<br>0          | 15 (68)<br>6 (27)<br>1 (5)          |
| <b>Lung</b><br>No<br>Yes<br>NA   | 5 (84)<br>1 (16)<br>0      | 14 (63)<br>7 (32)<br>1 (5)          |
| <b>Central nervous system</b><br>No<br>NA                                      | 6 (100)<br>0               | 21 (95)<br>1 (5)                    |

|                                 |           |            |
|---------------------------------|-----------|------------|
| <b>Prior Chemotherapy</b>       |           |            |
| Adjuvant / Neo-adjuvant         | 3 (50)    | 18 (78)    |
| Metastatic medications          | 5 (84)    | 14 (64)    |
| <b>Tumor material available</b> |           |            |
| Primary                         | 2 (33)    | 14 (64)    |
| Metastasis                      | 4 (67)    | 8 (36)     |
| Biopsy                          | 2 (33)    | 8 (36)     |
| Surgical specimen               | 4 (67)    | 14(64)     |
| <b>Cellularity (mean, %)</b>    |           |            |
| TMA                             | 59% (n=4) | 58% (n=20) |
| DNA extraction                  | 61% (n=6) | 57% (n=20) |
| RNA extraction                  | 61% (n=4) | 51% (n=18) |

## Supplementary material 1. Antibody used for IHC assays.

| Antibody  | Clone    | Reference                     | Dilution   |
|---|----------|-------------------------------|------------|
| Androgen receptor                               | SP107    | Roche Ventana, 760-4605       | Prediluted |
| CCND1   | sp4R     | Roche Ventana, 790-4508       | Prediluted |
| CK14  | SP53     | Roche Ventana, 760-4805       | Prediluted |
| CK17  | sp95     | Roche Ventana, 790-4560       | Prediluted |
| CK5/6   | D5/16 B4 | Roche Ventana, 790-4554       | Prediluted |
| CK7   | SP52     | Roche Ventana, 790-4462       | Prediluted |
| EGFR  | 5B7      | Roche Ventana, 790-4347       | Prediluted |
| FOXA1   | 2F83     | ABCAM, ab40868                | 1/8000     |
| GATA3   | L50-823  | Diagomics, OM-C348458         | 1/250      |
| GCDFP15   | EP1582y  | Roche Ventana, 760-4386       | Prediluted |
| GGT1  | 1F9      | Sigma Aldrich, WH0002678M1    | 1/800      |
| KI-67   | 42643    | Roche Ventana, 790-4286       | Prediluted |
| L1CAM/CD171                                     | 42657    | Ozyme / Biolegend, 826701     | 1/50       |
| Phospho-p44/42 MAPK<br>(Erk1/2) (Thr202/Tyr204) | 20G11    | Ozyme / Cell Signaling, 4376s | 1/200      |
| P-S6 ribosomal protein<br>(Ser235/236)          | 91B2     | Ozyme / CellSignaling, 4857   | 1/100      |
| PTEN  | 138G6    | Ozyme / CellSignaling, 9559   | 1/100      |

**Supplementary material 2. List of genes used for DNA analyses by Next Generation Sequencing.**

| <b>Gene</b> | <b>NM</b>   |  | <b>Gene</b> | <b>NM</b>   |
|-------------|-------------|--|-------------|-------------|
| AGTR2       | NM_000686.4 |  | LAMA4       | NM_002290.4 |
| AKT1        | NM_005163.2 |  | LDLRAP1     | NM_015627.2 |
| AKT2        | NM_001626.5 |  | MAP2K1      | NM_002755.3 |
| AKT3        | NM_005465.4 |  | MAP2K4      | NM_003010.3 |
| ALK         | NM_004304.4 |  | MAP3K1      | NM_005921.1 |
| APAF1       | NM_181861.1 |  | MED1        | NM_004774.3 |
| APC         | NM_000038.5 |  | MET         | NM_000245.2 |
| AR          | NM_000044.3 |  | MTOR        | NM_004958.3 |
| ARID1A      | NM_006015.4 |  | MYB         | NM_005375.2 |
| BRAF        | NM_004333.4 |  | MYH9        | NM_002473.4 |
| BRCA1       | NM_007294.3 |  | MYO3A       | NM_017433.4 |
| BRCA2       | NM_000059.3 |  | NCOR1       | NM_006311.3 |
| CASP8       | NM_001228.4 |  | NF1         | NM_000267.3 |
| CBFB        | NM_001755.2 |  | NFE2L2      | NM_006164.3 |
| CDH1        | NM_004360.3 |  | NOTCH1      | NM_017617.3 |
| CDK4        | NM_000075.3 |  | NOTCH2      | NM_024408.3 |
| CDK6        | NM_001259.6 |  | NOTCH4      | NM_004557.3 |
| CDKN1B      | NM_004064.4 |  | NRAS        | NM_002524.4 |
| CDKN2A      | NM_000077.4 |  | PDGFRA      | NM_006206.4 |
| CHD4        | NM_001273.2 |  | PGR         | NM_000926.4 |
| CREBBP      | NM_004380.2 |  | PIK3CA      | NM_006218.2 |
| CTCF        | NM_006565.3 |  | PIK3R1      | NM_181523.2 |
| CTNNB1      | NM_001904.3 |  | POLE        | NM_006231.2 |
| DDR2        | NM_006182.2 |  | PPP2R1A     | NM_014225.5 |
| EGFR        | NM_005228.3 |  | PTEN        | NM_000314.4 |
| ERBB2       | NM_004448.3 |  | PTPN11      | NM_002834.3 |
| ERBB3       | NM_001982.3 |  | RAB40A      | NM_080879.2 |
| ERBB4       | NM_005235.2 |  | RB1         | NM_000321.2 |
| ESR1        | NM_000125.3 |  | RET         | NM_020975.4 |
| FBXW7       | NM_033632.3 |  | ROS1        | NM_002944.2 |
| FGFR1       | NM_023110.2 |  | RUNX1       | NM_001754.4 |
| FGFR2       | NM_000141.4 |  | SETD2       | NM_014159.6 |
| FGFR3       | NM_000142.4 |  | SF3B1       | NM_012433.2 |
| FGFR4       | NM_002011.4 |  | STAG2       | NM_006603.4 |
| FLT1        | NM_002019.4 |  | STK11       | NM_000455.4 |
| FOXA1       | NM_004496.3 |  | STMN2       | NM_007029.3 |
| GATA3       | NM_002051,2 |  | TBL1XR1     | NM_024665.4 |

|          |             |  |         |             |
|----------|-------------|--|---------|-------------|
| HIST1H3B | NM_003537.3 |  | TBX3    | NM_016569.3 |
| HRAS     | NM_005343.2 |  | THBS1   | NM_003246.2 |
| IGF1R    | NM_000875.4 |  | TP53    | NM_000546.4 |
| INPP4B   | NM_003866.2 |  | TP53BP1 | NM_005657.2 |
| KDR      | NM_002253.2 |  | TP73    | NM_005427.3 |
| KEAP1    | NM_012289.3 |  | TSC1    | NM_000368.4 |
| KIT      | NM_000222.2 |  | TSC2    | NM_000548.3 |
| KRAS     | NM_004985.4 |  | VHL     | NM_000551.3 |
| LAMA2    | NM_000426.3 |  |         |             |

**Supplementary material 3. List of the 760 transcripts used in the custom Nanostring panel for RNA analyses.**

| Gene     | NM             | Panel                              |
|----------|----------------|------------------------------------|
| ABL1     | NM_005157.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ACVR1B   | NM_004302.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ACVR1C   | NM_145259.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ACVR2A   | NM_001616.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| AKT1     | NM_005163.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| AKT2     | NM_001626.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| AKT3     | NM_181690.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ALK      | NM_004304.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ALKBH2   | NM_001001655.2 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ALKBH3   | NM_139178.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| AMER1    | NM_152424.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| AMH      | NM_000479.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ANGPT1   | NM_001146.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| APC      | NM_000038.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| APH1B    | NM_001145646.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| AR       | NM_001011645.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ARID1A   | NM_006015.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ARID1B   | NM_020732.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ARID2    | NM_152641.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ARNT2    | NM_014862.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ASXL1    | NM_001164603.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ATM      | NM_138292.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ATR      | NM_001184.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ATRX     | NM_000489.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| AXIN1    | NM_181050.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| AXIN2    | NM_004655.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| B2M      | NM_004048.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BAD      | NM_004322.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BAIAP3   | NM_003933.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BAMBI    | NM_012342.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BAP1     | NM_004656.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BAX      | NM_138761.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BCL2     | NM_000657.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BCL2A1   | NM_004049.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BCL2L1   | NM_138578.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BCOR     | NM_001123383.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BDNF     | NM_170732.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BID      | NM_197966.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BIRC3    | NM_182962.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BIRC7    | NM_022161.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BMP2     | NM_001200.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BMP4     | NM_001202.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BMP5     | NM_021073.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BMP6     | NM_001718.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BMP7     | NM_001719.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BMP8A    | NM_181809.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BMPR1B   | NM_001203.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BNIP3    | NM_004052.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BRAF     | NM_004333.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BRCA1    | NM_007305.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BRCA2    | NM_000059.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| BRIP1    | NM_032043.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| C19orf40 | NM_152266.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNA1C  | NM_199460.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNA1D  | NM_000720.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNA1E  | NM_000721.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNA1G  | NM_198397.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|          |                |                                    |
|----------|----------------|------------------------------------|
| CACNA1H  | NM_021098.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNA2D1 | NM_000722.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNA2D2 | NM_001005505.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNA2D3 | NM_018398.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNA2D4 | NM_001005737.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNB2   | NM_000724.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNB3   | NM_000725.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNB4   | NM_001005747.2 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNG1   | NM_000727.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNG4   | NM_014405.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CACNG6   | NM_145814.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CALML3   | NM_005185.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CALML5   | NM_017422.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CALML6   | NM_138705.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CAMK2B   | NM_001220.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CAPN2    | NM_001748.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CARD11   | NM_032415.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CASP10   | NM_032977.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CASP12   | NM_001191016.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CASP3    | NM_032991.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CASP7    | NM_001227.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CASP8    | NM_001228.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CASP9    | NM_001229.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CBL      | NM_005188.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CBLC     | NM_012116.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCNA1    | NM_003914.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCNA2    | NM_001237.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCNB1    | NM_031966.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCNB3    | NM_033671.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCND1    | NM_053056.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCND2    | NM_001759.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCND3    | NM_001760.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCNE1    | NM_001238.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCNE2    | NM_057735.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCNO     | NM_021147.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CCR7     | NM_001838.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CD14     | NM_000591.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CD19     | NM_001770.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CD40     | NM_001250.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDC14A   | NM_033313.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDC14B   | NM_003671.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDC25A   | NM_001789.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDC25B   | NM_021873.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDC25C   | NM_001790.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDC6     | NM_001254.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDC7     | NM_003503.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDH1     | NM_004360.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDK2     | NM_001798.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDK4     | NM_000075.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDK6     | NM_001259.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDKN1A   | NM_000389.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDKN1B   | NM_004064.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDKN1C   | NM_000076.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDKN2A   | NM_000077.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDKN2B   | NM_004936.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDKN2C   | NM_001262.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CDKN2D   | NM_001800.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CEBPA    | NM_004364.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CEBPE    | NM_001805.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CHAD     | NM_001267.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CHEK1    | NM_001114121.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CHEK2    | NM_007194.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CHUK     | NM_001278.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CIC      | NM_015125.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|          |                |                                    |
|----------|----------------|------------------------------------|
| CLCF1    | NM_013246.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CNTFR    | NM_147164.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL11A1  | NM_001854.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL11A2  | NM_001163771.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL1A1   | NM_000088.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL1A2   | NM_000089.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL24A1  | NM_152890.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL27A1  | NM_032888.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL2A1   | NM_001844.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL3A1   | NM_000090.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL4A3   | NM_000091.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL4A4   | NM_000092.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL4A5   | NM_033381.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL4A6   | NM_001847.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL5A1   | NM_000093.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL5A2   | NM_000393.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COL6A6   | NM_001102608.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| COMP     | NM_000095.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CREB3L1  | NM_052854.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CREB3L3  | NM_001271995.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CREB3L4  | NM_130898.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CREB5    | NM_182898.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CREBBP   | NM_004380.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CRLF2    | NM_001012288.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CSF1R    | NM_005211.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CSF2     | NM_000758.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CSF3     | NM_000759.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CSF3R    | NM_156038.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CTNNB1   | NM_001904.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CUL1     | NM_003592.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CXXC4    | NM_025212.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| CYLD     | NM_015247.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DAXX     | NM_001350.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DDB2     | NM_000107.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DDIT3    | NM_004083.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DDIT4    | NM_019058.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DKK1     | NM_012242.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DKK2     | NM_014421.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DKK4     | NM_014420.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DLL1     | NM_005618.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DLL3     | NM_203486.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DLL4     | NM_019074.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DNMT1    | NM_001379.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DNMT3A   | NM_022552.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DTX1     | NM_004416.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DTX3     | NM_178502.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DTX4     | NM_015177.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DUSP10   | NM_144728.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DUSP2    | NM_004418.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DUSP4    | NM_057158.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DUSP5    | NM_004419.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DUSP6    | NM_001946.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| DUSP8    | NM_004420.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| E2F1     | NM_005225.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| E2F5     | NM_001951.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EFNA1    | NM_004428.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EFNA2    | NM_001405.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EFNA3    | NM_004952.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EFNA5    | NM_001962.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EGF      | NM_001963.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EGFR     | NM_201282.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EIF4EBP1 | NM_004095.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ENDOG    | NM_004435.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EP300    | NM_001429.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|       |                |                                    |
|-------|----------------|------------------------------------|
| EPHA2 | NM_004431.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EPO   | NM_000799.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EPOR  | NM_000121.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ERBB2 | NM_004448.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ERCC2 | NM_000400.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ERCC6 | NM_000124.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ETS2  | NM_005239.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ETV1  | NM_004956.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ETV4  | NM_001079675.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ETV7  | NM_016135.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EYA1  | NM_172059.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| EZH2  | NM_004456.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FANCA | NM_000135.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FANCB | NM_152633.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FANCC | NM_000136.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FANCE | NM_021922.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FANCF | NM_022725.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FANCG | NM_004629.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FANCL | NM_001114636.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FAS   | NM_152876.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FASLG | NM_000639.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FBXW7 | NM_018315.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FEN1  | NM_004111.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF1  | NM_033137.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF10 | NM_004465.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF11 | NM_004112.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF12 | NM_004113.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF13 | NM_033642.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF14 | NM_004115.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF16 | NM_003868.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF17 | NM_003867.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF18 | NM_003862.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF19 | NM_005117.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF2  | NM_002006.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF20 | NM_019851.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF21 | NM_019113.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF22 | NM_020637.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF23 | NM_020638.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF3  | NM_005247.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF4  | NM_002007.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF5  | NM_004464.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF6  | NM_020996.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF7  | NM_002009.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF8  | NM_033163.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGF9  | NM_002010.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGFR1 | NM_015850.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGFR2 | NM_000141.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGFR3 | NM_022965.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FGFR4 | NM_002011.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FIGF  | NM_004469.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FLNA  | NM_001456.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FLNC  | NM_001127487.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FLT1  | NM_002019.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FLT3  | NM_004119.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FN1   | NM_212482.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FOS   | NM_005252.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FOSL1 | NM_005438.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FOXL2 | NM_023067.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FOXO4 | NM_005938.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FST   | NM_006350.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FUBP1 | NM_003902.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FUT8  | NM_004480.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FZD10 | NM_007197.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FZD2  | NM_001466.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|          |                |                                    |
|----------|----------------|------------------------------------|
| FZD3     | NM_017412.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FZD7     | NM_003507.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FZD8     | NM_031866.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| FZD9     | NM_003508.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GADD45A  | NM_001924.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GADD45B  | NM_015675.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GADD45G  | NM_006705.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GAS1     | NM_002048.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GATA1    | NM_002049.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GATA2    | NM_032638.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GATA3    | NM_001002295.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GDF6     | NM_001001557.2 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GHR      | NM_000163.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GLI1     | NM_005269.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GLI3     | NM_000168.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GNA11    | NM_002067.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GNAQ     | NM_002072.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GNAS     | NM_080425.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GNG12    | NM_018841.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GNG4     | NM_004485.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GNG7     | NM_052847.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GNGT1    | NM_021955.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GPC4     | NM_001448.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GRB2     | NM_002086.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GRIA3    | NM_000828.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GRIN1    | NM_000832.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GRIN2A   | NM_000833.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GRIN2B   | NM_000834.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GSK3B    | NM_002093.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GTF2H3   | NM_001516.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| GZMB     | NM_004131.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| H2AFX    | NM_002105.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| H3F3A    | NM_002107.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| H3F3C    | NM_001013699.2 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HDAC1    | NM_004964.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HDAC10   | NM_032019.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HDAC11   | NM_024827.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HDAC2    | NM_001527.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HDAC4    | NM_006037.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HDAC5    | NM_005474.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HDAC6    | NM_006044.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HELLS    | NM_018063.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HES1     | NM_005524.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HES5     | NM_001010926.3 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HGF      | NM_000601.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HHEX     | NM_002729.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HHIP     | NM_022475.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HIST1H3B | NM_003537.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HIST1H3G | NM_003534.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HIST1H3H | NM_003536.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HMGA1    | NM_145904.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HMGA2    | NM_003484.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HNF1A    | NM_000545.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HOXA10   | NM_018951.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HOXA11   | NM_005523.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HOXA9    | NM_152739.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HPGD     | NM_001145816.2 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HRAS     | NM_005343.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HSP90B1  | NM_003299.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HSPA1A   | NM_005345.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HSPA2    | NM_021979.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HSPA6    | NM_002155.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| HSPB1    | NM_001540.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IBSP     | NM_004967.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|         |                |                                    |
|---------|----------------|------------------------------------|
| ID1     | NM_002165.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ID2     | NM_002166.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ID4     | NM_001546.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IDH1    | NM_005896.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IDH2    | NM_002168.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IFNA17  | NM_021268.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IFNA2   | NM_000605.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IFNA7   | NM_021057.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IFNG    | NM_000619.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IGF1    | NM_000618.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IGF1R   | NM_000875.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IGFBP3  | NM_000598.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IKKB    | NM_001556.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IKBK    | NM_003639.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL10    | NM_000572.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL11    | NM_000641.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL11RA  | NM_147162.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL12A   | NM_000882.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL12B   | NM_002187.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL12RB2 | NM_001559.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL13    | NM_002188.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL13RA2 | NM_000640.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL15    | NM_172174.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL19    | NM_013371.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL1A    | NM_000575.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL1B    | NM_000576.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL1R1   | NM_000877.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL1R2   | NM_173343.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL1RAP  | NM_002182.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL2ORA  | NM_014432.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL2ORB  | NM_144717.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL22RA1 | NM_021258.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL22RA2 | NM_181309.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL23A   | NM_016584.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL23R   | NM_144701.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL24    | NM_181339.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL2RA   | NM_000417.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL2RB   | NM_000878.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL3     | NM_000588.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL3RA   | NM_002183.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL5RA   | NM_000564.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL6     | NM_000600.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL6R    | NM_000565.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL7     | NM_000880.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL7R    | NM_002185.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IL8     | NM_000584.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| INHBA   | NM_002192.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| INHBB   | NM_002193.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IRAK2   | NM_001570.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IRAK3   | NM_007199.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| IRS1    | NM_005544.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGA2   | NM_002203.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGA3   | NM_005501.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGA6   | NM_000210.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGA7   | NM_002206.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGA8   | NM_003638.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGA9   | NM_002207.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGB3   | NM_000212.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGB4   | NM_001005731.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGB6   | NM_001282353.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGB7   | NM_000889.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ITGB8   | NM_002214.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| JAG1    | NM_000214.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| JAG2    | NM_145159.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|          |                |                                    |
|----------|----------------|------------------------------------|
| JAK1     | NM_002227.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| JAK2     | NM_004972.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| JAK3     | NM_000215.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| JUN      | NM_002228.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| KAT2B    | NM_003884.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| KDM5C    | NM_004187.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| KDM6A    | NM_021140.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| KIT      | NM_000222.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| KITLG    | NM_003994.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| KLF4     | NM_004235.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| KMT2C    | NM_170606.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| KMT2D    | NM_003482.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| KRAS     | NM_004985.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LAMA1    | NM_005559.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LAMA3    | NM_000227.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LAMA5    | NM_005560.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LAMB3    | NM_000228.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LAMB4    | NM_007356.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LAMC2    | NM_005562.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LAMC3    | NM_006059.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LAT      | NM_001014987.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LEF1     | NM_016269.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LEFTY1   | NM_020997.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LEFTY2   | NM_003240.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LEP      | NM_000230.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LEPR     | NM_001003679.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LFNG     | NM_001040168.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LIF      | NM_002309.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LIFR     | NM_002310.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LIG4     | NM_002312.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LRP2     | NM_004525.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| LTBP1    | NM_000627.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAD2L2   | NM_001127325.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAML2    | NM_032427.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAP2K1   | NM_002755.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAP2K2   | NM_030662.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAP2K4   | NM_003010.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAP2K6   | NM_002758.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAP3K1   | NM_005921.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAP3K12  | NM_006301.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAP3K13  | NM_004721.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAP3K14  | NM_003954.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAP3K5   | NM_005923.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAP3K8   | NM_005204.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAPK1    | NM_138957.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAPK10   | NM_002753.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAPK12   | NM_002969.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAPK3    | NM_001040056.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAPK8    | NM_002750.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAPK8IP1 | NM_005456.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAPK8IP2 | NM_012324.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAPK9    | NM_139068.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MAPT     | NM_016834.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MCM2     | NM_004526.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MCM4     | NM_182746.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MCM5     | NM_006739.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MCM7     | NM_182776.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MDC1     | NM_014641.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MDM2     | NM_006878.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MECOM    | NM_005241.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MED12    | NM_005120.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MEN1     | NM_130802.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MET      | NM_000245.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MFNG     | NM_002405.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|        |                |                                    |
|--------|----------------|------------------------------------|
| MGMT   | NM_002412.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MLF1   | NM_022443.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MLH1   | NM_000249.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MLL2   | NM_004529.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MLL4   | NM_005936.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MMP3   | NM_002422.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MMP7   | NM_002423.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MMP9   | NM_004994.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MNAT1  | NM_002431.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MPL    | NM_005373.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MPO    | NM_000250.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MSH2   | NM_000251.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MSH6   | NM_000179.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MTOR   | NM_004958.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MUTYH  | NM_012222.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MYB    | NM_005375.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MYC    | NM_002467.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MYCN   | NM_005378.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| MYD88  | NM_002468.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NASP   | NM_172164.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NBN    | NM_001024688.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NCOR1  | NM_006311.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NF1    | NM_000267.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NF2    | NM_181828.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NFATC1 | NM_172389.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NFE2L2 | NM_006164.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NFKB1  | NM_003998.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NFKBIA | NM_020529.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NFKBIZ | NM_001005474.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NGF    | NM_002506.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NGFR   | NM_002507.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NKD1   | NM_033119.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NODAL  | NM_018055.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NOG    | NM_005450.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NOS3   | NM_000603.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NOTCH1 | NM_017617.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NOTCH2 | NM_024408.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NOTCH3 | NM_000435.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NPM1   | NM_002520.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NPM2   | NM_182795.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NR4A1  | NM_173157.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NR4A3  | NM_173198.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NRAS   | NM_002524.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NSD1   | NM_022455.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NTF3   | NM_002527.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NTHL1  | NM_002528.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NTRK1  | NM_001012331.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NTRK2  | NM_001007097.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NUMBL  | NM_004756.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| NUPR1  | NM_001042483.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| OSM    | NM_020530.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PAK3   | NM_002578.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PAK7   | NM_177990.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PAX3   | NM_013942.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PAX5   | NM_016734.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PAX8   | NM_013953.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PBRM1  | NM_181042.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PBX1   | NM_002585.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PBX3   | NM_006195.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PCK1   | NM_002591.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PCNA   | NM_002592.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PDGFA  | NM_002607.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PDGFB  | NM_033016.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PDGFC  | NM_016205.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|          |                |                                    |
|----------|----------------|------------------------------------|
| PDGFD    | NM_025208.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PDGFRA   | NM_006206.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PDGFRB   | NM_002609.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PGF      | NM_002632.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PHF6     | NM_032335.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PIK3CA   | NM_006218.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PIK3CB   | NM_006219.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PIK3CD   | NM_005026.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PIK3CG   | NM_002649.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PIK3R1   | NM_181504.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PIK3R2   | NM_005027.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PIK3R3   | NM_003629.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PIK3R5   | NM_001142633.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PIM1     | NM_002648.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PITX2    | NM_000325.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PKMYT1   | NM_004203.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLA1A    | NM_015900.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLA2G10  | NM_003561.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLA2G2A  | NM_000300.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLA2G3   | NM_015715.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLA2G4A  | NM_024420.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLA2G4C  | NM_003706.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLA2G4E  | NM_001206670.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLA2G4F  | NM_213600.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLA2G5   | NM_000929.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLAT     | NM_000931.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLAU     | NM_002658.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLCB1    | NM_182734.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLCB4    | NM_000933.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLCE1    | NM_001165979.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLCG2    | NM_002661.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PLD1     | NM_002662.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PML      | NM_002675.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| POLB     | NM_002690.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| POLD1    | NM_002691.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| POLD4    | NM_021173.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| POLE2    | NM_002692.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| POLR2D   | NM_004805.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| POLR2H   | NM_001278698.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| POLR2J   | NM_006234.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPARG    | NM_015869.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPARGC1A | NM_013261.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPP2CB   | NM_001009552.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPP2R1A  | NM_014225.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPP2R2B  | NM_181676.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPP2R2C  | NM_181876.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPP3CA   | NM_000944.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPP3CB   | NM_001142354.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPP3CC   | NM_005605.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPP3R1   | NM_000945.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PPP3R2   | NM_147180.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRDM1    | NM_182907.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKAA2   | NM_006252.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKACA   | NM_002730.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKACB   | NM_182948.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKACG   | NM_002732.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKAR1B  | NM_001164759.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKAR2A  | NM_004157.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKAR2B  | NM_002736.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKCA    | NM_002737.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKCB    | NM_212535.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKCG    | NM_002739.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKDC    | NM_006904.6    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRKX     | NM_005044.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|         |                |                                    |
|---------|----------------|------------------------------------|
| PRL     | NM_000948.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRLR    | NM_001204318.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PRMT8   | NM_019854.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PROM1   | NM_006017.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PTCH1   | NM_000264.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PTCRA   | NM_138296.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PTEN    | NM_000314.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PTPN11  | NM_002834.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PTPN5   | NM_001039970.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PTPRR   | NM_001207015.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| PTTG2   | NM_006607.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RAC1    | NM_198829.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RAC2    | NM_002872.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RAC3    | NM_005052.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RAD21   | NM_006265.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RAD50   | NM_005732.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RAD51   | NM_133487.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RAD52   | NM_134424.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RAF1    | NM_002880.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RASA4   | NM_001079877.2 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RASAL1  | NM_004658.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RASGRF1 | NM_153815.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RASGRF2 | NM_006909.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RASGRP1 | NM_005739.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RASGRP2 | NM_001098670.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RB1     | NM_000321.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RBX1    | NM_014248.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RELA    | NM_021975.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RELN    | NM_005045.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RET     | NM_020630.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RFC3    | NM_002915.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RFC4    | NM_181573.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RHOA    | NM_001664.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RIN1    | NM_004292.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RNF43   | NM_017763.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RPA3    | NM_002947.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RPS27A  | NM_002954.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RPS6KA5 | NM_004755.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RPS6KA6 | NM_014496.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RRAS2   | NM_001102669.2 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RUNX1   | NM_001754.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RUNX1T1 | NM_004349.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| RXRG    | NM_006917.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SETBP1  | NM_015559.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SETD2   | NM_014159.6    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SF3B1   | NM_001005526.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SFN     | NM_006142.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SFRP1   | NM_003012.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SFRP2   | NM_003013.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SFRP4   | NM_003014.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SGK2    | NM_170693.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SHC1    | NM_183001.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SHC2    | NM_012435.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SHC3    | NM_016848.5    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SHC4    | NM_203349.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SIN3A   | NM_015477.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SIRT4   | NM_012240.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SIX1    | NM_005982.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SKP1    | NM_170679.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SKP2    | NM_005983.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SMAD2   | NM_001003652.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SMAD3   | NM_005902.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SMAD4   | NM_005359.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SMAD9   | NM_005905.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|           |                |                                    |
|-----------|----------------|------------------------------------|
| SMARCA4   | NM_003072.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SMARCB1   | NM_003073.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SMC1A     | NM_006306.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SMC1B     | NM_148674.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SMC3      | NM_005445.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SMO       | NM_005631.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SOCS1     | NM_003745.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SOCS2     | NM_003877.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SOCS3     | NM_003955.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SOS1      | NM_005633.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SOS2      | NM_006939.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SOST      | NM_025237.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SOX17     | NM_022454.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SOX9      | NM_000346.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SP1       | NM_003109.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SPOP      | NM_001007226.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SPP1      | NM_000582.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SPRY1     | NM_005841.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SPRY2     | NM_005842.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SPRY4     | NM_030964.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SRSF2     | NM_003016.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SSX1      | NM_005635.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| STAG2     | NM_001042749.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| STAT1     | NM_007315.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| STAT3     | NM_139276.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| STAT4     | NM_003151.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| STK11     | NM_000455.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| STMN1     | NM_203401.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SUV39H2   | NM_024670.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| SYK       | NM_003177.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TBL1XR1   | NM_024665.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TCF3      | NM_003200.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TCF7L1    | NM_031283.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TCL1B     | NM_004918.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TET2      | NM_001127208.2 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TFDP1     | NM_007111.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TGFB1     | NM_000660.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TGFB2     | NM_003238.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TGFB3     | NM_003239.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TGFBR2    | NM_001024847.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| THBS1     | NM_003246.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| THBS4     | NM_003248.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| THEM4     | NM_053055.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TIAM1     | NM_003253.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TLR2      | NM_003264.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TLR4      | NM_138554.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TLX1      | NM_005521.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TMPRSS2   | NM_005656.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TNC       | NM_002160.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TNF       | NM_000594.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TNFAIP3   | NM_006290.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TNFRSF10A | NM_003844.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TNFRSF10B | NM_003842.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TNFRSF10C | NM_003841.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TNFRSF10D | NM_003840.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TNFSF10   | NM_003810.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TNN       | NM_022093.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TNR       | NM_003285.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TP53      | NM_000546.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TPO       | NM_175722.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TRAF7     | NM_032271.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TSC1      | NM_000368.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TSHR      | NM_001018036.2 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TSLP      | NM_033035.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |

|                       |                |                                    |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|
| TSPAN7                | NM_004615.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| TTK                   | NM_003318.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| U2AF1                 | NM_001025203.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| UBB                   | NM_018955.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| UBE2T                 | NM_014176.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| UTY                   | NM_007125.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| VEGFA                 | NM_001025366.1 | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| VEGFC                 | NM_005429.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| VHL                   | NM_000551.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WEE1                  | NM_003390.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WHSC1                 | NM_007331.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WHSC1L1               | NM_017778.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WIF1                  | NM_007191.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT10A                | NM_025216.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT10B                | NM_003394.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT11                 | NM_004626.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT16                 | NM_057168.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT2                  | NM_003391.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT2B                 | NM_024494.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT3                  | NM_030753.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT4                  | NM_030761.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT5A                 | NM_003392.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT5B                 | NM_032642.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT6                  | NM_006522.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT7A                 | NM_004625.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WNT7B                 | NM_058238.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| WT1                   | NM_000378.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| XPA                   | NM_000380.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| XRCC4                 | NM_003401.3    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ZAK                   | NM_016653.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ZBTB16                | NM_006006.4    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ZBTB32                | NM_014383.1    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| ZIC2                  | NM_007129.2    | nCounter Pan-Cancer Pathways Panel |
| AGR2                  | NM_006408      | Custum panel                       |
| ALCAM                 | NM_001627      | Custum panel                       |
| ALDH3B2               | NM_000695      | Custum panel                       |
| APOD                  | NM_001647      | Custum panel                       |
| BLVRB                 | NM_000713      | Custum panel                       |
| CYB5A (CYB5)          | NM_001914      | Custum panel                       |
| DHRS2                 | NM_182908      | Custum panel                       |
| ECI2 (PECI)           | NM_006117      | Custum panel                       |
| ERBB3                 | NM_001982      | Custum panel                       |
| ESR1                  | NM_001328100   | Custum panel                       |
| ESRP2 (FLJ21918)      | NM_024939      | Custum panel                       |
| FASN                  | NM_004104      | Custum panel                       |
| FOXA1                 | NM_004496      | Custum panel                       |
| GSE1 (KIAA0182)       | NM_014615      | Custum panel                       |
| IRX5                  | NM_005853      | Custum panel                       |
| MSX2                  | NM_002449      | Custum panel                       |
| NR3C1                 | NM_000176      | Custum panel                       |
| PGR                   | NM_000926      | Custum panel                       |
| PIP                   | NM_002652      | Custum panel                       |
| RND1                  | NM_014470      | Custum panel                       |
| SCD                   | NM_005063      | Custum panel                       |
| SLC35A3               | NM_012243      | Custum panel                       |
| SPDEF                 | NM_012391      | Custum panel                       |
| SREBF1                | NM_004176      | Custum panel                       |
| TFF3                  | NM_003226      | Custum panel                       |
| TMEM135<br>(FLJ22104) | NM_022918      | Custum panel                       |
| TMEM41B<br>(KIAA0033) | NM_015012      | Custum panel                       |
| TRIM36                | NM_018700      | Custum panel                       |
| UGT2B28               | NM_053039      | Custum panel                       |

|            |           |              |
|------------|-----------|--------------|
| (UGT2B28A) |           |              |
| XBP1       | NM_005080 | Custum panel |

| <b>Internal Reference Genes from nCounter Pan-Cancer Pathways Panel</b> |                |
|---|----------------|
| ACAD9   | NM_014049.4    |
| AGK   | NM_018238.3    |
| AMMECR1L  | NM_001199140.1 |
| C10orf76  | NM_024541.2    |
| CC2D1B  | NM_032449.2    |
| CNOT10  | NM_001256741.1 |
| CNOT4   | NM_001190848.1 |
| COG7  | NM_153603.3    |
| DDX50   | NM_024045.1    |
| DHX16   | NM_001164239.1 |
| DNAJC14   | NM_032364.5    |
| EDC3  | NM_001142443.1 |
| EIF2B4  | NM_172195.3    |
| ERCC3   | NM_000122.1    |
| FCF1  | NM_015962.4    |
| FTSJ2   | NM_013393.1    |
| GPATCH3   | NM_022078.2    |
| HDAC3   | NM_003883.2    |
| MRPS5   | NM_031902.3    |
| MTMR14  | NM_022485.3    |
| NOL7  | NM_016167.3    |
| NUBP1   | NM_001278506.1 |
| PIAS1   | NM_016166.1    |
| PIK3R4  | NM_014602.1    |
| PRPF38A   | NM_032864.3    |
| RBM45   | NM_152945.2    |
| SAP130  | NM_024545.3    |
| SF3A3   | NM_006802.2    |
| SLC4A1AP  | NM_018158.2    |
| TLK2  | NM_006852.2    |
| TMUB2   | NM_024107.2    |
| TRIM39  | NM_021253.3    |
| TTC31   | NR_027749.1    |
| USP39   | NM_001256725.1 |
| VPS33B  | NM_018668.3    |
| ZC3H14  | NM_001160103.1 |
| ZKSCAN5   | NM_014569.3    |
| ZNF143  | NM_003442.5    |
| ZNF346  | NM_012279.2    |
| ZNF384  | NM_133476.3    |

## Discussion et perspectives

---

En 2015, Farmer et al. (32) ont isolé un groupe de tumeurs mammaires présentant un profil d'expression caractérisé par une prédominance de gènes de la voie des androgènes mais également des gènes classiquement exprimés dans les tumeurs lumineales (RE+). Pour autant ces tumeurs n'expriment pas les récepteurs aux œstrogènes, marqueurs classiques des tumeurs lumineales. Il faut noter que certaines tumeurs moléculaires apocrines surexpriment HER2 ; nous ne nous sommes intéressés dans cette thèse qu'aux tumeurs HER2 négatives. En effet, les tumeurs HER2 positives/amplifiées bénéficient en pratique de traitements ciblés anti-HER2 nombreux et efficaces (31).

Les tumeurs moléculaires apocrines n'exprimant pas HER2 étaient jusque-là classées avec les tumeurs basales et corrélées aux tumeurs triple négatives en immunohistochimie (RE, RP, HER2 négatifs). Farmer et al. (32) ont démontré les différences de profil d'expression entre tumeurs basales (RE-, RA-) et moléculaires apocrines (RE-, RA+).

Ce nouveau sous-ensemble de tumeurs, récepteurs œstrogènes et progestérone négatifs, est unique notamment par la signalisation accrue de différentes voies relatives aux androgènes. De manière indépendante, les chercheurs de *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* ont identifié un sous-groupe tumoral similaire, défini par la négativité des récepteurs hormonaux (RE et RP), une forte expression du RA et un programme transcriptionnel hormono-dépendant (36). Ce travail a confirmé la description initiale de Farmer al. (32) et valide donc ce nouveau sous-groupe de tumeurs triple négatives. Ces tumeurs ont été dénommées 'moléculaires apocrines' du fait de la prépondérance des caractéristiques apocrines en anatomopathologie (32,33).

La détermination du statut des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone a une importance majeure dans la prise en charge du cancer du sein en tant que facteur pronostique. Le RE est exprimé dans plus de 60% des cancers du sein et représente une cible thérapeutique fondamentale dans le traitement de cette pathologie (294). Alors que plus de 70% des cancers du sein expriment le RA, aucune implication clinique n'est reconnue actuellement, conduisant à sa non-réalisation en pratique clinique de routine.

La description du sous-groupe moléculaire apocrine a amené à l'apparition d'une littérature florissante sur le rôle du récepteur aux androgènes et sur les possibilités thérapeutiques spécifiques à ce sous-groupe tumoral. Cet intérêt rappelle celui existant par ailleurs depuis longtemps dans le cancer de la prostate (295). Les travaux dans les tumeurs moléculaires apocrines ont mis en lumière le rôle du RA dans la pathogénicité de ces tumeurs mammaires, avec de potentielles implications pronostiques et thérapeutiques. Le rôle fonctionnel et central du RA a été confirmé par des études *in vitro* utilisant principalement la lignée de cancer du sein MDA-MB-453 mais aussi d'autres lignées présentant un profil moléculaire apocrine similaire à celui décrit par les études transcriptomiques initiales (36).

Dans ces lignées, les œstrogènes n'ont aucune influence significative sur la croissance des cellules et les anti-œstrogènes n'altèrent pas non plus la croissance cellulaire. Ceci suggère que ce sous-type est indépendant des œstrogènes malgré son programme transcriptomique proche des tumeurs lumorales œstrogènes-dépendantes (36). L'exposition à différents androgènes induit par contre une majoration de la prolifération cellulaire qui peut alors être abrogée par un antagoniste du RA (36).

Le standard actuel de traitement pour les tumeurs triple négatives avancées (métastatiques ou inopérables), dont les tumeurs moléculaires apocrines (HER2 négatives), repose sur des chimiothérapies cytotoxiques non ciblées. Compte tenu du pronostic médiocre des femmes présentant une tumeur moléculaire apocrine, (35% de rechute métastatique à 5 ans dans une série publiée par Guedj et al. (37)), le besoin de thérapies spécifiques basées sur la physiopathologie tumorale s'avère nécessaire. Le rôle central de l'expression du RA a conduit à l'utilisation de traitements anti-androgènes par analogie aux cancers de prostate avancés qui présentent eux aussi une grande dépendance vis-à-vis du RA et des androgènes. L'avantage de ces traitements de type hormonothérapie repose sur leur efficacité, leur bonne tolérance et le recul important d'utilisation décrit dans les cancers de prostate (296).

Ces dernières années, plusieurs essais cliniques ont démontré l'activité des anti-androgènes dans les tumeurs moléculaires apocrines avancées (122–124).

Néanmoins, ces résultats encourageants ne doivent pas faire oublier la diversité de situations cliniques et de réponse à l'intérieur de ce sous-groupe. Le taux important d'absence de bénéfice clinique aux anti-androgènes met en lumière le manque d'identification de facteur prédictif de réponse pour permettre une meilleure sélection des patientes à traiter.

Notre groupe a réalisé un essai clinique de phase 2, proposant l'acétate d'abiratérone chez des patientes présentant un cancer du sein moléculaire apocrine (triple négatif RA+), localement avancé ou métastatique, avec un taux de bénéfice clinique de 20% à 6 mois. L'abiratérone est une molécule bien connue dans le cancer de la prostate métastatique en phase avancée avec une autorisation de mise sur le marché qui vient d'être élargie aux maladies métastatiques hormono-naïves (213–215). Ce traitement agit comme un inhibiteur de la synthèse intracellulaire d'androgènes, par inhibition de l'enzyme CYP17 (207). L'efficacité limitée établie dans cette étude de l'abiratérone et l'arrivée de nouveaux traitements anti-androgènes, comme l'ODM-201 ou l'ARN-509, met en lumière la nécessité de fournir des preuves d'efficacité préclinique sur des modèles robustes. Il y a également nécessité de chercher à améliorer la sélection des patientes à traiter avec ces molécules ; c'est à dire identifier des facteurs prédictifs de réponse.

L'objectif principal des travaux rapportés dans cette thèse est d'améliorer la prise en charge des tumeurs moléculaires apocrines par la compréhension des mécanismes de sensibilité aux anti-androgènes. Nous avons ainsi décrit l'activité d'un nouveau traitement anti-androgène et conduit une réflexion sur les modèles d'études précliniques disponibles dans ce sous-type tumoral. Par ailleurs, nous avons identifié des facteurs permettant d'envisager une meilleure identification des patientes à risque de réponse à un anti-androgène spécifique, l'abiratérone, ainsi que des facteurs de potentialisation de l'effet de l'abiratérone pour augmenter les taux de réponse clinique à ce traitement.

## La lignée MDA-MB-453 : un modèle classique mais limité

Dans le premier projet de cette thèse, nous avons cherché à caractériser les conditions de culture du modèle d'étude préclinique classique de tumeurs moléculaires apocrines, la lignée MDA-MB-453, dans le but d'étudier l'effet d'un nouveau traitement anti-androgène. Cette première partie nous a semblé nécessaire au vu des limites soulevées dans la littérature par ce modèle cellulaire, censé reproduire un groupe tumoral dépendant du RA et stimulé par les androgènes (36,90,125,153).

L'ODM-201 est un antagoniste non-stéroïdien de haute affinité du récepteur des androgènes, qui est en développement clinique dans le cancer de la prostate (220,222). Cette molécule est développée par le laboratoire BAYER HealthCare avec lequel nous avons entamé une collaboration. La démonstration d'une activité préclinique spécifique de ce nouvel anti-androgène dans la lignée cellulaire MDA-MB-453 s'inscrit dans un programme de recherche préclinique et clinique ayant pour but de réaliser une étude thérapeutique évaluant cet agent chez les patientes atteintes de cancer du sein moléculaire apocrine.

Le début de nos expériences a donc été consacré à l'étude de la lignée cellulaire modèle des tumeurs moléculaires apocrines. La littérature est de prime abord relativement consensuelle et unanime sur l'androgéno-dépendance de la croissance de cette lignée MDA-MB-453. Néanmoins, l'étude plus approfondie de ces résultats est en faveur d'une faible amplitude de l'effet de cette dépendance (36,90,125,153). Cette lignée cellulaire est classiquement cultivée dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), complété par 10% de sérum de veau foetal (SVF). Ce dernier contient une quantité non vérifiée d'androgènes. Cette quantité est également non stable d'un lot de sérum à l'autre.

Le but de ce projet étant d'étudier l'effet du nouvel anti-androgène à notre disposition, l'ODM-201, la première étape nécessaire nous a donc semblé être la vérification de l'androgéno-dépendance de notre modèle d'étude. Pour ce faire, un milieu d'étude possédant un taux d'androgènes contrôlé est nécessaire. Afin de contourner la problématique du taux non contrôlé d'androgènes dans le SVF, des

milieux spécifiques sont classiquement utilisés. Ainsi, dans la littérature, pour éviter cette trop grande compétition, le milieu DMEM complétement avec un sérum déplété en androgènes par du charbon actif dit '*charcoal stripped serum*' est utilisé (36,150). Au contraire, pour les expériences visant à prouver l'efficacité d'un anti-androgène antagoniste du RA, un milieu contenant une certaine quantité d'androgènes est alors nécessaire pour reproduire aussi physiologiquement que possible la présence d'hormones stéroïdes présentent chez les femmes.

Nous avons cherché dans un premier temps à démontrer l'androgéno-dépendance de nos modèles d'études. Nos expériences en milieu complétement avec du sérum *Charcoal stripped* n'ont pas permis de reproduire les résultats publiés dans ces conditions particulières déplétées en hormones (36,150). Ces expériences ont montré que les cellules perdaient en quelques jours leurs capacités à se multiplier et changeaient de phénotype visuellement, aussi bien sur la lignée MDA-MB-453 que sur l'autre modèle cellulaire moléculaire apocrine, la lignée SUM185PE. Cette perte de viabilité n'était pas reversée par l'adjonction d'androgènes exogènes. Nous pouvons expliquer ce résultat par la déplétion du sérum induite par le charbon activé qui entraîne probablement une perte d'autres molécules nécessaires à la survie cellulaire, notamment des facteurs de croissance, comme déjà rapporté (297). Il ne nous a donc pas semblé opportun d'utiliser ces conditions pour démontrer l'androgéno-dépendance de nos modèles du fait de l'altération phénotypique de nos cellules et ce, malgré l'utilisation de différents types de *Charcoal Stripped serum*. Le premier utilisé était commercial, le deuxième était réalisé par nos soins à partir du sérum commercial classique et selon les conditions établies par un autre laboratoire (Dr Vivanco MD, CIC bioGUNE, Technological Park Bizkaia, Derio, Espagne). La littérature fait état d'une équipe ayant déjà rapporté les limites des expériences conduites en milieu complétement par du *charcoal stripped serum*, notamment en termes de variabilité des taux hormonaux observés et des conséquences sur les modèles cellulaires hormono-dépendants testés (297).

Nos tests avec du sérum *charcoal stripped* (commercial ou réalisé par nos soins) ont probablement conduit à un retrait trop important de facteurs de croissance nécessaires, nous conduisant à rechercher d'autres conditions de culture. Après différents tests de milieu 'à façon', à la recherche de conditions établies de culture

vis-à-vis des taux hormonaux, nous avons opté pour un milieu permettant la réalisation d'expériences avec des doses non parfaitement définies d'androgènes mais probablement minimales. Celles-ci reposent sur l'exposition à une dose faible mais nécessaire de SVF, soit 1% de SVF dans le milieu DMEM classique. Ces conditions ont été adoptées suite à la collaboration avec le laboratoire du Dr De Cremoux (CNRS UMR7212/INSERM U944; Hôpital Saint-Louis; Paris, France.) qui avait déjà été confrontée à cette problématique de milieu de culture.

Ces dernières conditions nous ont permis de réaliser les expériences rapportées dans cette partie du premier projet. Les expériences ainsi réalisées sur le modèle classique de la lignée cellulaire moléculaire apocrine, MDA-MB-453, sont en faveur d'une faible dépendance aux androgènes en terme de croissance, confortant certaines données de la littérature (36,90,125,153). Comme évoquée, la lecture attentive de la littérature sur le sujet est ambiguë. En effet, l'amplitude de l'effet sur la croissance n'est pas majeure. Dans l'article de Doane et al. (36) souvent pris en référence, après 7 jours d'exposition, le nombre de cellules exposées au R1881 (androgène de synthèse) n'a été multiplié que par 3 versus 2 dans le bras contrôle/véhicule. Notre difficulté rencontrée à reproduire ces expériences de croissance cellulaire différentielle entre cellules stimulées ou non par des androgènes renforce l'impression de dépendance faible de la croissance vis-à-vis des androgènes. Les mêmes difficultés ont été rencontrées avec la lignée SUM185PE.

Le doute sur une stimulation franche de la croissance par les androgènes a réorienté nos expériences vers une recherche de preuve d'effet global cellulaire des androgènes, par test de viabilité cellulaire en MTT. Ce test ne mesure pas simplement la croissance cellulaire mais aussi certains aspects du métabolisme et de l'activité cellulaire générale (298). L'exposition des cellules à des concentrations croissantes de DHT ou de R1881 a permis de mettre en lumière un effet stimulant sur la viabilité cellulaire dans les lignées moléculaires apocrines MDA-MB-453 mais également SUM185PE. Cette stimulation n'est pas dose-dépendante. Il est intéressant de noter que l'effet est plus important dans la lignée SUM185PE mais que dans les 2 lignées, la DHT et le R1881 donnent des effets comparables à doses identiques. Dans cette expérience aussi l'amplitude de l'effet n'est pas majeure, ce

qui avait par ailleurs été retrouvé dans la littérature par Lehmann et al. (150) ou par Cochrane et al. (153) avec une induction relative du ratio de viabilité entre conditions véhicule (contrôle) et DHT de 1,5 à 2,5.

Au vu de nos résultats non francs sur les lignées moléculaires apocrines, nous avons utilisé la lignée de cancer de prostate LNCAP comme contrôle positif de lignée androgéno-dépendante. La viabilité (en MTT) de celle-ci apparaît majorée par les androgènes à doses faibles (<1nM). Des doses supérieures à 1 nM semblent rapidement délétères sur la viabilité de ces cellules. Ceci avait déjà été publié par d'autres équipes (150,299), ce qui renforce la confiance que nous pouvons accorder à nos résultats. Ceux-ci sont donc en faveur d'une action des androgènes dans les 2 modèles cellulaires moléculaires apocrines ; action sur le métabolisme général de ces cellules sans se transformer pour autant en un facteur majeur et nécessaire à la prolifération cellulaire. Nous proposons donc de définir la lignée MDA-MB-453 (ainsi que la lignée SUM185PE) comme androgéno-sensible plutôt que androgéno-dépendante.

La fiabilité du modèle de carcinome moléculaire apocrine, MDA-MB-453, a également été mise en doute, en raison d'anomalies génomiques telle que la présence d'une mutation du RA (177,179). En effet, cette lignée cellulaire porte une mutation Q865H dans le domaine de liaison au ligand du RA. Cette mutation pourrait être analogue aux mutations de résistance du RA retrouvées dans les cancers de la prostate prétraités par anti-androgènes (71,72,226). Ces mutations du RA sont très rarement retrouvées dans les cancers de prostate non traités, mais avec une fréquence de 10 à 30% chez les patients ayant été préalablement exposés à un anti-androgène (300). Elles sont connues comme impliquant une auto-activation constitutive du RA, indépendamment de son ligand. Il a également été montré que ces mutations peuvent induire un défaut majeur de fonctionnalité du RA (179), induisant une diminution de la spécificité de l'interaction ligand-RA, réduisant ainsi la sensibilité à la stimulation androgénique par la DHT et induisant une stimulation du récepteur par des hormones stéroïdiennes autres (301). De même, ces mutations peuvent permettre à un antagoniste du RA d'avoir un effet paradoxal agoniste sur le RA (302,303). Cette mutation est donc une autre limite importante de ce modèle.

Nous avons ainsi choisi de ne pas explorer davantage l'impact des androgènes sur ces modèles cellulaires MDA-MB-453 ou SUM185PE pour plusieurs raisons. La première est que le but final de ce projet est d'étudier une nouvelle molécule anti-androgène, l'ODM-201. La vérification de l'androgéno-dépendance des modèles précliniques existants n'apparaît donc que comme un pré-requis à ce projet. Une étude mécanistique complexe du rôle des androgènes sur ces modèles semblait éloignée de la finalité du projet du fait des limites patentées des modèles étudiés.

Deuxièmement, les deux modèles cellulaires étudiés ont été issus de tumeurs humaines, il y a plus de 30 ans, sans véritablement connaître les caractéristiques de la tumeur initiale sur le plan génomique, par exemple. La dérive subie par chaque lignée cellulaire depuis la tumeur originelle ne peut donc pas être établie. Un exemple en est le statut HER2, discuté et variable selon les publications sur la lignée MDA-MB-453 (177,181). Entre nos mains, cette lignée est retrouvée amplifiée pour HER2 (technique de FISH selon les recommandations en vigueur en pratique clinique (191)) alors que ce statut n'est pas du tout consensuel dans la littérature.

Troisièmement, nous avons prouvé que ces lignées présentent au minimum une androgéno-sensibilité que nous avons jugé suffisante pour poursuivre notre projet.

La suite de notre réflexion s'est portée sur l'amélioration des modèles précliniques disponibles. Une des solutions envisagées a été d'améliorer le modèle existant, MDA-MB-453, en remplaçant le RA muté de la lignée par un gène RA sauvage dans l'optique de restaurer une fonction normale du gène. Ceci a déjà été réalisé par l'équipe de Moore et al. (179) avec une re-sensibilisation de la lignée MDA-MB-453 à la DHT exprimant un RA sauvage exogène préalablement transfecté. Nous avons envisagé pour ce faire une expérience identique en utilisant un système plus moderne de CRISPR-CAS9. La lourdeur des mises au point nécessaires à cette réalisation (*Knock-out* du gène muté et réinsertion du gène sauvage) ainsi que la finalité même de ce nouveau modèle 453, RA sauvage artificiel, ont finalement conduit à la non production d'un tel modèle. De plus, il est tout à fait possible que la mutation du RA ne constitue pas la seule limite du modèle MDA-MB-453 comme représentant du sous-type de cancer du sein moléculaire apocrine comme évoqué par Vranic et al. (177).

Nous avons également tenté une autre approche pour produire un modèle cellulaire moléculaire apocrine. Pour cela, nous avons repris un modèle de tumeur dit 'à façon' publié par notre équipe (60). Après recueil de cellules mammaires normales (lors d'une chirurgie de réduction mammaire après accord de la patiente), plusieurs oncogènes sont séquentiellement infectés par lentivirus (*CCND1*, *MYC*, *TERT*, *BMI1*, répression de *TP53*, expression de *PIK3CA* muté, H1047R) dans ces cellules. Ceci permet de former des tumeurs mammaires lumineuses invasives (RE+) après greffe orthotopique intracanaulaire mammaire chez la souris. Le principe a consisté ici à faire évoluer ce modèle luminal vers un modèle moléculaire apocrine. Ce projet n'a pas été conduit à son terme devant le manque de preuve biologique concernant les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'apparition de caractéristiques spécifiques de tumeurs moléculaires apocrines. Ainsi, le simple fait de sur-exprimer le RA et d'éteindre l'expression du RE (initialement envisagé) n'aurait probablement pas permis de résumer la complexité biologique de ce sous-groupe tumoral.

Les limites des modèles cellulaires existants mis en lumière dans ce travail ne permettent pas de remettre en cause l'intérêt clinique de cibler le RA ou la production des androgènes, au vu des réponses objectives obtenues dans les différents essais cliniques (122–124). Ces réponses reflètent l'importance transcriptomique observée dans ce sous-groupe tumoral de la voie des androgènes et du RA. Il apparaît que les tumeurs moléculaires apocrines présentent probablement une dépendance oncogénique au RA, à ses voies de signalisation d'aval et aux androgènes (125), plus importante que celle du modèle cellulaire classique MDA-MB-453.

L'absence de modèle préclinique parfaitement caractérisé et fiable de tumeurs moléculaires apocrines nous a conduit à définir un modèle plus pertinent dans la représentativité de ce sous-groupe tumoral.

## Vers de nouveaux modèles précliniques spécifiques

La réalisation d'expériences précliniques dans une optique translationnelle nécessite des modèles définis et le plus représentatif possible des patients présentant ces tumeurs. Notre intérêt porte ici sur le cancer du sein, par conséquent, les modèles qui récapitulent les étapes de progression et d'invasion de ces tumeurs dans le microenvironnement de glande mammaire semblent les plus adaptés. De même, il apparaît difficile de résumer un sous-groupe tumoral présentant des caractéristiques d'hormono-dépendance par un modèle cellulaire *in vitro* qui ne peut pas reproduire le contexte complexe hormonal retrouvé chez une femme. Ainsi, nous avons envisagé un autre type de modèle d'étude : les *Patient Derived Xenograft* (PDX) ou xénogreffe issue de tumeur humaine. Les PDX sont des tissus tumoraux prélevés chez un patient et implantés chez la souris à des fins de recherche. En collaboration avec le service d'anatomopathologie (Institut Bergonié), nous avons développé, dans notre laboratoire, des PDX issus de patientes atteintes de tumeurs moléculaires apocrines de stade localisé opérées dans notre centre.

La diversité et l'hétérogénéité intratumorale n'est que peu reproduite par des lignées cellulaires, souvent établies depuis des dizaines d'années, avec un risque important de dérive vis-à-vis de la tumeur initiale. D'autre part, les caractéristiques notamment génomiques précises de la tumeur initiale ne sont le plus souvent pas connues. Un grand effort de recherche a été réalisé dans le domaine du cancer du sein pour établir de nouveaux modèles en passant par l'animal. Ces recherches ont initialement impliquées l'implantation et le suivi de développement de tumeurs à partir de greffes de lignées cellulaires établies dans des souris immunodéficientes (304). Les tumeurs ainsi formées sont cependant limitées dans leurs capacités à récapituler l'hétérogénéité observée dans la plupart des cancers mammaires primitifs, pour les raisons développées ci-dessus (contexte hormonal, greffe non orthotopique). Des modèles qui représentent plus fidèlement la diversité des tumeurs retirées des patientes ont donc supplanté les lignées cellulaires dans les recherches de nouveaux modèles à l'aide de greffe murine directe depuis la tumeur humaine fraîchement opérée (PDX).

Historiquement, les tests de PDX rapportaient déjà des taux de succès de l'ordre de 50% (305) en utilisant un site non-orthotopique sous-cutané. L'expérience de notre équipe sur ces greffes non-orthotopiques est en faveur de changement phénotypique majeur ne permettant pas de travailler sur ces modèles non fiables dans le temps. Rapidement, les greffes dans le coussinet graisseux mammaire (*fat pad*) ont entraîné de meilleurs résultats concernant l'augmentation de la croissance tumorale primitive et le développement de métastases par rapport aux implantations sous cutanées (306,307). Ce site de greffe se rapproche d'un site physiologique d'implantation pour une tumeur mammaire, sans reproduire le microenvironnement exact des canaux mammaires d'où sont issus les cancers mammaires humains.

En parallèle, l'apparition de la segmentation en sous-groupe moléculaire des tumeurs mammaires a démontré la limite des modèles de PDX alors existants. Ces PDX ne représentaient en effet qu'un sous-ensemble de tumeurs agressives, notamment triple négatives de haut grade. Cette prépondérance des tumeurs triple négatives s'explique probablement par un taux de prise de greffe des PDX significativement associé aux tumeurs primaires triple négatives prélevées à un stade métastatique (308–311). Les tumeurs permettant l'établissement de PDX se caractérisaient ainsi par des signatures d'expression transcriptomique de pronostic péjoratif comme des signatures de prolifération (308).

Un autre point important du développement de ces modèles réside sur la capacité du PDX à conserver le phénotype et les caractéristiques génomiques de la tumeur primaire. Les données publiées suggèrent que les PDX reflètent fidèlement les caractéristiques histologiques et le sous-groupe moléculaire des tumeurs primaires avec notamment des profils de *copy number* inchangés (308). Des études ont permis de montrer que la tumeur greffée se différencie néanmoins quelque peu de la tumeur primaire par la perte d'événements oligoclonaux au cours des passages séquentiels, suggérant que la structure génétique des PDX se stabilise finalement autour d'un clone dominant, présent dans la tumeur d'origine. Cette stabilité génétique des PDX permet ainsi leur reproductibilité d'utilisation (308).

Comme nous l'avons vu, les PDX sont un modèle préclinique fiable. Néanmoins, la littérature concernant les PDX de tumeurs mammaires met en exergue deux limites. La première concerne l'absence de tumeur de sous-groupes moins agressifs,

luminales notamment A (bas grade, index de prolifération bas) ou de tumeurs triple négatives peu proliférantes comme les moléculaires apocrines. La deuxième concerne le site de greffe. Le site de greffe en *fat pad* ne correspond pas à la glande mammaire dans sa partie canalaire d'où sont issus les cancers du sein. Ceci explique l'intérêt de notre équipe pour le modèle de greffe intracanaulaire mammaire et les greffes de tumeurs peu proliférantes.

La technique d'injection intracanaulaire a initialement été développée pour reproduire des tumeurs mammaires canalaire non invasives, dites *in situ* (312). Sur le plan mécanique, il semble probable que le principal avantage de la greffe intracanaulaire soit la présence de la couche myo-épithéliale murine qui protège les cellules humaines du contact direct avec le stroma murin. Notre équipe a précédemment publié des travaux montrant que les cellules luminales (RE +) humaines peuvent remplacer la couche luminale murine des canaux après injection intracanaulaire directe et permettre le développement de tumeurs initialement *in situ* puis invasives (313).

Concernant l'obtention d'un modèle moléculaire apocrine, nous avons, dans un premier temps, réalisé des tests du site de greffe, par injection mammaire directe intracanaulaire, de la lignée MDA-MB-453. Ces tests nous ont permis de valider le maintien du phénotype de la lignée dans ces conditions mais également de démontrer une capacité à métastaser suite à une effraction canalaire, telle qu'existant dans une glande mammaire humaine. Par la suite, nous avons greffé trois PDX issus de tumeurs moléculaires apocrines prélevées chez des patientes opérées sur l'Institut Bergonié, après recueil de leurs consentements (annexes 3 et 4). Une de ces tumeurs présentait un phénotype RE-, RA+, HER2-amplifié et les deux autres un phénotype triple négatif RA-positif (RE-, RA+, HER2 non-amplifié). En parallèle, des tumeurs du sous-groupe luminal A (RE+, HER2 non-amplifié) ont été greffées lors de ces expériences, car ce sous-type n'est que très peu représenté dans la littérature sur les PDX. Nous avons démontré que des tumeurs RE+ peu proliférantes ou des tumeurs RE- RA+, moléculaires apocrines, sont capables de survivre et de proliférer chez les souris dans le microenvironnement orthotopique créé par les canaux mammaires murins.

Nos résultats sont parfaitement compatibles avec ceux rapportés récemment par l'équipe du Dr Cathrin Brisken (EPFL SV ISREC UPBRI, Lausanne, Suisse) (314). De manière spécifique, notre équipe est la première à rapporter le passage répété d'un PDX moléculaires apocrines en condition intracanalalaire. Il faut noter que notre PDX moléculaire apocrine HER2-amplifié a présenté la meilleure prise de greffe liée à une agressivité importante, probablement en lien avec la surexpression de l'oncogène HER2. L'équipe de l'hôpital Saint Louis avait antérieurement rapporté la prise de greffe d'au moins deux PDX de tumeurs moléculaires apocrines mais greffées en *fat pad* (315). Les passages séquentiels des PDX chez la souris n'ont pas encore pu être comparés aux tumeurs initiales sur le plan génomique. Cette confirmation de stabilité génomique des greffes tumorales intracanalaires sera prochainement réalisée par notre laboratoire. Sur le plan mécanistique, nos résultats avec les injections intracanalaires indiquent que les cellules myoépithéliales murines peuvent communiquer efficacement avec les cellules luminales humaines injectées, et ainsi permettre un développement tumoral des PDX. Ceci en fait donc un modèle de choix pour des tests thérapeutiques, même s'il n'y a pas eu de comparaison directe entre greffe de PDX en intracanalalaire et en *fat pad* afin de déterminer la supériorité des greffes orthotopiques intracanalaires (316). Néanmoins, nos résultats de comparaion directe de greffe de la lignée MDA-MB-453 est en faveur de l'utilisation du site orthotopique intracanalalaire par rapport au site *fat pad*.

Ces modèles de PDX physiologiques, du fait du site d'implantation, stables sur le plan phénotypique après trois passages, soulèvent donc l'espoir de disposer de modèle d'étude préclinique plus adapté. On peut imaginer un intérêt fort dans le contexte de médecine personnalisée actuelle visant à attribuer un traitement ciblé à une anomalie moléculaire spécifiquement retrouvée dans une tumeur (238,317). Les études cherchant à démontrer l'avantage d'un traitement ciblé à une anomalie moléculaire versus un traitement non ciblé présentent en effet des résultats limités (238,318). Ces modèles de PDX mammaires représentent l'espoir de tester fonctionnellement des anomalies tumorales spécifiques, sur un avatar PDX *in vivo* de la tumeur présentée par une patiente, avant d'initier éventuellement le traitement chez la patiente. Ceci a déjà été testé avec des résultats très encourageants (319) et nous avons montré que notre modèle de greffe orthotopique intracanalalaire mammaire permettait de testé efficacement des traitements ciblées *in vivo*.

Néanmoins, l'utilisation des PDX intracanalaires présente encore de nombreuses limites à l'heure actuelle. La première concerne la lourdeur logistique du travail en animalerie. En effet, la prise de greffe n'est pas systématique et les délais de mise en place d'une telle technique sont importants dans un contexte de maladies parfois rapidement évolutives nécessitant un début de traitement ne pouvant pas attendre les résultats des tests sur l'avatar PDX. Deuxièmement, le coût de telles expérimentations est encore important. Troisièmement, nous n'avons pas, à l'heure actuelle, réussi à transformer un PDX, par définition *in vivo*, en lignée cellulaire cultivée *in vitro* afin de pouvoir travailler sur des modèles cellulaires exploitables plus facilement, plus rapidement et à moindre coût. Une autre limite importante du modèle PDX est la déficience du système immunitaire de la souris hôte qui modifie inévitablement la cinétique de croissance des tumeurs, notamment par des influences microenvironnementales inappropriées (316). Cette limite empêche également l'évaluation des thérapies immuno-modulatrices.

Nous avons montré dans cette partie du projet qu'il est possible de concevoir des modèles tumoraux moléculaires apocrines définis et plus représentatifs de ce sous-type tumoral que les lignées cellulaires existantes car issus de tumeurs elle-mêmes parfaitement caractérisées. Malgré l'intérêt de ces modèles PDX, l'absence de possibilité d'exploitation routinière simple, par exemple pour l'étude préclinique de nouvelles thérapeutiques, limite leurs utilisations. Ceci pourrait être résolu s'il était possible de passer à une culture *in vitro* à partir de ces tumeurs murines établies (PDX intracanalaires) ; étape qui pour l'instant a échoué à être mise en œuvre.

Devant les limites actuelles logistiques des PDX intracanalaires moléculaires apocrines, nous avons réalisé les tests précliniques comparatifs du nouvel anti-androgène à notre disposition, l'ODM-201, sur des modèles cellulaires établis, les lignées MDA-MB-453 et la lignée SUM185PE.

## L'ODM-201: un antagoniste du RA à l'activité proche de l'enzalutamide

Les thérapeutiques spécifiques anti-androgènes déjà testées dans le sous-groupe tumoral mammaire moléculaire apocrine comprennent deux anti-androgènes antagonistes du RA : le bicalutamide (122) et l'enzalutamide (124). Des données précliniques sont disponibles pour ces deux molécules dans ce sous-groupe tumoral. La troisième étude clinique, réalisée par notre groupe, a utilisé un inhibiteur de la synthèse des androgènes (123), inhibiteur du cytochrome CYP17A1 sans données précliniques préalablement publiées dans ce sous-groupe, mais avec des données dans les modèles de carcinome de prostate (210–212).

De manière générale, le rationnel d'utilisation de ces trois molécules repose sur les preuves d'efficacité obtenues dans les cancers de prostate avant d'être utilisées dans les cancers du sein moléculaires apocrines. Un nouvel anti-androgène, l'ODM-201 a récemment été testé *in vitro* (220) puis chez l'homme dans les cancers de prostate (222,225). Une seule étude préclinique est rapportée dans la littérature concernant l'ODM-201, et son mode d'action est décrit comme antagoniste sélectif irréversible du RA (220). Les données disponibles n'ont donc pas été validées par une seconde équipe. L'objectif de notre collaboration avec le laboratoire pharmaceutique BAYER HealthCare était de tester l'ODM-201 dans les tumeurs moléculaires apocrines afin de générer des données précliniques en vue d'un potentiel essai clinique avec cette molécule. Nous avons ainsi testé l'ODM-201 *in vitro* dans les lignées cellulaires moléculaires apocrines MDA-MB-453 et SUM185PE, après avoir démontré leur androgéno-sensibilité.

Nos résultats ont été produits sur différentes souches de lignées cellulaires et deux différents fournisseurs d'ODM-201 (BAYER HealthCare et Selleckchem/Euromedex). Nous avons montré que l'action de l'ODM-201 est RA spécifique et compétitive avec les androgènes confirmant son action d'antagoniste du RA. Afin de replacer l'efficacité de l'ODM-201 dans le contexte des thérapeutiques anti-androgènes déjà étudiées dans les carcinomes moléculaires apocrines, nous avons testé un autre antagoniste du RA, l'enzalutamide. Nous avons également comparé l'efficacité de l'ODM-201 à un anti-androgène non antagoniste mais inhibiteur de la synthèse des androgènes, l'abiratérone. L'intérêt de cette dernière comparaison repose sur les

modes d'actions différents de ces molécules permettant un positionnement par rapport aux autres anti-androgènes déjà testés.

L'efficacité, en terme de réduction de la viabilité cellulaire, est relativement comparable entre les deux antagonistes du RA, ODM-201 et enzalutamide. De même, les expériences de spécificités d'action sont comparables. Ainsi, l'ODM-201 réduit la translocation nucléaire du RA en immunofluorescence et inhibe l'activité de facteur de transcription du RA visualisée par expérience de rapporteur d'activité du RA. Nos résultats sur la quantification de la localisation nucléaire du RA versus cytoplasmique corroborent ceux de l'équipe de Cochrane et al. (153) avec des amplitudes identiques aux nôtres. Ainsi les conditions « contrôle » ou « enzalutamide » retrouvent 40% des noyaux positifs pour le RA contre environ 80% pour la condition stimulée par la DHT et 50% pour la condition compétitive, enzalutamide plus DHT.

Une des particularités du développement de cette molécule dans les cancers de prostate, par rapport aux autres molécules antagonistes du RA, repose sur son action supposée sur certains variants de résistance du RA (220). Cet argument en faveur de l'activité plus large de l'ODM-201 versus d'autres anti-androgènes est un point central du développement de cette molécule dans les cancers de prostate. Dans notre principal modèle d'étude moléculaire apocrine, la lignée MDA-MB-453, ce point a un intérêt particulier du fait de la présence d'une mutation Q865H du gène du RA (179). Cette mutation est proche des mutations *hotspots* de résistance aux anti-androgènes F876L ou H875Y retrouvées dans les cancers de prostate (320). Malgré cette mutation, la lignée MDA-MB-453 n'est pas plus sensible à l'ODM-201 qu'à l'enzalutamide alors que celui-ci a été décrit comme n'ayant pas d'action sur ces mutants du RA (220). Néanmoins, nos résultats sont limités car une seule mutation a ici été testée (Q865H) et des données supplémentaires de l'activité de l'ODM-201 sur différents mutants du RA seraient nécessaire pour confirmer l'intérêt prépondérant de l'ODM-201 sur les autres anti-androgènes, en cas de mutation du RA.

Une limite de l'étude des anti-androgènes dans les lignées moléculaires apocrines reposent sur les doses importantes nécessaires à la réduction de la viabilité cellulaire, de l'ordre de la dizaine de micromolaire ( $\mu\text{M}$ ). Cet élément a déjà été décrit

dans la littérature et nous avons retrouvé des doses d'IC50 comparables à celles publiées concernant l'enzalutamide dans la lignée MDA-MB-453 (321). Nos résultats montrent que les lignées moléculaires apocrines présentent une sensibilité moindre aux anti-androgènes par rapport à la lignée de cancer de prostate LNCAP, par comparaison des doses d'IC50.

Les doses utilisées dans nos lignées avec les anti-androgènes sont de l'ordre du  $\mu\text{M}$  bien supérieures à celles des anti-estrogènes dans les lignées RE+/luminales. Il est important de réaliser une comparaison avec les tumeurs du sein luminales car celles-ci sont également traitées par hormonothérapie, même si c'est le RE ou les œstrogènes qui sont alors ciblés. Le fulvestrant, anti-œstrogène, présente par exemple un IC50 de l'ordre du nanomolaire (nM) sur des lignées cellulaires RE+ (MCF7) (322,323). Il faut noter que les anti-androgènes font également l'objet de recherche dans les tumeurs luminales, qui pour la plupart sont RA+. Les doses d'anti-androgènes utilisées *in vitro* y sont comparables à celles des lignées moléculaires apocrines, de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{M}$  (lignées MCF7 et BCK4) (153,324). Ceci est corroboré par nos expériences retrouvant une efficacité comparable de l'enzalutamide et de l'ODM-201 entre lignées MDA-MB-453 et MCF7 (RE+, RA+). L'importance des doses nécessaires pour obtenir un effet biologique n'est donc pas spécifique aux lignées moléculaires apocrines mais dépend probablement du mode d'action de ces molécules anti-androgènes.

Ces doses élevées nécessaires pour objectiver un effet pose la question de la spécificité d'action des anti-androgènes. Nos données montrent une action semblant spécifique de l'ODM-201 sur le RA, identique à celle de l'enzalutamide (expériences de localisation du RA et rapporteur d'activité du RA). Celles-ci sont à nuancer notamment car nous ne retrouvons pas d'effet compétitif entre androgènes et anti-androgènes en test de viabilité (MTT). Nous avons retrouvé cet effet attendu entre un antagoniste du RA et un agoniste (DHT ou R1881) sur la lignée de prostate, LNCAP. Dans ce modèle de prostate, la DHT en quantité importante dans le milieu vient inhiber l'action de l'anti-androgène par un effet à priori compétitif. Dans les deux lignées moléculaires apocrines, MDA-MB-453 et SUM185PE, nous ne retrouvons pas cet effet, avec une absence de majoration de l'IC50 des anti-androgènes en condition saturante en androgènes.

Ceci pose la question d'un effet non spécifique des anti-androgènes sur ces modèles *in vitro*. Caiazza et al. ont démontré que l'action anti-tumorale de l'enzalutamide était similaire dans des lignées triple négatives ou lumineales mais que celles-ci étaient dépendantes de l'expression du RA (expression du RA établie en *western blot*) (321). L'expression du RA semble donc prédictive de l'efficacité des anti-androgènes. Ces données confortent une efficacité cible dépendante donc RA-spécifique de l'enzalutamide. Une autre équipe retrouve également cette action RA-dépendante (325). Sur trois des lignées triple négatives RA-positives testées par cette équipe (HCC1806, BT549, et MDA-MB-231), les auteurs ne retrouvent pas d'androgéno-dépendance de la stimulation par les androgènes (DHT) sur la croissance cellulaire, mais retrouvent une inhibition de croissance avec l'enzalutamide (325). Ceci renforce nos résultats obtenus sur les lignées MDA-MB-453 et SUM185PE : même si la croissance n'est pas fortement majorée par les androgènes, l'effet des anti-androgènes semble RA-spécifique dans ces lignées. Cet effet passe, dans cet article comme dans nos expériences, par une réduction de la localisation au niveau nucléaire du RA par l'enzalutamide (325).

La discordance observée entre la réduction de la prolifération par le blocage du RA (par un anti-androgène) et l'absence de prolifération induite par le ligand du RA (androgènes) pourrait être liée à des mécanismes différents de ceux attendus. Ces mécanismes pourraient être en partie indépendants du ligand mais dépendants du récepteur, par exemple par la présence d'un variant du RA ayant perdu son domaine de liaison du ligand et possédant alors une activité intrinsèque (326). Le variant le plus fréquemment décrit, AR-V7, commun dans les cancers de prostate, a été retrouvé dans la lignée MDA-MB-453 (327). Ce mécanisme seul n'explique pas forcément les résultats qualifiés d'androgéno-sensibilité versus androgéno-dépendance retrouvés dans nos lignées mais mets en lumière un mécanisme possible expliquant la dissociation entre le manque d'androgéno-dépendance et la sensibilité aux anti-androgènes. On voit ici la place centrale des questions relatives aux modèles d'études pour ces tests de molécules agissant sur une voie hormonale.

L'équipe de Barton et al. a publié des résultats provocateurs en rapportant une sensibilité à différents anti-androgènes dans des lignées cellulaires triple négatives

mais RA faiblement positif (325). Ces résultats, troublants, avaient déjà été rapportés (328) et nous avons dans nos propres expériences retrouvé des IC50 d'ordre comparable entre la lignée MDA-MB-231 (considérée entre nos mains comme RE-, RA-) et la lignée MDA-MB-453 (RE-, RA+) avec l'enzalutamide.

Afin de présenter d'autres arguments en faveur d'une spécificité d'action, nous avons testé un rapporteur de l'activité facteur de transcription du RA. Ce vecteur, construit par le Pr Richard Iggo, comprend une séquence répétée six fois, spécifiques des *Androgen response element*, séquence du génome permettant la liaison du RA à l'ADN dans les gènes cibles de ce dernier. Le rapporteur utilisé est couplé à la GFP afin de visualiser l'activité spécifique du RA. Malgré des tests concluant à une spécificité d'action dans un modèle RA négatif transfecté avec le gène du RA ; ce rapporteur ne fonctionne pas dans les lignées exprimant un RA endogène. Cet échec possiblement lié à des co-régulateurs du RA différenciellement présents selon l'expression native du RA ou non (329), nous a conduit à envisager une expérience de RTqPCR de gènes dont l'expression est induite par le RA. Il faut noter qu'une autre équipe a publié l'utilisation d'un rapporteur d'activité du RA (179). Ce rapporteur d'activité pourrait être utilisé pour de futures expériences dans ce domaine.

L'ensemble de ces données est en faveur d'une action relativement spécifique des antagonistes du RA dans ces modèles cellulaires. Pour conclure sur nos données de spécificité d'action des anti-androgènes sur des modèles moléculaires apocrines, nous pouvons par ailleurs exclure un problème technique, au vu des résultats sur la lignée LNCAP, comparable à la littérature (330–332), mais aussi du fait de la reproductibilité de ces résultats sur différentes souches de la lignée MDA-MB-453.

Nos études *in vitro* apportent des arguments pour une spécificité d'action de l'ODM-201 et plus généralement, des anti-androgènes. La difficulté à prouver la spécificité d'action est probablement inhérentes aux modèles qui, comme nous l'avons déjà montré, sont intrinsèquement limités dans leur reproduction du sous-type tumoral moléculaire apocrine. L'effet de l'ODM-201 reste ainsi difficile à caractériser dans les lignées moléculaires apocrines. Pour preuve, nos expériences montrent qu'une exposition à l'ODM-201 à des doses d'IC50 (définies en MTT) n'induit pas

d'augmentation franche d'apoptose. Nous retrouvons par ailleurs les mêmes résultats avec l'enzalutamide ou avec l'abiratérone dans les deux lignées moléculaires apocrines. Une autre équipe retrouve, avec l'enzalutamide, des résultats différents, avec une augmentation de 50% des cellules en apoptose après exposition versus condition contrôle (153). Un article récent retrouve, comme nos données, l'absence d'augmentation d'apoptose induite par l'enzalutamide (avec un taux basal de 10% de cellules en apoptose en condition contrôle, identique à nos résultats) (237). Des résultats proches des nôtres sont également retrouvés après traitement par bicalutamide ; le pourcentage de cellule en apoptose (annexin V positive en FACS) n'est alors que de 30% avec des doses de plusieurs dizaines de  $\mu\text{M}$  (125). Ces résultats de faible amplitude avec le bicalutamide sont renforcés par une autre mesure (caspase 3/7 activées) effectuée par Lehmann et al. (150) pour lequel aucune majoration du taux de cellules en apoptose n'est retrouvée.

Par ailleurs, nous n'avons pas retrouvé d'effet sur le cycle cellulaire, même si les expériences présentées ne sont pas réalisées à partir de cellules synchronisées. Nos données sont comparables à celles récemment publiées sur la lignée MDA-MB-453. Dans cette étude les auteurs n'observent aucune modification du cycle cellulaire avec l'enzalutamide, même à des doses élevées (jusqu'à deux fois l'IC50) (237).

Nos résultats sur la description de l'effet des anti-androgènes, et notamment de l'ODM-201, sont en accord avec les données disponibles dans la littérature avec d'autres anti-androgènes antagonistes du RA. Nos résultats indiquent que l'effet de l'ODM-201 dépend de l'inhibition de la croissance cellulaire plutôt que de l'induction de l'apoptose dans les lignées cellulaires moléculaires apocrines. Ceci corrobore un effet attendu non-cytotoxique de ce type de thérapie. L'ensemble de nos données concernant l'ODM-201 est en faveur d'une activité comparable à celle connue de l'enzalutamide dans les modèles moléculaires apocrines.

En conclusion de ce premier projet, dans les modèles de tumeurs moléculaires apocrines, l'ODM-201 présente une action RA dépendante proche de l'enzalutamide, autre anti-androgène classiquement utilisé dans le cancer de la prostate. L'étude préclinique de l'ODM-201 dans les cancers moléculaires apocrines se heurte aux limites des modèles cellulaires existants. L'obtention de lignées cellulaires dérivées

des nouveaux modèles de *Patient Derived Xenograft*, issus de tumeurs humaines parfaitement caractérisées, permettrait une étude plus approfondie de l'action de cette molécule dans ce sous-type tumoral.

Les données que nous avons générées sur l'ODM-201 ont conforté le lancement d'un essai clinique comparant cette molécule à une thérapie non spécifique de type chimiothérapie (capécitabine, 5-FU oral) chez des patientes atteintes de tumeurs moléculaires apocrines en première ligne de traitement pour une maladie avancée. L'inclusion des premières patientes est prévue pour le premier trimestre 2018. Nous n'avons pas prévu de réaliser de nouvelles expériences précliniques visant à caractériser plus avant la mécanistique de cette molécule dans nos modèles cellulaires, du fait des différentes limites évoquées. Cette décision a été prise en collaboration avec le laboratoire Bayer HealthCare, suite à leur validation de notre rapport de travaux.

## Traitements anti-androgènes : des questions malgré les réponses observées

Le deuxième projet de cette thèse a permis d'isoler des facteurs prédictifs potentiels de réponse à l'abiratérone à travers l'étude du matériel tumoral des patientes incluses dans l'essai thérapeutique spécifique à cette molécule dans les tumeurs moléculaires apocrines, TNBC RA+.

Les résultats des différents essais cliniques rapportés avec les anti-androgènes (bicalutamide, abiratérone ou enzalutamide) sont limités mais cliniquement significatifs avec un bénéfice pour environ 20 à 30% des patientes traitées (122–124). L'hétérogénéité de ces résultats nécessite d'être appréhendée. En effet, une majorité de patientes ne bénéficie pas de ces traitements dont l'abiratérone, ciblant pourtant la voie biologique centrale de ce sous-groupe tumoral. Le ciblage direct ou indirect du récepteur aux androgènes et de la voie des androgènes mène à des résultats faibles en comparaison des tumeurs lumineales (RE+) métastatiques traitées par hormonothérapies anti-estrogènes ou anti-aromatase. Dans le sous-type luminal, les essais de phases III d'enregistrement des anti-aromatases retrouvaient des taux de bénéfice clinique de 49 à 59% en première ligne et de 24 à 37% en deuxième ligne (333). Dans les essais récents, les anti-aromatases non stéroïdiens (letrozole) permettent un bénéfice clinique d'environ 70% en première ligne (236,334) et de 26% (exemestane, étude BOLERO 2 (334)) à 40% (fulvestrant, étude PALOMA 3 (239)) en 2<sup>ème</sup> ligne d'hormonothérapie. Dans le cas des tumeurs lumineales, le ciblage de la dépendance hormonale amène à un bénéfice durable chez le plus grand nombre de patientes.

On peut se poser la question de la possibilité d'obtenir des taux de bénéfices cliniques importants avec des anti-androgènes. Dans les cancers de prostate métastatiques, les taux de réponse objectifs décrits (réponses partielles ou complètes) sont de 20% et de 11,5% pour l'abiratérone selon que ce traitement est administré en pré ou post chimiothérapie (ne tient pas compte des nombreuses stabilités obtenues à la différence du bénéfice clinique) (335). Pour l'enzalutamide ces taux sont plus importants, 59% et 29 % dans les mêmes situations cliniques (336). Ces chiffres ne prenant pas en compte les stabilisations de maladie obtenues sous traitement ; on peut imaginer que les taux de bénéfice clinique sont bien

supérieurs dans le cancer de prostate à ceux obtenus dans les essais sur les tumeurs moléculaires apocrines.

Outre les cancers de prostate, les traitements anti-androgènes peuvent induire un taux de bénéfice clinique important dans des sous types tumoraux autres, récepteurs androgènes positifs. C'est notamment le cas des carcinomes des glandes salivaires avancés pour lesquels un taux de bénéfice clinique à 6 mois de 75% (N= 27, IC95%, 58%-88%) a été décrit sous blocage androgénique complet (agoniste de la LHRH et bicalutamide) (337). Ces carcinomes des glandes salivaires présentent des variations morphologiques mais comportent invariablement une composante apocrine même minoritaire (338). De plus, une étude biologique a démontré une grande similitude entre le cluster transcriptomique des tumeurs moléculaires apocrines mammaires décrit par Farmer et al. et celui de ces tumeurs salivaires (339). Ces carcinomes salivaires sont donc très proches des tumeurs moléculaires apocrines mammaires sur le plan biologique, mais présentent des taux de réponse bien supérieurs aux anti-androgènes. Cette différence s'explique probablement par de multiples facteurs encore inconnus à ce jour mais il faut noter que le pronostic est par ailleurs relativement identique (339). Ceci démontre que les taux de réponse aux anti-androgènes peuvent être plus importants en maladie avancée dans d'autres indications que ceux observés dans les cancers du sein moléculaires apocrines.

On peut également s'interroger sur les différences observées dans les cancers du sein entre tumeurs lumineales et tumeurs moléculaires apocrines concernant l'addiction au RE et au RA respectivement. Même si l'addiction au RA a été démontrée dans les tumeurs moléculaires apocrines, les traitements actuels anti-androgéniques n'ont pas permis de retrouver une efficacité similaire aux anti-œstrogènes ou anti-aromatases en cas de tumeurs RE positives ; tumeurs dans lesquelles les hormonothérapies ont une place centrale. Il est alors intéressant de questionner l'intérêt de cibler le RA dans les tumeurs RE+ RA+ (luminales) dans notre réflexion de cibler ce même RA dans les tumeurs RE- RA+. Un essai incluant des patientes avec cancer du sein métastatique luminal pré-traitées par anti-aromatase a testé les bras de traitements suivants : anti-aromatase (exemestane) plus abiratérone versus abiratérone seul versus exemestane seul. Cet essai n'a pas retrouvé d'amélioration de la survie sans progression avec l'ajout de l'abiratérone par rapport au bras exemestane seul (340). Cet essai a donc échoué à démontrer que

l'inhibition de la stimulation du RA (par l'abiratérone) induit un effet anti-tumoral majoré à celui obtenu par une anti-aromatase et ce malgré la situation de co-expression du RE et du RA. Ces résultats peuvent être interprétés à la lumière des données cliniques et précliniques qui suggèrent que le RA agit comme un gène suppresseur de tumeur dans les tumeurs RE-positives et comme un oncogène dans les tumeurs RE-négatives (53).

La variabilité de réponse observée dans les tumeurs moléculaires apocrines sous anti-androgènes est également observée, à un degré moindre, dans les tumeurs luminales sous anti-aromatases. Dans ce dernier groupe, une partie de cette variabilité de réponse a été attribuée au niveau d'expression du RE, qui peut être considéré comme un facteur prédictif quantitatif de réponse aux hormonothérapies (quantification IHC) (341). Ainsi, dans les situations de tumeurs luminales localisées, des études retrouvent des taux de rechute et des mortalités plus importantes en fonction d'une expression du RE faible (341,342). Un seuil d'au moins 50% de cellules positives pour le RE a même été considéré en faveur d'une tumeur à fort potentiel de réponse à une hormonothérapie dans certaines recommandations internationales (*St. Gallen International Expert Consensus*, 2009) (343).

L'ensemble de ces données est en faveur d'une efficacité importante des anti-androgènes lorsque la tumeur présente une forte addiction oncogénique au RA et aux voies des androgènes, comme dans le cancer de la prostate. Il en est de même avec les anti-estrogènes dans les tumeurs luminales présentant, par définition, une grande addiction au RE. Les données relatives au seuil du RE dans les tumeurs luminales soulèvent la question des critères de sélection ou d'identification des patientes à traiter par anti-androgènes dans les études sur les tumeurs moléculaires apocrines. L'addiction à un oncogène ou à une voie de signalisation oncogénique semble difficile à résumer en un seul biomarqueur positif en IHC, même si les cancers de la prostate et du sein luminal sont des contre-exemples. Dans les tumeurs moléculaires apocrines, la sélection repose sur la positivité du RA  $\geq 10\%$  dans les 3 essais réalisés (122–124); seuil basé de manière empirique sur les seuils des récepteurs aux œstrogènes ou à la progestérone ( $\geq 10\%$  selon les recommandations européennes) sans justification biologique sous-jacente. On peut par ailleurs légitimement discuter l'opportunité de sélectionner ces patientes

uniquement sur la positivité d'un seul marqueur IHC (le RA) alors même que le groupe tumoral isolé en 2005 par Farmer et al. (32) l'a été sur un profil d'expression transcriptomique et que l'efficacité des anti-androgènes reste faible dans les essais cliniques basés sur ce marqueur.

L'exploration d'un cas de réponse complète à un anti-androgène (l'abiratérone) a été le point de départ de la recherche de l'amélioration des facteurs de sélection des patientes à traiter par anti-androgènes. Cette patiente est incluse dans l'essai clinique UCBG12-1 et traitée par abiratérone (123). Les réponses complètes sous hormonothérapie sont des événements rares en phase métastatique. Elles représentent entre 7,5 et 15% des tumeurs mammaires lumineales localisées (sein et/ou ganglions axillaires) traitées par hormonothérapies néo-adjuvantes (168). L'abiratérone est, depuis 2011, utilisée dans les formes avancées de cancers de la prostate métastatiques, résistants au blocage androgénique par agoniste/antagoniste de la LHRH. Un taux de réponse complète radiologique a été observé chez 11% (N=220) des patients traités dans un essai d'enregistrement de phase 3 dans cette indication (214).

Notre cas de réponse complète d'une tumeur moléculaire apocrine sous abiratérone n'est pas le premier décrit sous anti-androgènes dans une tumeur moléculaire apocrine. Arce-Salinas et al. (344) ont publié un cas de réponse complète persistant depuis 12 mois (au moment de la publication) sous bicalutamide pour une maladie métastatique au niveau cutanée. L'équipe du Dr Traina a également observé un cas avec l'enzalutamide (124). À notre connaissance, notre cas correspond à la plus longue réponse complète rapportée avec un traitement anti-androgène par une patiente présentant une tumeur moléculaire apocrine, supérieur à 4 ans. En plus de l'intérêt clinique évident de rapporter cette réponse clinique, ce cas présente également un intérêt biologique. Nos analyses à partir de matériel tumoral, congelé ou FFPE, nous ont permis de générer des hypothèses d'étude de l'ensemble des patientes incluses dans l'étude dans le but d'améliorer les prises en charge de ces tumeurs. Nous avons retenu de ces analyses le caractère profondément apocrine de cette tumeur en IHC avec expression forte du RA, de FOXA1 de GCDPF15 et de GGT1.

Les réflexions autour du rôle central du RA et de son expression ainsi que les

données biologiques issues de la description d'un cas de réponse complète sous abiratérone nous ont conduit à poser l'hypothèse que les patientes présentant un bénéfice clinique sont porteuses de tumeurs fortement apocrines et dépendantes des androgènes. Nous avons alors soulevé les trois points de recherche suivants :

\*Le premier est l'amélioration de l'identification de ce sous-type tumoral en pratique clinique qui aujourd'hui ne repose que sur le RA en IHC.

\*Le deuxième est la nécessité de trouver des facteurs prédictifs simples de réponse.

\*Le troisième est l'amélioration du taux de réponse obtenu avec l'abiratérone seul, en passant par des recherches de combinaison de traitement.

Ces différents points sont discutés dans les chapitres suivants.

## Améliorer l'identification clinico-pathologique des tumeurs MA

La question de l'identification de ce sous-groupe est un point central, préexistant à celui de la recherche de facteurs de réponse aux anti-androgènes. Les tumeurs moléculaires apocrines ont été décrites à l'aide de puces d'expression transcriptomiques (32,36,37). Dans une cohorte importante de 587 tumeurs triple négatives analysées en expression transcriptomique, 11% sont identifiées comme moléculaires apocrines (triple négatives RA-positives) (27). Ce taux est de 17% dans une autre cohorte, basée sur une signature transcriptomique de seulement 80 gènes (35). En immunohistochimie, le pourcentage de tumeurs triple négatives RA-positives est retrouvé entre 22 et 35% (345). Cette différence du simple au double selon que la définition utilisée est princeps (expression transcriptomique) ou clinico-pathologique (RE-, RP-, HER2 non-amplifié et RA-positifs) est difficilement compréhensible.

Devant cette problématique, il est intéressant d'analyser la concordance d'identification du sous-groupe moléculaire apocrine en comparant l'identification par puce d'expression transcriptomique (selon la classification de Farmer et al. (32)) et l'identification par immunohistochimie (3 groupes de cancer du sein identifiés par le RE, le RP et le RA). Cette analyse a été récemment réalisée par notre équipe sur la cohorte de l'essai clinique EORTC 10994 (données non publiées, Pr H. Bonnefoi). Un taux de concordance d'identification élevé, de 90,1% (IC95%: 84,0-96,2) est retrouvé pour l'ensemble des trois sous-groupes (luminal, moléculaire apocrine et basal ; 91 patientes analysées). Spécifiquement, le coefficient de concordance Kappa entre analyse transcriptomique et IHC est de 0,85 (IC95%: 0,75-0,94) pour identifier les tumeurs moléculaires apocrines. Cette analyse contredit donc les données montrant des différences importantes entre définition IHC et transcriptomique. Cette analyse n'a pas été répétée dans d'autres cohortes indépendantes à ce jour mais est en faveur d'une robustesse de l'identification des tumeurs moléculaires apocrines en routine par l'IHC, RE-négatives et RA-positives. Ces dernières données sont relatives aux tumeurs moléculaires apocrines dans leur ensemble, HER2-amplifiées ou non-amplifiées à la différence des recherches effectuées dans cette thèse qui ne se sont intéressées qu'au sous-groupe moléculaire apocrine triple négatif soit HER2-négatif.

L'ensemble de ces données nous a amené à questionner la place du RA seul dans l'identification des tumeurs moléculaire apocrines parmi les tumeurs triple négatives. Des publications antérieures à nos travaux ont montré que l'identification des tumeurs moléculaires apocrines parmi les cancers du sein triple négatifs ne devrait pas reposer uniquement sur le RA mais également sur FOXA1 (346) ou sur HER2 et GCDFP15 (136,139). Nous avons montré que le niveau d'expression ARN du RA et son expression protéique en IHC n'étaient pas corrélés dans notre groupe de patientes incluses dans l'essai clinique UCBG12-1 (coefficient de corrélation  $r^2=0,25$ ) comme antérieurement retrouvé par les équipes de J. Lehmann Che et de T. Traina (136,347). Ceci vient confirmer l'intérêt d'identifier d'autres marqueurs caractéristiques de ces tumeurs. Une solution pourrait consister à utiliser des signatures transcriptomiques simplifiées à la place de marqueurs IHC, par exemple avec seulement 80 transcrits différents (35) mais cette identification reste plus lourde et coûteuse à mettre en place en pratique clinique encore à l'heure actuelle.

De ce fait, nous avons entrepris d'affiner la description IHC de ces tumeurs en repartant de leur définition en tant que tumeurs présentant des caractéristiques apocrines, comme postulée suite à l'étude de notre cas de réponse complète sous abiratérone.

Robinson et al. (155) ont démontré l'existence d'une dépendance fonctionnelle du RA envers FOXA1. FOXA1 est un facteur de transcription impliqué dans la modulation de l'activité du récepteur aux œstrogènes mais également du récepteur aux androgènes dans les cancers du sein luminaux ou dans les cancers de la prostate. FOXA1 est un co-facteur de transcription permettant de rendre l'ADN plus accessible au RA (65). Son expression accrue a été identifiée dans les profils transcriptomiques définissant le sous-groupe moléculaire apocrine (32,36). Dans les tumeurs moléculaires apocrines, FOXA1 prend en charge le RA de manière identique au RE dans les tumeurs mammaires lumineales, pour interagir avec la chromatine et induire la transcription de gènes dépendants du RA. Il existe ainsi une grande similitude avec les tumeurs lumineales. Ni et al. (125) ont confirmé le rôle central de la collaboration entre FOXA1 et RA dans les modèles de carcinome moléculaires apocrines.

GCDFP-15 (*Gross cystic disease fluid protein 15*) est une protéine régulée par le récepteur aux androgènes (138). Il s'agit d'un marqueur diagnostique de différenciation mammaire en histopathologie (138). Cette protéine a été retrouvée fortement corrélée à l'expression du RA ( $p=0,001$ ) et au sous-groupe moléculaire apocrine ( $p < 0,0001$ ) (138). Son expression avait déjà été utilisée par l'équipe de Lehmann-Che et al. pour identifier les tumeurs moléculaires apocrines avec une sensibilité de 94% et une spécificité de 100% quand son expression est associée à HER2 (3+) (dans le cas des tumeurs moléculaires apocrines quelque soit le statut HER2) (63) .

L'enzyme codée par le gène *GGT1* est une gamma-glutamyltransférase de type I qui catalyse le transfert de la fraction glutamyl du glutathion à une variété d'acides aminés et d'accepteurs de dipeptides. GGT1 avait été identifié dans l'analyse d'expression de Farmer et al. (32) et a déjà été utilisé pour tenter d'identifier les tumeurs apocrines moléculaires en IHC (140,161).

Nous avons pu montrer que ces marqueurs apocrines précédemment publiés, GCDFP15, FOXA1 et GGT1 différencient les tumeurs moléculaires apocrines des basales dans le sous-groupe des tumeurs triple négatives. L'utilisation de ces marqueurs IHC est plus robuste quand ils sont associés au RA au sein d'un score composite, dit *IHC4 apocrine score* que lorsqu'ils sont utilisés seuls. Nous n'avons pas pu réaliser d'analyse de profil transcriptomique, avec des transcrits caractérisant les sous-groupes basaux versus moléculaires apocrines selon Farmer et al. (32). Ceci aurait permis de corréler ces marqueurs IHC avec la signature transcriptomique princeps pour identifier les tumeurs moléculaires apocrines parmi les triple négatives. Cette analyse n'a pas pu être réalisée pour des raisons de quantité de matériel tumoral insuffisant.

Après avoir isolé ces quatre marqueurs IHC relatifs au caractère 'apocrine' des tumeurs et qui identifient les tumeurs moléculaires apocrines parmi les tumeurs triple négatives, nous avons dans un second temps exploré ces marqueurs en tant que facteurs prédictifs potentiels de réponse à l'abiratérone.

## Prédire la réponse à l'abiratérone : le RA a un rôle prédictif limité

Dans notre cohorte de patientes traitées par abiratérone, la positivité du RA seule ( $\geq 10\%$ ) n'était pas suffisante pour identifier les répondeurs en raison de nombreux cas de faux positifs. Nos résultats montrent que le RA seul a une faible valeur prédictive positive (VPP) d'efficacité de 25% pour l'abiratérone (tableau 9). L'analyse des patientes incluses dans l'essai avec l'enzalutamide retrouve ce manque de sensibilité/spécificité du RA seul pour identifier les patientes en réponse alors même que la molécule cible directement le RA en tant qu'antagoniste compétitif du RA (243). Dans cette étude, une valeur prédictive de 30% a été retrouvée avec un seuil de positivité du RA à 10%.

Nous avons cherché à identifier un seuil différent du RA comme facteur prédictif de réponse aux anti-androgènes. Une méta-analyse récemment publiée propose l'utilisation d'un seuil de positivité du RA à 78% quand ce dernier est utilisé comme facteur pronostic dans l'ensemble des cancers du sein (348). Ce seuil découle d'une analyse de sensibilité/spécificité du seuil de positivité du RA par courbe ROC (*receiver operating characteristic*) (348). Nous avons également cherché à faire varier le seuil du RA en tant que facteur prédictif potentiel. Nos données indiquent que la variation du seuil de positivité du RA améliore peu la VPP dans la cohorte abiratérone (tableau 9A). Il en est de même dans la cohorte enzalutamide dans laquelle l'augmentation du seuil retenu de positivité du RA entraîne la perte d'un grand nombre de patientes répondeuses présentant un RA en dessous de ce seuil (28% des répondeurs exclus avec un seuil du RA à 80%) (tableau 9B).

Alors même que le seuil de RA  $\geq 10\%$  a été retenu dans la littérature tant du fait de données rétrospectives (98) que prospectives dans les trois essais cliniques (122–124) testant des anti-androgènes, il existe quelques données de patientes traitées par enzalutamide avec des tumeurs exprimant faiblement le RA (entre 1 et 9%) (124). Ces patientes ont été incluses dans une cohorte exploratoire de l'essai américain avec l'enzalutamide avec une seule réponse objective (réponse complète) observée sur 40 patientes traitées. Nos résultats ainsi que ces données issues de l'essai enzalutamide posent le problème de la corrélation entre expression du RA en IHC et réponse aux anti-androgènes ; corrélation qui n'apparaît pas suffisamment

discriminante en termes de prédiction de réponse. De même, il a été mis en lumière l'existence d'une variabilité d'expression du RA trop importante selon l'anticorps anti-RA immunohistochimique utilisé (243). L'utilisation d'un seul marqueur IHC, même s'il s'agit du RA, pour tenter de prédire la réponse à un anti-androgène est insuffisante.

## A

| RA H-score (/100) |         |         |        |        |                       |                        |                               |
|-------------------|---------|---------|--------|--------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|
| Cut-off           | VPP (%) | VPN (%) | Se (%) | Sp (%) | Précision du test (%) | Perte de répondeur (%) | Taux de screening négatif (%) |
| 10%               | 25      | 100     | 100    | 10     | 31                    | 0                      | -                             |
| 30%               | 30      | 100     | 100    | 30     | 46                    | 0                      | 23                            |
| 50%               | 33      | 100     | 100    | 40     | 54                    | 0                      | 31                            |
| 80%               | 35      | 100     | 100    | 45     | 58                    | 0                      | 35                            |

## B

| RA H-score (/100) |         |         |        |        |                       |                        |                               |
|-------------------|---------|---------|--------|--------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|
| Cut-off           | VPP (%) | VPN (%) | Se (%) | Sp (%) | Précision du test (%) | Perte de répondeur (%) | Taux de screening négatif (%) |
| 10%               | 30      | 90      | 90     | 30     | 45                    | 10                     | -                             |
| 30%               | 37      | 94      | 90     | 49     | 59                    | 10                     | 40                            |
| 50%               | 36      | 90      | 76     | 55     | 60                    | 24                     | 48                            |
| 80%               | 40      | 90      | 72     | 64     | 66                    | 28                     | 55                            |

**Tableau 9. Performance de différents seuils d'expression du RA en IHC pour discriminer les patientes en fonction de leurs réponses.**

**A**, Patientes traitées par abiratérone (cohorte de l'essai UCBG12-1, (123)); **B**, Patientes traitées par enzalutamide (cohorte de l'essai MDV3100-11, (243)).

VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité. Précision du test : (Vrai positif + Vrai négatif)/total de patiente en %. Perte de répondeur : pourcentage de patientes ayant présenté une réponse qui ne sont plus considérées car présentent une expression du RA en dessous du seuil testé. Taux de screening négatif : pourcentage de patientes qui n'auraient pas participé à l'essai en fonction du seuil de RA testé. L'expression du RA est ici exprimée en H score pour la cohorte abiratérone à la différence des données présentées dans la publication de nos travaux et à des fins de comparaison avec les données disponibles sur l'enzalutamide.

## Prédire la réponse à l'abiratérone : caractéristiques IHC apocrines et profil génomique

A partir des marqueurs apocrines discriminants les tumeurs moléculaires apocrines au sein des tumeurs triple négatives, nous avons montré que la combinaison de l'expression protéique du RA, de GCDFP15, de FOXA1 et de GGT1 est capable de discriminer les répondeurs des non-répondeurs à l'abiratérone. Les résultats de ce score « IHC4 apocrine » (RA, GCDFP15, FOXA1 et GGT1) semblent plus précis et moins dépendant de la lecture anatomopathologique de la présence morphologique de caractéristiques apocrines retrouvées chez 75% (21/28) des patients de notre série dont l'ensemble des répondeurs (6/6) mais également 66% des non-répondeurs (15/22). Les tumeurs répondant à l'abiratérone sont profondément apocrines d'après nos données, or le rôle des androgènes dans le développement des lésions apocrines du sein est fortement suspecté (130). Ceci pourrait donc expliquer la sensibilité aux anti-androgènes des tumeurs les plus apocrines dans ce sous-groupe de tumeurs probablement hétérogènes. Ces données sont à interpréter au regard des taux de réponse majeurs obtenus avec les anti-androgènes dans les carcinomes des glandes salivaires qui présentent classiquement des caractéristiques morphologiques apocrines (338). Néanmoins, dans ces tumeurs d'un autre type, aucune donnée n'est disponible sur un possible rôle prédictif de réponse des anti-androgènes en fonction de la prépondérance des caractéristiques apocrines.

Nous avons démontré qu'en plus du caractère profondément apocrine en IHC, les patientes en réponse présentent un profil génomique pouvant être comparé à celui des tumeurs lumineales. Les définitions princeps transcriptomiques de ce sous-groupe moléculaire apocrine retrouvent une expression de gènes classiquement exprimés dans les tumeurs lumineales RE-positives (32,36,37). Les études confirmant l'existence du sous-groupe moléculaire apocrine HER2 non-amplifié au sein des tumeurs triple négatives ont d'ailleurs proposé comme dénomination pour ce sous-groupe le terme : *Luminal Androgen Receptor* (27,35).

Nous avons ainsi montré dans ce projet que les patientes en réponse à l'abiratérone présentent des taux élevés de mutations *hotspots* activatrices de *PIK3CA* et un faible taux de mutations *TP53* contrairement aux patientes non-répondeuses. Dans une

étude récemment publiée sur plus de 2400 cancers du sein confirmant des données déjà publiées (30), les tumeurs RE-positives présentent un taux de mutations *PIK3CA* de 45% et un taux de mutations *TP53* de 20% alors que les tumeurs RE-négatives présentent un profil inverse avec environ 20% de mutations *PIK3CA* et 75% de mutations *TP53* établissant deux profils distincts (349). Nous retrouvons donc un profil en miroir relativement comparable selon le statut de réponse à l'abiratérone avec les tumeurs en réponse possédant un profil proche des tumeurs lumineales. Nos résultats font état d'une fréquence élevée de mutations de *PIK3CA*, 50% (N=12/24), dans l'ensemble de notre cohorte traitée par abiratérone. Lehman et al. avaient antérieurement retrouvé une fréquence comparable de 40% de mutations de *PIK3CA* dans une cohorte de tumeurs moléculaires apocrines (150).

Un autre argument en faveur d'une distinction des tumeurs moléculaires apocrines en 2 sous-groupes réside dans la prolifération tumorale. En effet, l'expression du marqueur de prolifération KI67 en IHC est différentiellement plus faible dans les tumeurs en réponse à l'abiratérone qu'en non-réponse. Ce résultat est à mettre en perspective de publications récentes montrant qu'un index de prolifération bas est associé aux tumeurs moléculaires apocrines par rapport aux tumeurs basales dans le groupe des tumeurs triple négatives. Un index de prolifération KI67 bas y a également été associé avec la positivité du RA (114,120,345,350). Nos données ne permettent pas d'éliminer l'hypothèse que les index de prolifération bas des répondeurs (moyenne de 15%, min-max : 5-35%) pourraient expliquer la meilleure réponse au traitement, simplement par le fait que ces tumeurs sont moins agressives. La faible prolifération des tumeurs en réponse à l'abiratérone vient donc renforcer l'hypothèse d'un sous-groupe de tumeurs moléculaires apocrines différenciables par des caractéristiques qui pourraient se rapprocher de celles de tumeurs RE-positives, lumineales.

La mise en évidence de ces différences selon le statut de réponse à l'abiratérone nous a conduit à tenter d'identifier deux sous-groupes distincts au sein des tumeurs MA.

Pour ce faire, nous sommes partis d'une cohorte de tumeurs moléculaires apocrines HER2 non-amplifiées issues de l'essai clinique EORTC 10994 (165). La combinaison de ces patientes avec les patientes de l'essai UCBG12-1 (abiratérone dans les

cancers moléculaires apocrines) a permis d'analyser un total de 53 patientes sur le plan IHC et génomique (statut *TP53*). Le statut mutationnel de *PIK3CA* n'était pas disponible pour les tumeurs issues de l'essai EORTC 10994.

Sur ces 53 patientes, nous avons montré que le score IHC apocrine (*IHC4 apocrine score*, associant les marquages du RA, FOXA1, GCDP15 et GGT1) permet d'isoler 2 sous-groupes de tumeurs. Le seuil utilisé pour ce score est de 65/100, correspondant au 75<sup>ème</sup> percentile de la distribution de ce score dans la cohorte. Le choix de ce seuil est basé sur le rationnel du bénéfice clinique observé avec les anti-androgènes à 6 mois de traitement, de l'ordre de 18 à 28% des patientes incluses dans les essais cliniques publiés (122–124). Avec ce seuil de 65/100, le score apocrine isole donc 25% des patientes de la cohorte. L'étude de ces patientes présentant un score apocrine IHC élevé (patientes avec un score supérieur au 75<sup>ème</sup> percentile) montre une prédominance de tumeurs sauvages pour *TP53* et une tendance à un index de prolifération Ki67 plus faible que les tumeurs avec un score apocrine bas. Isoler les patientes présentant un score IHC apocrine élevé permet d'identifier les tumeurs moléculaires apocrines qui présentent des caractéristiques proches des répondeurs à l'abiratérone.

Nous proposons ainsi l'hypothèse d'une segmentation des tumeurs moléculaires apocrines en deux sous-groupes prédictifs de réponse à l'abiratérone, hypothèse qui pourrait être étendue aux autres anti-androgènes (figure 19). Celle-ci se base sur des marqueurs apocrines (RA, FOXA1, GGT1, GCDP15), sur le statut mutationnel de *PIK3CA* / *TP53* et également sur la prolifération établie par le marqueur Ki67 permettant probablement une sélection des tumeurs moléculaires apocrines les plus à même de présenter un bénéfice clinique à un traitement anti-androgène.

Ces caractéristiques restent à valider comme prédictives de réponse à un traitement anti-androgène dans une cohorte prospective. Malgré l'absence de cohorte indépendante nous permettant cette validation, nos résultats sont néanmoins en faveur d'une sélection plus avancée que par le RA seul des tumeurs moléculaires apocrines lorsqu'un traitement anti-androgène est envisagé.

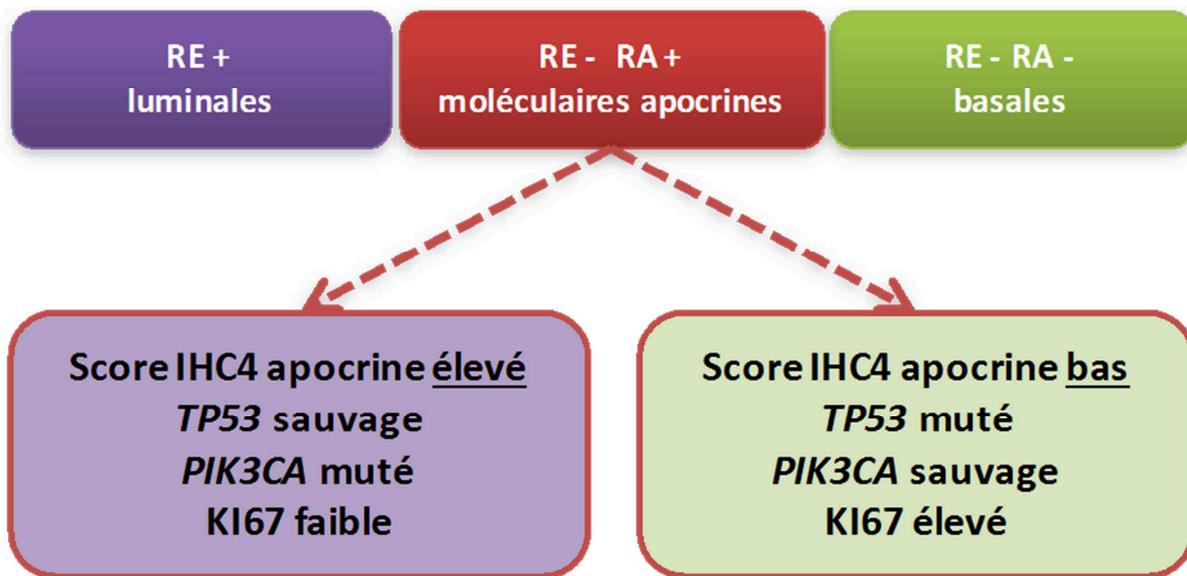


Figure 18. Proposition de sous-segmentation des tumeurs moléculaires apocrines HER2 non-amplifiées basée sur les caractéristiques prédictives potentielles de réponse à l'abiratérone.

## Prédire la réponse à l'abiratérone : autres pistes de recherche de facteurs prédictifs

Les signatures ARN ont connu un développement majeur en onco-sénologie, à visée de catégorisation pronostic en sous-groupe moléculaire ou à visée pronostic permettant une aide à la décision de traitement adjuvant de chimiothérapie dans les tumeurs lumineales de stade précoces (351). Cet avènement a permis l'accès simplifié à une recherche de signature prédictive d'efficacité de l'abiratérone à partir de l'ARN tumoral des patientes incluses dans notre essai par la technologie Nanostring (352); matériel ARN en quantité et qualité limitées.

En partant de notre hypothèse de prépondérance du caractère profondément moléculaire apocrine des répondeurs, nous avons sélectionnés des gènes décrits comme différentiellement exprimés entre tumeurs du groupe basal et du groupe moléculaire apocrine dans l'article princeps de Farmer et al. (32). Seuls les gènes les plus différenciant répondeurs et non répondeurs ont été sélectionnés. Cette signature intègre également les gènes les plus différentiellement sous-exprimés chez les répondeurs, principalement en lien avec les voies de réparation des dommages à l'ADN. L'application non-supervisée des 14 transcrits de cette signature dans notre cohorte traitée par abiratérone isole deux groupes de patientes avec une durée de réponse différentielle statistiquement significative, HR= 0,14 (0,037-0,53),  $p= 0,0037$ . Cette proposition de signature doit être validée sur une cohorte indépendante mais montre la possibilité d'isoler les patientes en fonction de leur durée de réponse au-delà des critères IHC ou génomiques déjà démontrés dans ce travail.

Nous aurions souhaité tester l'ensemble des gènes différentiels décrit dans les publications de Farmer et al. et Doane et al. (32,36) entre tumeurs moléculaires apocrines et basales sur notre cohorte. Néanmoins, le panel de transcript utilisé (*Nanostring Pan Cancer*) était trop limité avec 41 gènes analysable sur les 400 et 138 dans les 2 publications initiales respectivement. De plus, nous n'avons pas de matériel tumoral suffisant pour réaliser une technique d'analyse transcriptomique plus large de type microarray.

Des travaux antérieurs aux nôtres ont exploré d'autres pistes de recherche de facteurs prédictifs de réponse à l'abiratérone mais dans le contexte particulier des cancers du sein luminaux, récepteurs œstrogènes positifs (353). Un essai randomisé de phase 2 a testé l'exemestane, inhibiteur de l'aromatase, associé ou non à l'abiratérone chez des patientes ménopausées avec un cancer du sein métastatique (340). Le rationnel repose sur la positivité du RA dans une majorité des tumeurs lumineuses (RE positives), sur les interactions fortes connues entre RE et RA et sur l'hypothèse du rôle du RA et des androgènes dans la résistance aux anti-aromatases non stéroïdiens. Dans l'analyse ancillaire de cette étude, les auteurs ont décrit une tendance à une association entre augmentation de la survie sans progression (SSP) lors de l'adjonction d'abiratérone à l'exemestane pour les tumeurs RA positives versus négatives (HR = 0,56 [IC95% : 0,24-1,33], p= 0,19). Le dosage sérique de différentes hormones stéroïdes comme la progestérone dont la production est paradoxalement induite par l'abiratérone n'ont pas été retrouvé significativement associée à une augmentation de SSP (353). L'expression du RA sur les cellules tumorales circulantes semble par contre être associée à la réponse à l'abiratérone (353). Dans notre essai sur les tumeurs moléculaires apocrines, une recherche de cellules tumorales circulantes a été protocolairement prévue mais le matériel sérique n'a été recueilli que pour trop peu de patientes pour confirmer l'intérêt de ce potentiel facteur prédictif de réponse. Ce marqueur reste néanmoins intéressant à explorer dans de futurs essais car il présente l'avantage d'être peu invasif dans sa réalisation (prise de sang) ainsi que de pouvoir être évalué de manière précoce dans le traitement. Les dosages hormonaux sériques n'ont pas été réalisés dans notre essai UCBG12-1.

Nous avons en revanche cherché à corréliser l'efficacité de l'abiratérone avec l'expression de sa cible, le CYP17A1 sur les cellules tumorales en IHC. Cette association a été retrouvée dans le contexte de carcinome de prostate métastatique résistant à la castration sur des prélèvements de métastases osseuses exprimant un marquage du CYP17 sur plus de 10% des cellules (354). Nous avons réalisé différents tests d'anticorps anti-CYP17A1 en IHC. Ces tests n'ont pas été concluants car le marquage était systématiquement nucléaire et non spécifique des cellules cancéreuses.

Dans les tumeurs de prostate, un facteur prédictif de non-réponse à l'abiratérone pourrait être la présence de mutation du RA, notamment les mutations de résistance telles que T877A ou T878K (355,356). L'inhibition du CYP17 par l'abiratérone pourrait dans ce cas induire une augmentation du taux intracellulaire de progestérone qui activerait le programme transcriptionnel du RA du fait de changement conformationnel du RA par la mutation de son *ligand binding domain*. La progestérone deviendrait ainsi un ligand du RA. Dans notre cohorte, une seule mutation du RA a été retrouvée en NGS en position R616C. Cette mutation a déjà été rapportée dans COSMIC sur un carcinome de l'endomètre (178). La pathogénicité de cette mutation est inconnue mais concerne le domaine *Zinc Finger* et non le *ligand binding domain* comme retrouvé dans les mutations de résistance classiques du RA. Cette unique mutation du RA sur 26 cas analysés a de plus été retrouvée chez une patiente en réponse à l'abiratérone. Sur notre cohorte, nous ne pouvons donc pas valider ce facteur de non-réponse à l'abiratérone.

L'équipe du *Memorial Sloan Katering Cancer Center* de New York est une équipe très impliquée dans la recherche clinique sur les tumeurs moléculaires apocrines. Cette équipe a réalisé une étude de phase 2 testant dans les mêmes conditions que notre essai, l'enzalutamide, anti-androgène antagoniste du RA (124). Les patientes pouvaient être incluses dans cet essai sur la positivité du RA à partir de 1% des cellules pour une étude exploratoire et à partir de 10% pour l'analyse principale d'efficacité (comme dans notre essai avec l'abiratérone).

Un des objectifs exploratoire pré-planifié de l'étude était la recherche de biomarqueur prédictif de réponse à l'enzalutamide. Pour cela, une analyse transcriptomique a retrouvé plus de 500 gènes différentiellement exprimés de manière significative entre répondeurs et non-répondeurs à l'enzalutamide. Celle-ci a conduit à la création puis à la validation interne d'un test qualifié de 'diagnostic' par les auteurs, ayant une visée prédictive de réponse (357).

Les résultats présentés en congrès montrent ainsi qu'environ la moitié de la population en intention de traiter de cet essai exprime ce profil d'expression dit *PREDICT AR+*. Ces patientes présentent un taux de bénéfice clinique à 16 semaines de traitements de 39% contre 11% pour le groupe de patientes ne présentant pas ce profil d'expression (*PREDICT AR-*). Ces résultats sont de 36% versus 6% pour le taux de bénéfice à 24 semaines avec une survie sans progression (SSP) médiane de

16,1 versus 8,1 semaines,  $p=0,037$ . Dans le sous-groupe des patientes traitées en première ou deuxième ligne par enzalutamide, l'écart est encore plus important pour les patientes *PREDICT AR+* avec une SSP médiane de 40,4 versus 8,9 semaines (*PREDICT AR-*),  $p<0,001$  (242,347). Plus précisément, sur les 7 patientes ayant présenté une réponse objective (partielle ou complète), 5 présentaient le profil d'expression *PREDICT AR+*. Il est intéressant de noter que la plupart des tumeurs avec une expression forte du RA (entre 75 et 100% en IHC) sont *PREDICT AR+* par rapport à une expression plus faible (moins de 75%) du RA : 78% des patientes (40/51) et 23% (15/65) respectivement. La composition de cette signature transcriptomique n'est à ce jour pas rendue publique car ces données n'ont pas encore été publiées. Néanmoins ces données démontrent la possibilité d'isoler un sous-groupe de patientes présentant une probabilité importante de bénéfice prolongé à un anti-androgène.

Les données cliniques ont également été corrélées avec la réponse des anti-androgènes dans les trois différentes études cliniques. Nous avons essayé de corréler la réponse à l'abiratérone avec des données clinico-biologiques des patientes incluses. Ces comparaisons sont exploratoires du fait de la puissance limitée des effectifs. Les patientes en réponse en comparaison de celles en non-réponse dans notre cohorte abiratérone semblent plus âgées (76 versus 62 ans), semblent présenter une tumeur de bas grade (grade Elston & Ellis, SBR 1 pour 66% versus 31%) et ne semblent pas présenter d'atteinte métastatique viscérale majeure. Ces éléments ont également été notés dans l'étude TBCRC011 avec le bicalutamide (122). Dans l'étude enzalutamide, les patientes en réponses étaient ainsi statistiquement plus âgées de 5,2 ans par rapport aux non-répondeurs (59,8 ans vs 54,6 ans ;  $p= 0,03$ ; (243). Ceci est à analyser à la lumière d'études ayant suggérées que les patientes plus âgées peuvent avoir un meilleur pronostic que les plus jeunes dans le groupe des tumeurs triple négatives (358). Il y a donc un potentiel biais de confusion dans l'identification de ce facteur prédictif.

Ces trois critères (patientes âgées, tumeur de bas grade et faible atteinte viscérale) confortent l'hypothèse biologique que les patientes en réponse à l'abiratérone présentent des tumeurs moléculaires apocrines moins agressives (corrélant le marquage KI67 plus faible chez les patientes en réponses). De plus, ces trois

caractéristiques peuvent être utilisées pour qualifier les tumeurs lumineales en comparaison des tumeurs non-lumineales, notamment basales, plus agressives et touchant des patientes plus jeunes corrélant ainsi nos profils génomiques distinctifs (*TP53* peu muté et *PIK3CA* préférentiellement muté chez les répondeuses).

Les trois études thérapeutiques menées chez les patientes moléculaires apocrines avec des anti-androgènes retrouvent une tendance à une meilleure efficacité des anti-androgènes en cas d'utilisation en première ou deuxième ligne de traitement métastatique (357). Ceci est néanmoins un facteur classique d'efficacité des traitements anti-cancéreux, quel qu'en soit le type et pourrait donc lui aussi être confondant.

Notre travail de recherche de facteurs prédictifs de réponse à l'abiratérone a une portée limitée, de génération d'hypothèse, devant premièrement le faible taux de réponse obtenu dans notre essai clinique (20%) et deuxièmement du fait d'un effectif limité de 30 patientes analysées. Une autre limite vient du matériel tumoral disponible. Nous n'avons pu récupérer que du matériel FFPE d'âge et de quantité variable provenant de tumeurs primaires ou métastatiques, sur biopsie ou pièce chirurgicale. Néanmoins, nous n'avons travaillé que sur du matériel avec une cellularité tumorale supérieure à 20%, avec des moyennes allant de 51% à 61% pour les parties de blocs FFPE prélevées pour extraction ADN et ARN. Aucun matériel tumoral exploitable n'a été retrouvé pour deux patientes de l'essai abiratérone, et l'ensemble des patientes ne possédaient pas suffisamment de matériel pour la réalisation de l'ensemble des analyses prévues : extraction d'ADN, d'ARN et réalisation du TMA. Malgré la portée certes limitée, il n'y a pas d'autres études publiées sur la recherche de facteurs prédictifs dans ce sous-groupe tumoral.

Comme nous l'avons vu, la limite principale de ces recherches est d'une part le faible nombre de patientes testées (6 en réponse) et d'autre part l'absence de disponibilité d'une cohorte indépendante permettant de valider l'ensemble des facteurs identifiées comme potentiellement prédictifs. A cette fin, nous avons recherché en France et à l'étranger l'existence de données de patientes traitées par abiratérone pour des tumeurs moléculaires apocrines avancées, dans des conditions similaires à celles de l'essai UCBG 12-1. Nous avons par exemple interrogé la base de données de vie

réelle d'UNICANCER, *ESME Metastatic Breast Cancer* (359) sans résultat. Les seules données disponibles sont celles de patientes incluses avec les mêmes critères dans l'essai français de phase 2 de médecine de précision, SHIVA (238). Cet essai n'a inclus que quatre patientes moléculaires apocrines HER2-négatives traitées par abiratérone. Aucune n'a présenté de bénéfice clinique à 6 mois de traitement. Le matériel tumoral a été récupéré grâce à une collaboration avec le Pr Le Tourneau de l'Institut Curie, pour deux patientes. Les analyses IHC réalisées sur ces deux cas sont concordantes avec nos données des patientes non-répondeuses notamment sur le score *IHC4 apocrine* (bas) et le marqueur de prolifération KI67 (élevé). Nous n'avons pas réalisé d'analyses NGS ou transcriptomique du fait du faible nombre de cas disponibles. Néanmoins, les analyses NGS réalisés lors de l'inclusion dans l'essai thérapeutique ne retrouvaient pas de mutations *PIK3CA*. Les données de ces deux cas en non-réponses sont donc concordantes avec les données de notre cohorte mais ne permettent pas de valider nos hypothèses.

Des pistes de validation pourraient être envisagées, par l'analyse d'une cohorte de tumeurs moléculaires apocrines traitées par un autre anti-androgène, ou sur des données rétrospectives de patientes traitées de manière compassionnelle (hors AMM) dans des centres experts en France. Il semble probable que les hypothèses générées sur l'abiratérone à partir des marqueurs IHC ou du profil mutationnel tumoral puissent s'extrapoler aux tumeurs des patientes traitées par un autre anti-androgène. Ceci est notamment le cas concernant les données cliniques potentiellement prédictives de réponse (patientes âgées, tumeur de bas grade et faible atteinte viscérale) observées dans les trois essais, mêmes si elles restent exploratoires à ce stade.

Nos hypothèses prédictives concordent vers l'existence de deux sous-groupes distincts parmi les tumeurs moléculaires apocrines HER2-négatives basés sur des caractéristiques différentielles que l'on peut comparer à celles classiquement retrouvées entre les tumeurs lumineales et les tumeurs basales. Nous n'avons pas en notre possession suffisamment de matériel pour pouvoir rechercher un profil d'expression de gènes luminaux versus basaux dans nos groupes de patientes afin de renforcer cette proposition. Là encore, ce travail pourrait probablement être

réalisé dans une autre cohorte de patientes traitées par anti-androgènes à la recherche de deux entités transcriptomique distinctes.

De nombreuses études cliniques sont en cours, avec des monothérapies d'anti-androgènes, ou des combinaisons (voir tableau 7 ; introduction). Celles-ci permettent d'envisager d'avoir accès à de plus grandes cohortes de patientes à la recherche de facteurs prédictifs de réponse dans ce sous-groupe tumoral.

## Améliorer les taux de réponse à l'abiratérone : cibler la voie de signalisation PI3K

La validation de facteurs prédictifs de réponse étant limitée par l'absence de cohorte de validation, un deuxième objectif de ce travail a concerné l'amélioration des taux de réponse observés sous abiratérone seule.

Pour ce faire nous avons cherché des cibles thérapeutiques potentielles dans notre cohorte de tumeurs moléculaires apocrines.

Les analyses NGS ont permis de confirmer l'absence de mutations récurrentes en dehors de *TP53* et *PIK3CA*. Le panel utilisé était limité à une centaine de gènes à partir de matériel FFPE. Un article récent rapporte les résultats du séquençage massif de plus de 2400 cancers du sein par technique NGS et confirme les conclusions connues d'absence d'événements génomiques mutationnels récurrents autres que *TP53* et *PIK3CA* (>5%) dans les tumeurs RE-négatives (349).

Dans notre analyse, les variants ont été retenus de manière rigoureuse afin d'éliminer au maximum les erreurs de séquençage ou autres variants non pathogènes. En effet, l'objectif était ici de ne conserver que des variants d'intérêt clinique. La sélection des variants a ainsi été réalisée à partir des données rapportées dans COSMIC (178), puis sur la pathogénicité des variants qui a été établie grâce à six bases de données reconnues : cancer hotspot (360), oncoKB (361), cBioportal (362), tumorportal (363), IARC TP53 (364), UMD BRCA (365).

Nos analyses révèlent que 67% (16/24) des tumeurs de la cohorte de l'essai UCBG 12-1 présentent une altération ciblable de la voie *PI3K/AKT/mTOR* dont une majorité de mutation *hotspots* de *PIK3CA*. Quatre des 12 mutations de *PIK3CA* sont retrouvées chez des patientes répondeuses, soit 4/6 répondeuses et 8/18 non-répondeuses mutées pour *PIK3CA*. Ces taux de mutation sont en accord avec la littérature qui retrouve entre 36-40% de mutation *PIK3CA* dans deux séries indépendantes de tumeurs moléculaires apocrines versus 4-9% dans les tumeurs basales RA-négatives (150,151).

Nous avons décidé de ne pas tester biologiquement le ciblage combiné de la voie de signalisation *PI3K/AKT/mTOR* avec un anti-androgène car ce travail a déjà été

effectué (150). L'équipe de Lehman et al. (150) a rapporté en 2014 une étude préclinique utilisant l'antagoniste du RA, bicalutamide, combiné avec deux inhibiteurs différents de PI3K. Ces résultats étaient en faveur d'une action additive de cette association sur la réduction de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. De plus, sur la base de ce rationnel, des études cliniques sont en cours avec l'enzalutamide combiné à un l'inhibiteur de PIK3- $\alpha$  : alpelisib (étude de phase I, NCT03207529) ou taselisib (étude de phase I/II, NCT02457910). Par ailleurs, l'expérience clinique dans les tumeurs RE-positives des inhibiteurs de PI3K dans les cancers du sein avancé est, à ce jour, mitigée avec une efficacité limitée et une toxicité importante (366,367). Ces données sont issues d'essais avec des inhibiteurs non spécifiques de PI3K pouvant expliquer ces résultats. Il faut noter que le rôle prédictif de la présence d'une altération de la voie PI3K (mutation de *PIK3CA*, etc...) sur l'efficacité de ces traitements ciblés n'a pas été clairement démontré à ce jour.

## Améliorer les taux de réponse à l'abiratérone: rationnel pour cibler les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN

Les analyses d'expression génique sur ARN tumoral nous ont permis d'isoler des cibles thérapeutiques potentielles, différenciellement exprimées entre répondeurs et non-répondeurs à l'abiratérone. L'analyse supervisée d'expression différentielle a mis en évidence une expression moindre des gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN (DDR, *DNA Damage Repair*), dans la prolifération et le cycle cellulaire chez les patientes répondeuses versus non-répondeuses. Celle-ci corrèle avec l'expression IHC faible du marqueur de prolifération KI67 constatée chez les répondeuses. Cette analyse supervisée retrouve 31 gènes différenciellement exprimés entre répondeurs et non répondeurs. Neuf d'entre eux sont liés au cycle cellulaire/prolifération et/ou à la réparation des dommages à l'ADN et présentent tous une sous-expression relative chez les répondeurs versus non-répondeurs. L'analyse n'a retrouvé au contraire qu'un seul gène relativement surexprimé chez les répondeurs, *GADD45A* (*Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha*) appartenant à ces mécanismes cellulaires spécifiques. L'étude de cette liste de 9 gènes a rapidement mis en lumière *CHEK1*. En effet ce gène code une protéine possédant une fonction Sérine/thréonine kinase impliquée dans des mécanismes capitaux de régulation du cycle cellulaire suite à des dommages à l'ADN et dont la sous-expression pourrait contribuer au comportement tumoral des répondeurs (368). De plus, l'activité de Chk1 peut être directement ciblée par des inhibiteurs spécifiques en cours d'évaluation dans des essais cliniques (273,280). Nous avons donc testé l'hypothèse biologique que l'inhibition de Chk1 pourrait améliorer l'efficacité de l'abiratérone.

Le profil CGH de notre patiente en réponse complète, présente un profil peu remanié avec notamment une perte de 2 de ses 3 copies du locus de *ATM* et *CHEK1*. Nous ne pouvons pas éliminer que le faible niveau d'expression de certains gènes impliqués dans les mécanismes de réparations des dommages à l'ADN ou dans la prolifération chez les répondeurs est une conséquence directe d'un faible réarrangement génomique des tumeurs qui répondent à l'abiratérone. Dans cette hypothèse, les patientes en non-réponse à l'abiratérone administrée en

monothérapie pourraient être des patientes présentant un profil génomique plus complexe avec un nombre de réarrangements plus important nécessitant un système de réparation des dommages à l'ADN efficace.

Trois autres tumeurs de patientes répondeuses ont pu être analysées en CGH. Une seule d'entre elles présente également une perte d'hétérozygotie du gène *CHEK1*. Nous ne pouvons donc pas exclure l'existence de mécanismes de régulation transcriptionnel expliquant la sous-expression observée. Les patientes avec un profil d'expression de type non-répondeuse devraient bénéficier d'une thérapeutique combinant l'abiratéronne avec un agent ciblant spécifiquement les mécanismes de réparations des dommages à l'ADN.

L'approche consistant à cibler les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN a été entreprise depuis de nombreuses années dans le cancer du sein (256) et plus récemment dans le cancer de la prostate (249). La réponse aux dommages à l'ADN (DDR) comprend l'activation de nombreux mécanismes cellulaires qui empêchent la duplication des lésions de l'ADN et maintiennent ainsi l'intégrité génomique, point essentiel pour la survie cellulaire; que les cellules soit normales ou cancéreuses (276,369). Certains gènes spécifiques impliqués dans le DDR, gènes suppresseurs de tumeurs, tels que *BRCA 1/2* et *TP53* sont retrouvés mutés dans les cancers du sein et de la prostate et participe à l'oncogénèse et à l'évolution tumorale (370–372). Par ailleurs, diverses voies de signalisations oncogéniques impliquant des gènes tels que *AKT* et *C-MYC* sont classiquement activées, augmentant le stress de réplication et donc l'instabilité génomique des cellules cancéreuses (373–375). Ces événements peuvent rendre les cellules cancéreuses particulièrement sensibles à l'inhibition des voies de réparation des dommages à l'ADN, telles que l'inhibition de PARP dans les tumeurs avec déficits pré-existants de mécanismes de réparations de type recombinaison homologue (homologous recombination, HR) comme une mutation des gènes *BRCA*, créant une létalité synthétique ou une cytotoxicité synergique (376).

Dans des modèles de cancer de la prostate, des recherches récentes mettent en évidence le rôle du récepteur aux androgènes comme régulateur de certains gènes impliqués dans les mécanismes du DDR, fournissant un rationnel pour combiner des agents endommageant l'ADN ou des inhibiteurs du DDR avec une hormonothérapie

anti-androgènes (249). Ceci conforte notre intérêt pour la sous-expression relative de certains gènes du DDR, dont *CHEK1*, dans notre cohorte de tumeurs moléculaires apocrines en réponse à l'abiratérone; également objectivé par une sous expression relative des voies impliquées dans les réparations des dommages à l'ADN en analyse IPA (*Inguinity Pathway analysis*). L'ensemble de ces données nous a fourni le rationnel des tests précliniques de combinaison de traitement par abiratérone et inhibiteur de Chk1.

Chk1 agit comme point de contrôle du cycle cellulaire pour les phases S et G2/M (377–380). L'activation de Chk1 retarde ainsi temporairement la progression du cycle cellulaire à travers l'arrêt en phases S et G2/M. Chk1 est classiquement activé par les dommages de l'ADN ou de manière générale par l'ensemble des stress de réplication. Le retard entraîné dans le cycle cellulaire permet aux cellules de réparer efficacement les lésions de leurs ADN (381). Le ciblage des voies du DDR tel que l'inhibition de Chk1 a été étudié dans les cancers de prostate, type de tumeur classiquement androgène-dépendante. Ainsi, des résultats prometteurs dans des modèles précliniques de cancer de la prostate ont été retrouvés avec une combinaison anti-androgène (enzalutamide) et inhibiteur de Chk1 (AZD7762) (382). Ceci représente un argument supplémentaire pour tester l'hypothèse qu'une combinaison abiratérone plus inhibiteur de Chk1 dans les cancers moléculaires apocrines peut augmenter le taux de réponse observé avec l'abiratérone seul.

Une étude antérieure à nos travaux à montrer que la forme activée de Chk1, phosphorylée sur la sérine 345, pourrait avoir une valeur pronostique voir prédictive de survie dans des cancers du sein triple négatifs (sans distinction faite en fonction du sous-type moléculaire) (284). Dans cette série de tumeurs antérieurement traitées par chimiothérapie (cyclophosphamide, methotrexate et 5-fluorouracil) la présence de l'expression de p-Chk1 S345 est associée à une faible survie et une augmentation du taux de rechute locale (284). Avant d'initier nos expériences précliniques avec des inhibiteurs de Chk1, nous avons pris soin de tester les tumeurs des patientes incluses dans l'essai clinique UCBG12-1 (abiratérone) afin de quantifier l'expression IHC de pChk1. Nous n'avons pas réussi à détecter d'expression suffisante notamment en nucléaire de p-Chk1 (Ser345) (données non présentées) pour comparer l'expression dans nos deux groupes de patientes en fonction de la réponse

à l'abiratéron. Cette faible expression protéique avait déjà été relevée dans un travail publié dans le cancer du sein sur le caractère pronostic voir prédictif d'un tel marquage (284), limitant son utilisation en pratique.

## Améliorer les taux de réponse à l'abiratérone: Combinaison avec un inhibiteur de Chk1

Nous avons vérifié la spécificité d'action des inhibiteurs de Chk1 en monothérapie ou en combinaison dans nos modèles précliniques moléculaires apocrines. Cela a été réalisé premièrement par la constatation de la diminution quantitative de la cible, la protéine Chk1 activée (p-Chk1 Ser296) en western blot et secondairement par l'accumulation consécutive des cassures double brins démontrée par marquage immunofluorescent de phospho-gamma-H2AX en microscopie confocale. Nos résultats retrouvent ainsi une spécificité d'action des inhibiteurs de Chk1 permettant de poursuivre les investigations de cette combinaison.

Pour valider Chk1 en tant que co-cible, nous avons sélectionné les deux modèles cellulaires classiques moléculaires apocrines : la lignée MDA-MB-453 mais aussi la lignée SUM185PE (36). Nos expériences de sensibilité *in vitro* ont permis de mettre en évidence une activité additive ou synergique de l'abiratérone combinée à un inhibiteur de Chk1 sur la viabilité cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire dans les phases S ou G2/M induisant une majoration de la mort cellulaire. Afin de valider les résultats obtenus avec l'inhibiteur de Chk1, GDC-0575 (inhibiteur spécifique de Chk1 obtenu par une collaboration avec le laboratoire GENETECH, MTA # OR-216276), nous avons testé un deuxième inhibiteur de Chk1, l'AZD7762 (inhibiteur de Chk1 et Chk2), dont l'utilisation et l'efficacité ont déjà été rapportées dans d'autres modèles (383,384). Les données avec ce deuxième inhibiteur de Chk1 confortent et valident celles retrouvées avec le GDC-0575. En suivant l'hypothèse biologique issue de l'analyse différentielle transcriptomique entre répondeurs et non-répondeurs, nous avons donc validé l'intérêt de cibler Chk1 *in vitro* en combinaison avec l'abiratérone.

Nous pouvons nous interroger sur la synergie ou l'effet additif retrouvé avec l'abiratérone en combinaison avec un inhibiteur de Chk1 qui n'apparaît pas majeur. Les index de combinaison selon le calcul de Chou et Talalay (385) sont compris entre 0,8 et 1. Ils doivent être interprétés en prenant en compte le fait que la thérapie de base est une hormonothérapie, inhibiteur de synthèse des androgènes avec une action cytostatique et non cytotoxique. Ainsi les combinaisons avec une

chimiothérapie cytotoxique mènent plus facilement à des synergies fortes, l'index de combinaison étant dans ces cas-là inférieur à 0,8 (273). Par exemple, des index de combinaison inférieurs à 0,5 sont retrouvés en utilisant une combinaison de chimiothérapie type gemzar avec un inhibiteur de Chk1 dans des modèles de sarcomes des tissus mous (273). Comme dans nos expériences, une faible magnitude de synergie a déjà été retrouvée avec différentes thérapies combinées à un anti-androgène spécifiquement dans la lignée MDA-MB-453 (150,235,386) mais aussi dans deux lignées non moléculaires apocrines triple négatives (159). Ces combinaisons concernent plusieurs anti-androgènes (bicalutamide ou enzalutamide) et plusieurs inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR.

L'effet synergique retrouvé avec l'abiratérone n'a pas été reproduit avec d'autres anti-androgènes agissant comme antagonistes du RA comme l'enzalutamide ou l'ODM-201. Nos résultats montrent donc une spécificité d'efficacité de cette combinaison abiratérone et inhibiteur de Chk1. Nous pouvons amener plusieurs points de réflexion pour tenter de l'expliquer : (1) la sous-expression relative des gènes de réparation des dommages à l'ADN, dont *CHEK1*, a été retrouvée chez des patientes de notre cohorte traitées par l'abiratérone ; (2) les antagonistes du RA (enzalutamide ou ODM-201) n'ont pas le même mécanisme d'action anti-androgénique que les inhibiteurs de synthèse des androgènes comme l'abiratérone ; (3) nous avons retrouvé une sensibilité légèrement supérieure de l'abiratérone sur nos modèles cellulaires par rapport à l'enzalutamide et à l'ODM-201 mais restant dans la même gamme de dose ; (4) enfin, nous n'avons pas remarqué de problème de précipitation ou de cristallisation lors de la combinaison des inhibiteurs de Chk1 avec les deux antagonistes du RA. Nous avons donc conclu à une spécificité d'action de la combinaison abiratérone et inhibiteur de Chk1 dans ces modèles moléculaires apocrines.

De même, nous avons testé un inhibiteur du cycle cellulaire, ne ciblant pas de manière spécifique un des 9 gènes retrouvés dans l'analyse supervisée différentielle ARN selon la réponse à l'abiratérone : le palbociclib. Cet inhibiteur de CDK4/6 possède une autorisation de mise sur le marché dans les tumeurs mammaires avancées lumineales (RE+, quel que soit le RA) (239,387). Cette molécule présente une efficacité importante dans la lignée cellulaire MDA-MB-453 par rapport à d'autres

lignées cellulaires de cancer du sein (388). Néanmoins, nous n'avons pas retrouvé d'activité additive ou synergique quand cette molécule est combinée avec l'abiratérone. Cela pourrait être lié à l'inactivation de la protéine du rétinoblastome (Rb) dans la lignée MDA-MB-453 (177), qui a été associée à une activité faible du palbociclib. De plus, l'inhibition du cycle cellulaire par le ciblage direct de CDK4/6 induit un arrêt du cycle en phase G1 par l'intermédiaire de E2F ce qui constitue une action anti-mitotique. Cette inhibition du cycle est donc différente de l'effet observé avec un inhibiteur de Chk1 qui induit lui une libération des phases S et G2/M concourant en théorie à une catastrophe mitotique. La sous-expression de certains gènes de réparation des dommages à l'ADN (dont Chk1) observée chez les répondeurs semble sur des modèles cellulaires présenter plus d'intérêt à cibler en combinaison avec l'abiratérone que le blocage du cycle cellulaire par l'intermédiaire de CDK4/6. Il faut noter que le développement et les très bons résultats obtenus par les combinaisons hormonothérapie et inhibiteurs de CDK4/6 (palbociclib ou ribociclib) dans les tumeurs RE+ a mené à la réalisation d'études cliniques associant l'enzalutamide au palbociclib ou au ribociclib (NCT03090165, NCT02605486). Certaines preuves d'activités précliniques de type synergie/additivité de la combinaison enzalutamide-palbociclib ont depuis été également publiées dans plusieurs lignées triple négatives RA-positives dont la lignée MDA-MB-453 (237). Nous n'avons pour notre part pas testé le palbociclib en association avec les anti-androgènes antagonistes du RA (enzalutamide ou ODM-201). Concernant le palbociclib, il pourrait exister, comme pour l'association abiratérone et inhibiteur de Chk1, un effet uniquement additif/synergique avec un seul type particulier d'anti-androgènes ; les antagonistes du RA dans ce cas précis.

Un autre argument venant renforcer l'intérêt de la combinaison abiratérone et inhibiteur de Chk1 repose sur le taux élevé de mutation inactivatrice de *TP53* retrouvé chez les patientes en non-réponse dans notre essai clinique. Les mutations affectant *TP53* induisent des changements de structures de la protéine et/ou une perte de la capacité d'interaction avec l'ADN (389,390) résultant en une perte de la fonction suppresseur de tumeur et plus récemment décrit, un gain de fonction oncogénique (389). L'inactivation de P53 induit ainsi une perte du point de contrôle de la phase G1 du cycle cellulaire (277). Dans la condition où les points de contrôle des phases S et G2 sont abrogés par un inhibiteur de Chk1, les cellules cancéreuses

p53 déficientes (par mutation) devraient alors subir une catastrophe mitotique par absence total de blocage au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire (278,279) (introduction, figure 14).

Les patientes présentant une tumeur mutée *TP53*, qui semblent être plus susceptibles de ne pas répondre à l'abiratéronne seule, sont donc théoriquement celles qui pourraient tirer le plus grand bénéfice de cette combinaison avec inhibiteur de Chk1. Des données précliniques viennent valider ce rôle prédictif de réponse à un inhibiteur de Chk1 dans des cellules cancéreuses p53-déficientes (259,273,276,391,392).

De manière spécifique, dans les lignées cellulaires de cancer du sein, le rôle du statut de p53 sur la réponse aux inhibiteurs de Chk1 est discuté. L'équipe de Ma et al. rapporte que p53 déficient est un déterminant majeur de l'activité des inhibiteurs de Chk1 (272) alors que Bryant et al. ne trouvent pas cette corrélation (393). Nos lignées cellulaires MDA-MB-453 et SUM185PE, comme une majorité de nos patientes non-répondeuses à l'abiratéronne, sont mutées pour *TP53*, pT382S et pQ144X respectivement (données fournies par le Dr De Cremoux, CNRS UMR7212/INSERM U944; Hôpital Saint-Louis; Paris, France).

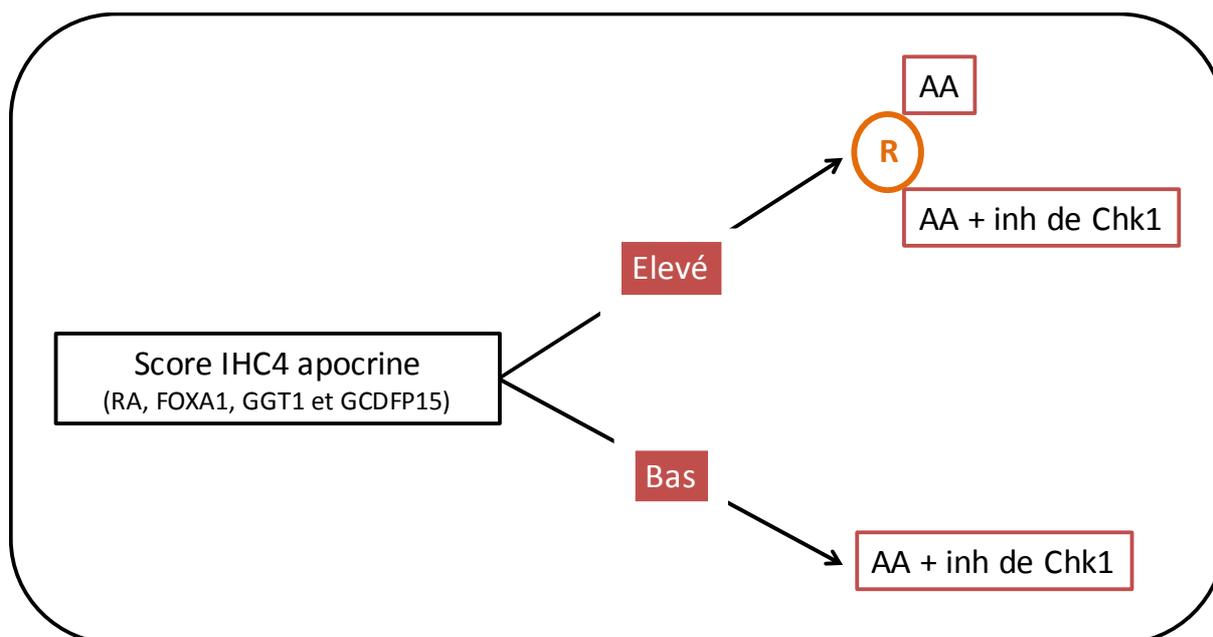
Nous nous sommes interrogés sur les potentielles limites de nos données précliniques. Une de ces limites outre les problématiques liées aux modèles utilisés et détaillés dans notre premier projet, concerne l'intérêt d'utiliser l'abiratéronne pour des expériences *in vitro*. En effet, son action est anti-enzymatique sur la production intracellulaire d'androgènes. Malgré cette action théorique, l'abiratéronne a déjà été utilisée et publiée dans un modèle préclinique de cancer de prostate et son activité a été démontrée comme étant liée à son activité enzymatique mais également à une activité antagoniste du RA (394,395). Nous considérons donc que cette molécule peut être utilisée pour des tests précliniques dans nos modèles de tumeurs mammaires moléculaires apocrines.

Afin de poursuivre la validation de notre hypothèse, nous avons confirmé *in vivo* nos expériences *in vitro* de la combinaison abiratéronne et inhibiteur de Chk1 par la technique d'injection intracanalair mammaire directe plutôt que l'injection en *fat pad* (coussinet graisseux). Cette technique permet aux cellules tumorales mammaires de retrouver un micro-environnement plus physiologique pour reproduire la croissance

d'une tumeur mammaire. La technique utilisée est identique à celle décrite par nos collègues de l'équipe de Behbod (396). Notre publication sur les PDX a démontré la possibilité d'utiliser cette technique pour évaluer la réponse à des traitements (397).

Nos résultats sur greffes *in vivo* orthotopiques de la lignée MDA-MB-453 sont en faveur d'une efficacité additive de la combinaison versus les monothérapies (GDC-0575 et abiratérone). L'abiratérone comme l'enzalutamide présentent une activité sur la croissance tumorale avec une réduction tumorale sur les 7 à 10 premiers jours de traitement avant de perdre cette efficacité. Ceci est probablement lié à une taille tumorale trop importante après 20 jours de greffe. Ces hormonothérapies cytostatiques n'arrivent alors probablement plus à contrôler une tumeur ayant dépassé un certain volume.

Nous avons démontré à partir d'une hypothèse biologique que Chk1 peut être proposé pour une étude clinique de phase précoce en tant que co-cible à l'abiratérone dans la majorité des tumeurs moléculaires apocrines ; présentant une sous-expression relative des voies de réparation des dommages à l'ADN (non-répondeurs de l'étude, 24/30 patientes). La sélection de ces patientes en vue d'un tel essai précoce pourrait alors être basée sur nos résultats d'identification de facteurs prédictifs de réponse à l'abiratérone avec une stratification en fonction du score apocrine en IHC (figure 20). Les patientes avec un score bas seraient traitées directement par la combinaison avec un inhibiteur de Chk1 ; les patientes avec un score élevé seraient randomisées entre abiratérone seul ou en combinaison avec un inhibiteur de Chk1. En cas de score élevé, l'essai permettrait de répondre à la question de la nécessité ou non de réaliser la combinaison dans ce groupe de patientes pour lequel un taux élevé de réponse à l'abiratérone seule est attendu. Un cross-over vers la combinaison serait proposé en cas de non réponse précoce à 8 semaines.



**Figure 19. Proposition d'un potentiel essai thérapeutique faisant suite aux résultats précliniques issus de la cohorte de l'essai abiratérone, UBGC12-1.**

Score IHC4 apocrine calculé comme l'addition des scores d'expression immunohistochimiques des quatres marqueurs RA, FOXA1, GGT1 et GCDFP15 ;  
Seuil de 75%.

AA : abiratérone ; inh de Chk1 : inhibiteur de Chk1 ; R : randomisation

# Conclusion

---

Les travaux de cette thèse ont produit des données venant renforcer les connaissances de la littérature pour remettre en question le modèle classique d'étude préclinique, la lignée MDA-MB-453 dans sa représentativité des tumeurs moléculaires apocrines. Ce faisant nous avons proposé un nouveau type de modèle, sous forme de PDX orthotopiques de tumeurs moléculaires apocrines. L'étude d'un nouvel anti-androgène, l'ODM-201, ne nous a pas permis de mettre en lumière un intérêt supérieur par rapport à d'autres anti-androgènes déjà testés en études cliniques.

Nos travaux permettent d'apporter des hypothèses fortes de facteurs prédictifs de réponse à l'abiratérone au sein des patientes présentant des tumeurs moléculaires apocrines, triple négatives RA-positives. Ces facteurs prédictifs potentiels résument des caractéristiques tumorales intrinsèques, notamment apocrine, par des marqueurs immunohistochimiques ou génomiques accessibles en pratique clinique. Enfin, nous avons identifié et validé l'hypothèse que Chk1 représente une cible de choix dans les tumeurs ne présentant pas un profil de réponse à l'abiratérone seul. Ces données fournissent un rationnel préclinique pour des essais thérapeutiques de combinaisons thérapeutiques visant à améliorer les taux de bénéfice clinique dans une population sélectionnée de tumeurs moléculaires apocrines.

# Références

---

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2013;49:1374–403.
2. Gatta G, Mallone S, van der Zwan JM, Trama A, Siesling S, Capocaccia R, et al. Cancer prevalence estimates in Europe at the beginning of 2000. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2013;24:1660–6.
3. INCA. DÉPISTAGE DES CANCERS: RECOMMANDATIONS ET CONDUITES À TENIR. État des connaissances au 29 avril 2016. 2017.
4. Moss SM, Cuckle H, Evans A, Johns L, Waller M, Bobrow L, et al. Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality at 10 years' follow-up: a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2006;368:2053–60.
5. INCA. FEMMES PORTEUSES D'UNE MUTATION DE BRCA1 OU BRCA2 /Détection précoce du cancer du sein et des annexes et stratégies de réduction du risque. 2017.
6. Sinn H-P, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care Basel Switz*. 2013;8:149–54.
7. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. World Health Organization classification of tumours of the breast. IARC, Lyon. 2012;
8. O'Malley FP, Bane A. An update on apocrine lesions of the breast. *Histopathology*. 2008;52:3–10.
9. Curigliano G, Burstein HJ, P Winer E, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017;28:1700–12.
10. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707–12.
11. Vollenweider-Zerargui L, Barrelet L, Wong Y, Lemarchand-Béraud T, Gómez F. The predictive value of estrogen and progesterone receptors' concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women. Clinical correlation on 547 patients. *Cancer*. 1986;57:1171–80.
12. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747–52.
13. Sørlie 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 U S A*. 2001;98:10869–74.
14. 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 U S A*. 2003;100:8418–23.
15. Sotiriou C, Neo S-Y, 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 U S A*. 2003;100:10393–8.
16. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27:1160–7.
17. Sestak I, Cuzick J, Dowsett M, Lopez-Knowles E, Filipits M, Dubsy P, et al. Prediction of late distant recurrence after 5 years of endocrine treatment: a combined analysis of patients from the Austrian breast and colorectal cancer study group 8 and arimidex, tamoxifen alone or in combination randomized trials using the PAM50 risk

- of recurrence score. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015;33:916–22.
18. Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2014;25:339–45.
  19. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5:5–23.
  20. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010;220:263–80.
  21. Turner N, Lambros MB, Horlings HM, Pearson A, Sharpe R, Natrajan R, et al. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene*. 2010;29:2013–23.
  22. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007;13:4429–34.
  23. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008;52:108–18.
  24. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:1938–48.
  25. Kassam F, Enright K, Dent R, Dranitsaris G, Myers J, Flynn C, et al. Survival outcomes for patients with metastatic triple-negative breast cancer: implications for clinical practice and trial design. *Clin Breast Cancer*. 2009;9:29–33.
  26. Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377:523–33.
  27. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121:2750–67.
  28. Ring BZ, Hout DR, Morris SW, Lawrence K, Schweitzer BL, Bailey DB, et al. Generation of an algorithm based on minimal gene sets to clinically subtype triple negative breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2016;16:143.
  29. Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018;
  30. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490:61–70.
  31. Giordano SH, Temin S, Kirshner JJ, Chandarlapaty S, Crews JR, Davidson NE, et al. Systemic therapy for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014;32:2078–99.
  32. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*. 2005;24:4660–71.
  33. Iggo RD. New insights into the role of androgen and oestrogen receptors in molecular apocrine breast tumours. *Breast Cancer Res BCR*. 2011;13:318.
  34. Lehmann BD, Pietersen JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol*. 2014;232:142–50.
  35. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua

- SAW, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015;21:1688–98.
36. Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene.* 2006;25:3994–4008.
  37. Guedj M, Marisa L, de Reynies A, Orsetti B, Schiappa R, Bibeau F, et al. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene.* 2012;31:1196–206.
  38. Sanga S, Broom BM, Cristini V, Edgerton ME. Gene expression meta-analysis supports existence of molecular apocrine breast cancer with a role for androgen receptor and implies interactions with ErbB family. *BMC Med Genomics.* 2009;2:59.
  39. INCA. Les cancers en France, Edition 2013. 2013.
  40. Lakis S, Kotoula V, Eleftheraki AG, Batistatou A, Bobos M, Koletsa T, et al. The androgen receptor as a surrogate marker for molecular apocrine breast cancer subtyping. *Breast Edinb Scotl.* 2014;23:234–43.
  41. Schwander H, Marvin HN. Treatment of carcinoma of the human breast with testosterone propionate; a report of five cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 1947;7:423–32.
  42. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995;83:835–9.
  43. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell.* 1999;97:161–3.
  44. Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:247–72.
  45. McKenna NJ, Evans RM, O'Malley BW. Nuclear Receptor Signaling: a home for nuclear receptor and coregulator signaling research. *Nucl Recept Signal.* 2014;12:e006.
  46. Gronemeyer H, Gustafsson J-A, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:950–64.
  47. Lamont KR, Tindall DJ. Androgen regulation of gene expression. *Adv Cancer Res.* 2010;107:137–62.
  48. Stanisić V, Lonard DM, O'Malley BW. Modulation of steroid hormone receptor activity. *Prog Brain Res.* 2010;181:153–76.
  49. O'Malley BW, Kumar R. Nuclear receptor coregulators in cancer biology. *Cancer Res.* 2009;69:8217–22.
  50. Yamamoto KR, Darimont BD, Wagner RL, Iñiguez-Lluhí JA. Building transcriptional regulatory complexes: signals and surfaces. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1998;63:587–98.
  51. Casella R, Maduro MR, Lipshultz LI, Lamb DJ. Significance of the polyglutamine tract polymorphism in the androgen receptor. *Urology.* 2001;58:651–6.
  52. McEwan IJ. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11:281–93.
  53. Hickey TE, Robinson JLL, Carroll JS, Tilley WD. Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? *Mol Endocrinol Baltim Md.* 2012;26:1252–67.
  54. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2002;20:3001–15.
  55. He B, Kemppainen JA, Voegel JJ, Gronemeyer H, Wilson EM. Activation

function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. *J Biol Chem.* 1999;274:37219–25.

56. Lorente D, Mateo J, Zafeiriou Z, Smith AD, Sandhu S, Ferraldeschi R, et al. Switching and withdrawing hormonal agents for castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2015;12:37–47.

57. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 1997;18:306–60.

58. Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoute J, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet.* 2006;38:1289–97.

59. Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, et al. Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001;76:23–30.

60. Wong C-W, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheski BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:14783–8.

61. Lindzey J, Kumar MV, Grossman M, Young C, Tindall DJ. Molecular mechanisms of androgen action. *Vitam Horm.* 1994;49:383–432.

62. Dohle GR, Smit M, Weber RFA. Androgens and male fertility. *World J Urol.* 2003;21:341–5.

63. Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas.* 2009;63:142–8.

64. Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin S-X, Simard J, Pelletier G, et al. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol.* 2005;187:169–96.

65. Zhu Y-S, Imperato-McGinley JL. 5 $\alpha$ -reductase isozymes and androgen actions in the prostate. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1155:43–56.

66. Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M, et al. Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol.* 2000;25:1–16.

67. Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Hirakawa H, et al. 5 $\alpha$ -reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of in situ androgen production. *Int J Cancer.* 2007;120:285–91.

68. Risbridger GP, Davis ID, Birrell SN, Tilley WD. Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:205–12.

69. Heemers HV, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev.* 2007;28:778–808.

70. Koochekpour S. Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J Androl.* 2010;12:639–57.

71. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat.* 2012;33:887–94.

72. Coutinho I, Day TK, Tilley WD, Selth LA. Androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer: a lesson in persistence. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23:T179–97.

73. Haile S, Sadar MD. Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2011;68:3971–81.

74. Kong D, Sethi S, Li Y, Chen W, Sakr WA, Heath E, et al. Androgen receptor splice variants contribute to prostate cancer aggressiveness through induction of EMT and expression of stem cell marker genes. *The Prostate.* 2015;75:161–74.

75. Rytinki MM, Kaikkonen S, Sutinen P, Palvimo JJ. Analysis of androgen receptor SUMOylation. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;776:183–97.
76. Bruchoovsky N, Lesser B, Van Doorn E, Craven S. Hormonal effects on cell proliferation in rat prostate. *Vitam Horm*. 1975;33:61–102.
77. Lee C. Physiology of castration-induced regression in rat prostate. *Prog Clin Biol Res*. 1981;75A:145–59.
78. Isaacs JT. Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *The Prostate*. 1984;5:545–57.
79. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63:11–30.
80. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev*. 2004;25:276–308.
81. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin*. 1972;22:232–40.
82. Huggins C. Endocrine-induced regression of cancers. *Cancer Res*. 1967;27:1925–30.
83. Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Common gene rearrangements in prostate cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011;29:3659–68.
84. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005;310:644–8.
85. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*. 2010;18:11–22.
86. Forsbach G, Güitrón-Cantú A, Vázquez-Lara J, Mota-Morales M, Díaz-Mendoza ML. Virilizing adrenal adenoma and primary amenorrhea in a girl with adrenal hyperplasia. *Arch Gynecol Obstet*. 2000;263:134–6.
87. Fioretti FM, Sita-Lumsden A, Bevan CL, Brooke GN. Revising the role of the androgen receptor in breast cancer. *J Mol Endocrinol*. 2014;52:R257–65.
88. Panet-Raymond V, Gottlieb B, Beitel LK, Pinsky L, Trifiro MA. Interactions between androgen and estrogen receptors and the effects on their transactivational properties. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;167:139–50.
89. Ellem SJ, Risbridger GP. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1155:174–86.
90. Birrell SN, Bentel JM, Hickey TE, Ricciardelli C, Weger MA, Horsfall DJ, et al. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;52:459–67.
91. Birrell SN, Butler LM, Harris JM, Buchanan G, Tilley WD. Disruption of androgen receptor signaling by synthetic progestins may increase risk of developing breast cancer. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2007;21:2285–93.
92. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Bélanger A, Simard J, Lin S-X, et al. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocr Rev*. 2003;24:152–82.
93. Rizza P, Barone I, Zito D, Giordano F, Lanzino M, De Amicis F, et al. Estrogen receptor beta as a novel target of androgen receptor action in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res BCR*. 2014;16:R21.
94. Dimitrakakis C, Zhou J, Wang J, Belanger A, LaBrie F, Cheng C, et al. A physiologic role for testosterone in limiting estrogenic stimulation of the breast. *Menopause N Y N*. 2003;10:292–8.

95. Garay JP, Park BH. Androgen receptor as a targeted therapy for breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2012;2:434–45.
96. Feng J, Li L, Zhang N, Liu J, Zhang L, Gao H, et al. Androgen and AR contribute to breast cancer development and metastasis: an insight of mechanisms. *Oncogene*. 2016;
97. Vera-Badillo FE, Templeton AJ, de Gouveia P, Diaz-Padilla I, Bedard PL, Al-Mubarak M, et al. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106:djt319.
98. McNamara KM, Yoda T, Takagi K, Miki Y, Suzuki T, Sasano H. Androgen receptor in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;133:66–76.
99. Lea OA, Kvinnsland S, Thorsen T. Improved measurement of androgen receptors in human breast cancer. *Cancer Res*. 1989;49:7162–7.
100. Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, et al. Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancers. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2011;22:1755–62.
101. Hall RE, Aspinall JO, Horsfall DJ, Birrell SN, Bentel JM, Sutherland RL, et al. Expression of the androgen receptor and an androgen-responsive protein, apolipoprotein D, in human breast cancer. *Br J Cancer*. 1996;74:1175–80.
102. Vaz-Luis I, Winer EP, Lin NU. Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: does estrogen receptor status define two distinct subtypes? *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013;24:283–91.
103. Bozovic-Spasojevic I, Zardavas D, Brohée S, Ameye L, Fumagalli D, Ades F, et al. The Prognostic Role of Androgen Receptor in Patients with Early-Stage Breast Cancer: A Meta-analysis of Clinical and Gene Expression Data. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017;23:2702–12.
104. Qu Q, Mao Y, Fei X, Shen K. The impact of androgen receptor expression on breast cancer survival: a retrospective study and meta-analysis. *PloS One*. 2013;8:e82650.
105. Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Palla SL, Carey M, Agarwal R, Meric-Berstam F, et al. Androgen receptor levels and association with PIK3CA mutations and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009;15:2472–8.
106. Agoff SN, Swanson PE, Linden H, Hawes SE, Lawton TJ. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am J Clin Pathol*. 2003;120:725–31.
107. Yu Q, Niu Y, Liu N, Zhang JZ, Liu TJ, Zhang RJ, et al. Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as a prognostic factor. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2011;22:1288–94.
108. Gasparini P, Fassan M, Cascione L, Guler G, Balci S, Irkkan C, et al. Androgen receptor status is a prognostic marker in non-basal triple negative breast cancers and determines novel therapeutic options. *PloS One*. 2014;9:e88525.
109. Tang D, Xu S, Zhang Q, Zhao W. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2012;29:526–33.
110. Yu K-D, Zhu R, Zhan M, Rodriguez AA, Yang W, Wong S, et al. Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013;19:2723–33.
111. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO.

- Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007;109:25–32.
112. Luo X, Shi Y-X, Li Z-M, Jiang W-Q. Expression and clinical significance of androgen receptor in triple negative breast cancer. *Chin J Cancer*. 2010;29:585–90.
  113. He J, Peng R, Yuan Z, Wang S, Peng J, Lin G, et al. Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2012;29:406–10.
  114. Sutton LM, Cao D, Sarode V, Molberg KH, Torgbe K, Haley B, et al. Decreased androgen receptor expression is associated with distant metastases in patients with androgen receptor-expressing triple-negative breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2012;138:511–6.
  115. Elebro K, Bendahl P-O, Jernström H, Borgquist S. Androgen receptor expression and breast cancer mortality in a population-based prospective cohort. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;
  116. Hu R, Dawood S, Holmes MD, Collins LC, Schnitt SJ, Cole K, et al. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011;17:1867–74.
  117. Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Centenera MM, Harris JM, et al. Androgen receptor inhibits estrogen receptor-alpha activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res*. 2009;69:6131–40.
  118. McGhan LJ, McCullough AE, Protheroe CA, Dueck AC, Lee JJ, Nunez-Nateras R, et al. Androgen receptor-positive triple negative breast cancer: a unique breast cancer subtype. *Ann Surg Oncol*. 2014;21:361–7.
  119. Pistelli M, Caramanti M, Biscotti T, Santinelli A, Pagliacci A, De Lisa M, et al. Androgen receptor expression in early triple-negative breast cancer: clinical significance and prognostic associations. *Cancers*. 2014;6:1351–62.
  120. Mrklič I, Pogorelič Z, Capkun V, Tomić S. Expression of androgen receptors in triple negative breast carcinomas. *Acta Histochem*. 2013;115:344–8.
  121. Aleskandarany MA, Abduljabbar R, Ashankyty I, Elmouna A, Jerjees D, Ali S, et al. Prognostic significance of androgen receptor expression in invasive breast cancer: transcriptomic and protein expression analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;159:215–27.
  122. Gucaip A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013;19:5505–12.
  123. Bonnefoi H, Grellety T, Tredan O, Saghatchian M, Dalenc F, Mailliez A, et al. A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27:812–8.
  124. Traina TA, Miller K, Yardley DA, Eakle J, Schwartzberg LS, O’Shaughnessy J, et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2018;36(9):884–90.
  125. Ni M, Chen Y, Lim E, Wimberly H, Bailey ST, Imai Y, et al. Targeting androgen receptor in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Cell*. 2011;20:119–31.
  126. Oftedal OT. The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002;7:225–52.
  127. Liao DJ, Dickson RB. Roles of androgens in the development, growth, and carcinogenesis of the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002;80:175–89.
  128. Anderson E, Clarke RB. Steroid receptors and cell cycle in normal mammary

- epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004;9:3–13.
129. Gatalica Z. Immunohistochemical analysis of apocrine breast lesions. Consistent over-expression of androgen receptor accompanied by the loss of estrogen and progesterone receptors in apocrine metaplasia and apocrine carcinoma in situ. *Pathol Res Pract*. 1997;193:753–8.
130. Selim AG, Wells CA. Immunohistochemical localisation of androgen receptor in apocrine metaplasia and apocrine adenosis of the breast: relation to oestrogen and progesterone receptors. *J Clin Pathol*. 1999;52:838–41.
131. Gromov P, Espinoza JA, Talman M-L, Honma N, Kroman N, Wielenga VT, et al. FABP7 and HMGCS2 Are Novel Protein Markers for Apocrine Differentiation Categorizing Apocrine Carcinoma of the Breast. *PloS One*. 2014;9:e112024.
132. Celis JE, Cabezón T, Moreira JMA, Gromov P, Gromova I, Timmermans-Wielenga V, et al. Molecular characterization of apocrine carcinoma of the breast: validation of an apocrine protein signature in a well-defined cohort. *Mol Oncol*. 2009;3:220–37.
133. Leon-Ferre RA, Polley M-Y, Liu H, Gilbert JA, Cafourek V, Hillman DW, et al. Impact of histopathology, tumor-infiltrating lymphocytes, and adjuvant chemotherapy on prognosis of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;
134. Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Christenson JL, Elias A, Richer JK. Androgen Receptor Biology in Triple Negative Breast Cancer: a Case for Classification as AR+ or Quadruple Negative Disease. *Horm Cancer*. 2015;6:206–13.
135. Safarpour D, Pakneshan S, Tavassoli FA. Androgen receptor (AR) expression in 400 breast carcinomas: is routine AR assessment justified? *Am J Cancer Res*. 2014;4:353–68.
136. Lehmann-Che J, Hamy A-S, Porcher R, Barritault M, Bouhidel F, Habuelleliah H, et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res BCR*. 2013;15:R37.
137. Haagensen DE, Mazoujian G, Holder WD, Kister SJ, Wells SA. Evaluation of a breast cyst fluid protein detectable in the plasma of breast carcinoma patients. *Ann Surg*. 1977;185:279–85.
138. Darb-Esfahani S, von Minckwitz G, Denkert C, Ataseven B, Högel B, Mehta K, et al. Gross cystic disease fluid protein 15 (GCDFP-15) expression in breast cancer subtypes. *BMC Cancer*. 2014;14:546.
139. Tsang JYS, Ni Y-B, Chan S-K, Shao M-M, Law BKB, Tan PH, et al. Androgen receptor expression shows distinctive significance in ER positive and negative breast cancers. *Ann Surg Oncol*. 2014;21:2218–28.
140. Cha YJ, Jung W-H, Koo JS. The clinicopathologic features of molecular apocrine breast cancer. *Korean J Pathol*. 2012;46:169–76.
141. Bae MS, Park SY, Song SE, Kim WH, Lee SH, Han W, et al. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: mammographic, US, and MR imaging features according to androgen receptor expression. *Eur Radiol*. 2015;25:419–27.
142. Mrklič I, Pogorelić Z, Capkun V, Tomić S. Expression of androgen receptors in triple negative breast carcinomas. *Acta Histochem*. 2013;115:344–8.
143. Sutton LM, Cao D, Sarode V, Molberg KH, Torgbe K, Haley B, et al. Decreased androgen receptor expression is associated with distant metastases in patients with androgen receptor-expressing triple-negative breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2012;138:511–6.
144. McNamara KM, Yoda T, Miki Y, Chanplakorn N, Wongwaisayawan S, Incharoen P, et al. Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumors: its

correlation with tumor cell proliferation. *Cancer Sci.* 2013;104:639–46.

145. Tsutsumi Y. Apocrine carcinoma as triple-negative breast cancer: novel definition of apocrine-type carcinoma as estrogen/progesterone receptor-negative and androgen receptor-positive invasive ductal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2012;42:375–86.

146. Niemeier LA, Dabbs DJ, Beriwal S, Striebel JM, Bhargava R. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2010;23:205–12.

147. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25:25–9.

148. Jézéquel P, Loussouarn D, Guérin-Charbonnel C, Campion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res BCR.* 2015;17:43.

149. Naderi A, Hughes-Davies L. A functionally significant cross-talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer. *Neoplasia N Y N.* 2008;10:542–8.

150. Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM, Pendleton CS, Tang L, Johnson KC, et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res BCR.* 2014;16:406.

151. Millis SZ, Gatalica Z, Winkler J, Vranic S, Kimbrough J, Reddy S, et al. Predictive Biomarker Profiling of > 6000 Breast Cancer Patients Shows Heterogeneity in TNBC, With Treatment Implications. *Clin Breast Cancer.* 2015;15:473–81.e3.

152. Hall RE, Birrell SN, Tilley WD, Sutherland RL. MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 1994;30A:484–90.

153. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, Cittelly DM, Howe EN, D'Amato NC, et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res BCR.* 2014;16:R7.

154. Malinen M, Toropainen S, Jääskeläinen T, Sahu B, Jänne OA, Palvimo JJ. Androgen receptor- and PIAS1-regulated gene programs in molecular apocrine breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;

155. Robinson JLL, Macarthur S, Ross-Innes CS, Tilley WD, Neal DE, Mills IG, et al. Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1. *EMBO J.* 2011;30:3019–27.

156. Augello MA, Hickey TE, Knudsen KE. FOXA1: master of steroid receptor function in cancer. *EMBO J.* 2011;30:3885–94.

157. Naderi A, Meyer M, Dowhan DH. Cross-regulation between FOXA1 and ErbB2 signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Neoplasia N Y N.* 2012;14:283–96.

158. Chia KM, Liu J, Francis GD, Naderi A. A feedback loop between androgen receptor and ERK signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Neoplasia N Y N.* 2011;13:154–66.

159. Cuenca-López MD, Montero JC, Morales JC, Prat A, Pandiella A, Ocana A. Phospho-kinase profile of triple negative breast cancer and androgen receptor signaling. *BMC Cancer.* 2014;14:302.

160. Ni M, Chen Y, Fei T, Li D, Lim E, Liu XS, et al. Amplitude modulation of androgen signaling by c-MYC. *Genes Dev.* 2013;27:734–48.
161. Banneau G, Guedj M, MacGrogan G, de Mascarel I, Velasco V, Schiappa R, et al. Molecular apocrine differentiation is a common feature of breast cancer in patients with germline PTEN mutations. *Breast Cancer Res BCR.* 2010;12:R63.
162. Gelmon K, Dent R, Mackey JR, Laing K, McLeod D, Verma S. Targeting triple-negative breast cancer: optimising therapeutic outcomes. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2012;23:2223–34.
163. Bae MS, Park SY, Song SE, Kim WH, Lee SH, Han W, et al. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: mammographic, US, and MR imaging features according to androgen receptor expression. *Eur Radiol.* 2015;25:419–27.
164. Bonnefoi H et al. Molecular apocrine-like tumours identified by central assessment using a tissue microarray construct in EORTC 10994/BIG 1-00 phase III study : pathological response and clinical outcomes. Unpubl Data.
165. Bonnefoi H, Piccart M, Bogaerts J, Mauriac L, Fumoleau P, Brain E, et al. TP53 status for prediction of sensitivity to taxane versus non-taxane neoadjuvant chemotherapy in breast cancer (EORTC 10994/BIG 1-00): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2011;12:527–39.
166. Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, Weaver D, Edgerton S, Cowan D, et al. HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2007;357:1496–506.
167. Loibl S, Müller BM, von Minckwitz G, Schwabe M, Roller M, Darb-Esfahani S, et al. Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130:477–87.
168. Bonnefoi H, Litière S, Piccart M, MacGrogan G, Fumoleau P, Brain E, et al. Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy is an independent predictive factor irrespective of simplified breast cancer intrinsic subtypes: a landmark and two-step approach analyses from the EORTC 10994/BIG 1-00 phase III trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2014;25:1128–36.
169. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet.* 2014;384:164–72.
170. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013;19:5533–40.
171. Asano Y, Kashiwagi S, Onoda N, Kurata K, Morisaki T, Noda S, et al. Clinical verification of sensitivity to preoperative chemotherapy in cases of androgen receptor-expressing positive breast cancer. *Br J Cancer.* 2016;114:14–20.
172. Goetz MP, Kalari KR, Suman VJ, Moyer AM, Yu J, Visscher DW, et al. Tumor Sequencing and Patient-Derived Xenografts in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109.
173. Cailleau R, Olivé M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.* 1978;14:911–5.
174. Cailleau R, Olivé M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.* 1978;14:911–5.
175. Mao J-H, Kim I-J, Wu D, Climent J, Kang HC, DelRosario R, et al. FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression. *Science.* 2008;321:1499–502.

176. Hollestelle A, Nagel JHA, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M, et al. Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;121:53–64.
177. Vranic S, Gatalica Z, Wang Z-Y. Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. *Oncol Lett.* 2011;2:1131–7.
178. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, et al. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D777–83.
179. Moore NL, Buchanan G, Harris JM, Selth LA, Bianco-Miotto T, Hanson AR, et al. An androgen receptor mutation in the MDA-MB-453 cell line model of molecular apocrine breast cancer compromises receptor activity. *Endocr Relat Cancer.* 2012;19:599–613.
180. Bartlett JMS, Ibrahim M, Jasani B, Morgan JM, Ellis I, Kay E, et al. External quality assurance of HER2 FISH and ISH testing: three years of the UK national external quality assurance scheme. *Am J Clin Pathol.* 2009;131:106–11.
181. Magnifico A, Albano L, Campaner S, Campiglio M, Pilotti S, Ménard S, et al. Protein kinase Calpha determines HER2 fate in breast carcinoma cells with HER2 protein overexpression without gene amplification. *Cancer Res.* 2007;67:5308–17.
182. Rhodes A, Jasani B, Couturier J, McKinley MJ, Morgan JM, Dodson AR, et al. A formalin-fixed, paraffin-processed cell line standard for quality control of immunohistochemical assay of HER-2/neu expression in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2002;117:81–9.
183. Ginestier C, Adélaïde J, Gonçalves A, Repellini L, Sircoulomb F, Letessier A, et al. ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene.* 2007;26:7163–9.
184. Lee S, Yang W, Lan K-H, Sellappan S, Klos K, Hortobagyi G, et al. Enhanced sensitization to taxol-induced apoptosis by herceptin pretreatment in ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res.* 2002;62:5703–10.
185. Subik K, Lee J-F, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer Basic Clin Res.* 2010;4:35–41.
186. Campiglio M, Somenzi G, Olgiati C, Beretta G, Balsari A, Zaffaroni N, et al. Role of proliferation in HER2 status predicted response to doxorubicin. *Int J Cancer.* 2003;105:568–73.
187. Rafn B, Nielsen CF, Andersen SH, Szyniarowski P, Corcelle-Termeau E, Valo E, et al. ErbB2-driven breast cancer cell invasion depends on a complex signaling network activating myeloid zinc finger-1-dependent cathepsin B expression. *Mol Cell.* 2012;45:764–76.
188. Long JS, Fujiwara Y, Edwards J, Tannahill CL, Tigyi G, Pyne S, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 4 uses HER2 (ERBB2) to regulate extracellular signal regulated kinase-1/2 in MDA-MB-453 breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2010;285:35957–66.
189. Govindarajan S, Sivakumar J, Garimidi P, Rangaraj N, Kumar JM, Rao NM, et al. Targeting human epidermal growth factor receptor 2 by a cell-penetrating peptide-affibody bioconjugate. *Biomaterials.* 2012;33:2570–82.
190. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013;31:3997–4013.

191. Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, MacGrogan G, Roger P, Treilleux I, Valent A, et al. [2014 update of the GEFPICS' recommendations for HER2 status determination in breast cancers in France]. *Ann Pathol*. 2014;34:352–65.

192. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006;10:515–27.

193. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121:2750–67.

194. Palmbos PL, Hussain M. Non-castrate metastatic prostate cancer: have the treatment options changed? *Semin Oncol*. 2013;40:337–46.

195. Van Poppel H, Klotz L. Gonadotropin-releasing hormone: an update review of the antagonists versus agonists. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc*. 2012;19:594–601.

196. Crawford ED, Eisenberger MA, McLeod DG, Spaulding JT, Benson R, Dorr FA, et al. A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N Engl J Med*. 1989;321:419–24.

197. Hellerstedt BA, Pienta KJ. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. *CA Cancer J Clin*. 2002;52:154–79.

198. Tan MHE, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36:3–23.

199. Singh SM, Gauthier S, Labrie F. Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. *Curr Med Chem*. 2000;7:211–47.

200. Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, Montgomery B. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol*. 2009;6:76–85.

201. Macfarlane RJ, Chi KN. Research in castration-resistant prostate cancer: what does the future hold? *Curr Oncol Tor Ont*. 2010;17 Suppl 2:S80–6.

202. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MHA, Lara PN, Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:1513–20.

203. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:1502–12.

204. Proverbs-Singh T, Feldman JL, Morris MJ, Autio KA, Traina TA. Targeting the androgen receptor in prostate and breast cancer: several new agents in development. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22:R87–106.

205. Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, et al. Change of specificity mutations in androgen-selective enhancers. Evidence for a role of differential DNA binding by the androgen receptor. *J Biol Chem*. 2000;275:12298–305.

206. Smith MR, Saad F, Chowdhury S, Oudard S, Hadaschik BA, Graff JN, et al. Apalutamide Treatment and Metastasis-free Survival in Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378:1408–18.

207. Gravanis I, Lopez AS, Hemmings RJ, Jiménez JC, Garcia-Carbonero R, Gallego IG, et al. The European medicines agency review of abiraterone for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer in adult men after docetaxel chemotherapy and in chemotherapy-naïve disease: summary of the scientific assessment of the committee for medicinal products for human use. The

Oncologist. 2013;18:1032–42.

208. Hoy SM. Abiraterone acetate: a review of its use in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drugs*. 2013;73:2077–91.

209. Scott LJ. Abiraterone Acetate: A Review in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Drugs*. 2017;

210. Locke JA, Guns ES, Lubik AA, Adomat HH, Hendy SC, Wood CA, et al. Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68:6407–15.

211. Leon CG, Locke JA, Adomat HH, Etinger SL, Twiddy AL, Neumann RD, et al. Alterations in cholesterol regulation contribute to the production of intratumoral androgens during progression to castration-resistant prostate cancer in a mouse xenograft model. *The Prostate*. 2010;70:390–400.

212. Labrie F, Bélanger A, Simard J, Van Luu-The null, Labrie C. DHEA and peripheral androgen and estrogen formation: intracrinology. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;774:16–28.

213. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2011;364:1995–2005.

214. Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS, Molina A, Logothetis CJ, de Souza P, et al. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med*. 2013;368:138–48.

215. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2017;

216. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*. 2009;324:787–90.

217. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin M-E, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2012;367:1187–97.

218. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med*. 2014;371:424–33.

219. Clegg NJ, Wongvipat J, Joseph JD, Tran C, Ouk S, Dilhas A, et al. ARN-509: a novel antiandrogen for prostate cancer treatment. *Cancer Res*. 2012;72:1494–503.

220. Moilanen A-M, Riikonen R, Oksala R, Ravanti L, Aho E, Wohlfahrt G, et al. Discovery of ODM-201, a new-generation androgen receptor inhibitor targeting resistance mechanisms to androgen signaling-directed prostate cancer therapies. *Sci Rep*. 2015;5:12007.

221. Joseph JD, Lu N, Qian J, Sensintaffar J, Shao G, Brigham D, et al. A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens enzalutamide and ARN-509. *Cancer Discov*. 2013;3:1020–9.

222. Fizazi K, Massard C, Bono P, Jones R, Kataja V, James N, et al. Activity and safety of ODM-201 in patients with progressive metastatic castration-resistant prostate cancer (ARADES): an open-label phase 1 dose-escalation and randomised phase 2 dose expansion trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:975–85.

223. Efstathiou E, Titus MA, Tsavachidou D, Hoang A, Karlou M, Wen S, et al. MDV3100 effects on androgen receptor (AR) signaling and bone marrow testosterone concentration modulation: A preliminary report. *J Clin Oncol [Internet]*. 2011 [cited 2017 May 2];29: 2011 (suppl; abstr 4501). Available from:

<http://meetinglibrary.asco.org/content/82176-102>

224. Massard C, Penttinen HM, Vjaters E, Bono P, Lietuvietis V, Tammela TL, et al. Pharmacokinetics, Antitumor Activity, and Safety of ODM-201 in Patients with Chemotherapy-naïve Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: An Open-label Phase 1 Study. *Eur Urol.* 2016;69:834–40.
225. Matsubara N, Mukai H, Hosono A, Onomura M, Sasaki M, Yajima Y, et al. Phase 1 study of darolutamide (ODM-201): a new-generation androgen receptor antagonist, in Japanese patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;
226. Josan JS, Katzenellenbogen JA. Designer antiandrogens join the race against drug resistance. *eLife.* 2013;2:e00692.
227. Mohler J, Bahnson RR, Boston B, Busby JE, D'Amico A, Eastham JA, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: prostate cancer. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN.* 2010;8:162–200.
228. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* 1997;57:314–9.
229. Buchanan G, Greenberg NM, Scher HI, Harris JM, Marshall VR, Tilley WD. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2001;7:1273–81.
230. Wyatt AW, Azad AA, Volik SV, Annala M, Beja K, McConeghy B, et al. Genomic Alterations in Cell-Free DNA and Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* 2016;2:1598–606.
231. Qu F, Xie W, Nakabayashi M, Zhang H, Jeong SH, Wang X, et al. Association of AR-V7 and Prostate-Specific Antigen RNA Levels in Blood with Efficacy of Abiraterone Acetate and Enzalutamide Treatment in Men with Prostate Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2017;23:726–34.
232. Arora VK, Schenkein E, Murali R, Subudhi SK, Wongvipat J, Balbas MD, et al. Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell.* 2013;155:1309–22.
233. Jenster G. Ligand-independent activation of the androgen receptor in prostate cancer by growth factors and cytokines. *J Pathol.* 2000;191:227–8.
234. Naderi A, Chia KM, Liu J. Synergy between inhibitors of androgen receptor and MEK has therapeutic implications in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res BCR.* 2011;13:R36.
235. Robles AJ, Cai S, Cichewicz RH, Mooberry SL. Selective activity of deguelin identifies therapeutic targets for androgen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157:475–88.
236. Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res BCR.* 2009;11:R77.
237. Liu C-Y, Lau K-Y, Hsu C-C, Chen J-L, Lee C-H, Huang T-T, et al. Combination of palbociclib with enzalutamide shows in vitro activity in RB proficient and androgen receptor positive triple negative breast cancer cells. *PloS One.* 2017;12:e0189007.
238. Le Tourneau C, Delord J-P, Gonçalves A, Gavaille C, Dubot C, Isambert N, et al. Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16:1324–34.
239. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im S-A, Masuda N, et al.

Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2016;17:425–39.

240. Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im S-A, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375:1925–36.

241. A. Gucalp, A. Corben, S. Patil, L. Boyle, C. Hudis, T. A. Traina. Phase I/II trial of palbociclib in combination with bicalutamide for the treatment of androgen receptor (AR)(+) metastatic breast cancer (MBC): Pharmacokinetics (PK). Poster 261P ESMO Congr 2016.

242. Traina TA, Miller K, Yardley DA, et al. TA. Results from a phase 2 study of enzalutamide (ENZA), an androgen receptor (AR) inhibitor, in advanced AR+ triple-negative breast cancer (TNBC). *ASCO Meeting Abstracts.* 2015;33:1003. 2013;73:PD3–PD6.

243. Kumar V, Yu J, Phan V, Tudor IC, Peterson A, Uppal H. Androgen Receptor Immunohistochemistry as a Companion Diagnostic Approach to Predict Clinical Response to Enzalutamide in Triple-Negative Breast Cancer. DOI 101200PO1700075 *JCO Precis Oncol - Publ Online Oct 10 2017.*

244. Phase IIB Neoadjuvant Enzalutamide (ZT) Plus Taxol for Androgen Receptor (AR)-Positive Triple-Negative Breast Cancer (AR+ TNBC), NCT02689427.

245. Feasibility Study of Adjuvant Enzalutamide for the Treatment of Early Stage AR (+) Triple Negative Breast Cancer, NCT02750358.

246. Taselisib and Enzalutamide in Treating Patients With Androgen Receptor Positive Triple-Negative Metastatic Breast Cancer, NCT02457910.

247. Belin L, Kamal M, Mauborgne C, Plancher C, Mulot F, Delord J-P, et al. Randomized phase II trial comparing molecularly targeted therapy based on tumor molecular profiling versus conventional therapy in patients with refractory cancer: cross-over analysis from the SHIVA trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017;28:590–6.

248. C.H.M Ng,, I. Macpherson, D. Rea, J. Spicer, A. Bowman, A. Jones, M. Dowsett ,S.R.D. Johnston, N.Dobbs, J.S. De Bono. Phase I/II study of Abiraterone Acetate (AA) in estrogen receptor (ER) or androgen receptor (AR) positive metastatic breast cancer. Poster 325PD Esmo Congr 2012.

249. Karanika S, Karantanos T, Li L, Corn PG, Thompson TC. DNA damage response and prostate cancer: defects, regulation and therapeutic implications. *Oncogene.* 2015;34:2815–22.

250. Zhang Y, Hunter T. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *Int J Cancer.* 2014;134:1013–23.

251. Zhou B-BS, Bartek J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:216–25.

252. Dai Y, Grant S. New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010;16:376–83.

253. Chen T, Stephens PA, Middleton FK, Curtin NJ. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today.* 2012;17:194–202.

254. Merry C, Fu K, Wang J, Yeh I-J, Zhang Y. Targeting the checkpoint kinase Chk1 in cancer therapy. *Cell Cycle Georget Tex.* 2010;9:279–83.

255. Toledo LI, Murga M, Fernandez-Capetillo O. Targeting ATR and Chk1 kinases for cancer treatment: a new model for new (and old) drugs. *Mol Oncol.* 2011;5:368–73.

256. O'Connor MJ. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell*. 2015;60:547–60.
257. Zhao H, Piwnica-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*. 2001;21:4129–39.
258. Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:616–27.
259. Chen M-S, Ryan CE, Piwnica-Worms H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol*. 2003;23:7488–97.
260. Zeng Y, Forbes KC, Wu Z, Moreno S, Piwnica-Worms H, Enoch T. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature*. 1998;395:507–10.
261. Flagg G, Plug AW, Dunks KM, Mundt KE, Ford JC, Quiggle MR, et al. Atm-dependent interactions of a mammalian chk1 homolog with meiotic chromosomes. *Curr Biol CB*. 1997;7:977–86.
262. Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:792–804.
263. Bertoni F, Codegoni AM, Furlan D, Tibiletti MG, Capella C, Brogginini M. CHK1 frameshift mutations in genetically unstable colorectal and endometrial cancers. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;26:176–80.
264. Menoyo A, Alazzouzi H, Espín E, Armengol M, Yamamoto H, Schwartz S. Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res*. 2001;61:7727–30.
265. Solyom S, Pylkäs K, Winqvist R. Screening for large genomic rearrangements of the BRIP1 and CHK1 genes in Finnish breast cancer families. *Fam Cancer*. 2010;9:537–40.
266. Madoz-Gúrpide J, Cañamero M, Sanchez L, Solano J, Alfonso P, Casal JI. A proteomics analysis of cell signaling alterations in colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2007;6:2150–64.
267. Verlinden L, Vanden Bempt I, Eelen G, Drijckoningen M, Verlinden I, Marchal K, et al. The E2F-regulated gene Chk1 is highly expressed in triple-negative estrogen receptor /progesterone receptor /HER-2 breast carcinomas. *Cancer Res*. 2007;67:6574–81.
268. Yao H, Yang Z, Li Y. [Expression of checkpoint kinase 1 and polo-like kinase 1 and its clinicopathological significance in benign and malignant lesions of the stomach]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2010;35:1080–4.
269. Brandsma I, Fleuren EDG, Williamson CT, Lord CJ. Directing the use of DDR kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs*. 2017;26:1341–55.
270. Brill E, Yokoyama T, Nair J, Yu M, Ahn Y-R, Lee J-M. Prexasertib, a cell cycle checkpoint kinases 1 and 2 inhibitor, increases in vitro toxicity of PARP inhibition by preventing Rad51 foci formation in BRCA wild type high-grade serous ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017;8:111026–40.
271. Bryant C, Rawlinson R, Massey AJ. Chk1 inhibition as a novel therapeutic strategy for treating triple-negative breast and ovarian cancers. *BMC Cancer*. 2014;14:570.
272. Ma CX, Cai S, Li S, Ryan CE, Guo Z, Schaiff WT, et al. Targeting Chk1 in p53-deficient triple-negative breast cancer is therapeutically beneficial in human-in-mouse tumor models. *J Clin Invest*. 2012;122:1541–52.
273. Laroche-Clary A, Lucchesi C, Rey C, Verbeke S, Bourdon A, Chaire V, et al. CHK1 Inhibition in Soft-Tissue Sarcomas: Biological and Clinical Implications. *Ann*

- Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2018;
274. Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, Bérout C, Soussi T. The UMD TP53 database and website: update and revisions. *Hum Mutat.* 2006;27:14–20.
275. Soussi T, Asselain B, Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, et al. Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006;12:62–9.
276. Lord CJ, Garrett MD, Ashworth A. Targeting the double-strand DNA break repair pathway as a therapeutic strategy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006;12:4463–8.
277. Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet TIG.* 2012;28:128–36.
278. Levesque AA, Kohn EA, Bresnick E, Eastman A. Distinct roles for p53 transactivation and repression in preventing UCN-01-mediated abrogation of DNA damage-induced arrest at S and G2 cell cycle checkpoints. *Oncogene.* 2005;24:3786–96.
279. Wang Q, Fan S, Eastman A, Worland PJ, Sausville EA, O'Connor PM. UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:956–65.
280. Calvo E, Braiteh F, Von Hoff D, McWilliams R, Becerra C, Galsky MD, et al. Phase I Study of CHK1 Inhibitor LY2603618 in Combination with Gemcitabine in Patients with Solid Tumors. *Oncology.* 2016;91:251–60.
281. Daud AI, Ashworth MT, Strosberg J, Goldman JW, Mendelson D, Springett G, et al. Phase I dose-escalation trial of checkpoint kinase 1 inhibitor MK-8776 as monotherapy and in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2015;33:1060–6.
282. Scagliotti G, Kang JH, Smith D, Rosenberg R, Park K, Kim S-W, et al. Phase II evaluation of LY2603618, a first-generation CHK1 inhibitor, in combination with pemetrexed in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs.* 2016;34:625–35.
283. Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, 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.* 2010;123:725–31.
284. Al-Kaabi MM, Alshareeda AT, Jerjees DA, Muftah AA, Green AR, Alsubhi NH, et al. Checkpoint kinase1 (CHK1) is an important biomarker in breast cancer having a role in chemotherapy response. *Br J Cancer.* 2015;112:901–11.
285. Alsubhi N, Middleton F, Abdel-Fatah TMA, Stephens P, Doherty R, Arora A, et al. Chk1 phosphorylated at serine345 is a predictor of early local recurrence and radio-resistance in breast cancer. *Mol Oncol.* 2016;10:213–23.
286. Bai S, Wilson EM. Epidermal-growth-factor-dependent phosphorylation and ubiquitinylation of MAGE-11 regulates its interaction with the androgen receptor. *Mol Cell Biol.* 2008;28:1947–63.
287. Ma CX, Ellis MJC, Petroni GR, Guo Z, Cai S-R, Ryan CE, et al. A phase II study of UCN-01 in combination with irinotecan in patients with metastatic triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137:483–92.
288. Pinto Á. Beyond abiraterone: new hormonal therapies for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Biol Ther.* 2014;15:149–55.
289. Landis MD, Lehmann BD, Pietenpol JA, Chang JC. Patient-derived breast tumor xenografts facilitating personalized cancer therapy. *Breast Cancer Res BCR.*

2013;15:201.

290. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* 2014;4:998–1013.

291. Whittle JR, Lewis MT, Lindeman GJ, Visvader JE. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res BCR.* 2015;17:17.

292. André F, Bachelot T, Commo F, Campone M, Arnedos M, Dieras V, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol.* 2014;15:267–74.

293. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, Smith CL, Rahmberg BL, Fuss JO, et al. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One.* 2009;4:e6529.

294. Zelnak AB, O'Regan RM. Optimizing Endocrine Therapy for Breast Cancer. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN.* 2015;13:e56–64.

295. Culig Z. Targeting the androgen receptor in prostate cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15:1427–37.

296. Eichholz A, Ferraldeschi R, Attard G, de Bono JS. Putting the brakes on continued androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;360:68–75.

297. Sikora MJ, Johnson MD, Lee AV, Oesterreich S. Endocrine Response Phenotypes Are Altered by Charcoal-Stripped Serum Variability. *Endocrinology.* 2016;157:3760–6.

298. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al., editors. *Assay Guid Man* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [cited 2017 Oct 4]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

299. Veldscholte J, Berrevoets CA, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Trapman J, et al. The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;41:665–9.

300. Waltering KK, Urbanucci A, Visakorpi T. Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;360:38–43.

301. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene.* 2013;32:5501–11.

302. Hara T, Miyazaki J, Araki H, Yamaoka M, Kanzaki N, Kusaka M, et al. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. *Cancer Res.* 2003;63:149–53.

303. Taplin ME, Bublely GJ, Ko YJ, Small EJ, Upton M, Rajeshkumar B, et al. Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res.* 1999;59:2511–5.

304. Clarke R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;39:69–86.

305. Visonneau S, Cesano A, Torosian MH, Miller EJ, Santoli D. Growth characteristics and metastatic properties of human breast cancer xenografts in immunodeficient mice. *Am J Pathol.* 1998;152:1299–311.

306. Sakakibara T, Xu Y, Bumpers HL, Chen FA, Bankert RB, Arredondo MA, et al. Growth and metastasis of surgical specimens of human breast carcinomas in SCID mice. *Cancer J Sci Am*. 1996;2:291–300.
307. Mehta RR, Graves JM, Hart GD, Shilkaitis A, Das Gupta TK. Growth and metastasis of human breast carcinomas with Matrigel in athymic mice. *Breast Cancer Res Treat*. 1993;25:65–71.
308. du Manoir S, Orsetti B, Bras-Gonçalves R, Nguyen T-T, Lasorsa L, Boissière F, et al. Breast tumor PDXs are genetically plastic and correspond to a subset of aggressive cancers prone to relapse. *Mol Oncol*. 2014;8:431–43.
309. DeRose YS, Wang G, Lin Y-C, Bernard PS, Buys SS, Ebbert MTW, et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med*. 2011;17:1514–20.
310. Landis MD, Lehmann BD, Pietenpol JA, Chang JC. Patient-derived breast tumor xenografts facilitating personalized cancer therapy. *Breast Cancer Res BCR*. 2013;15:201.
311. Zhang X, Claerhout S, Prat A, Dobrolecki LE, Petrovic I, Lai Q, et al. A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res*. 2013;73:4885–97.
312. Behbod F, Kittrell FS, LaMarca H, Edwards D, Kerbawy S, Heestand JC, et al. An intraductal human-in-mouse transplantation model mimics the subtypes of ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res BCR*. 2009;11:R66.
313. Verbeke S, Richard E, Monceau E, Schmidt X, Rousseau B, Velasco V, et al. Humanization of the mouse mammary gland by replacement of the luminal layer with genetically engineered preneoplastic human cells. *Breast Cancer Res BCR*. 2014;16:504.
314. Sflomos G, Dormoy V, Metsalu T, Jeitziner R, Battista L, Scabia V, et al. A Preclinical Model for ER $\alpha$ -Positive Breast Cancer Points to the Epithelial Microenvironment as Determinant of Luminal Phenotype and Hormone Response. *Cancer Cell*. 2016;29:407–22.
315. Barritault Marc. Etude du récepteur des androgènes dans les cancers du sein moléculaire apocrine. Thèse de Medecine; 2013.
316. Dobrolecki LE, Airhart SD, Alferez DG, Aparicio S, Behbod F, Bentires-Alj M, et al. Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35:547–73.
317. André F, Bachelot T, Commo F, Campone M, Arnedos M, Dieras V, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol*. 2014;15:267–74.
318. André F, Bachelot T, Commo F, Campone M, Arnedos M, Dieras V, et al. Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol*. 2014;15:267–74.
319. Garralda E, Paz K, López-Casas PP, Jones S, Katz A, Kann LM, et al. Integrated next-generation sequencing and avatar mouse models for personalized cancer treatment. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014;20:2476–84.
320. Galletti G, Leach BI, Lam L, Tagawa ST. Mechanisms of resistance to systemic therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Treat Rev*. 2017;57:16–27.
321. Caiazza F, Murray A, Madden SF, Synnott NC, Ryan EJ, O'Donovan N, et al.

Preclinical evaluation of the AR inhibitor enzalutamide in triple-negative breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23:323–34.

322. Liu S, Meng X, Chen H, Liu W, Miller T, Murph M, et al. Targeting tyrosine-kinases and estrogen receptor abrogates resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Oncotarget*. 2014;5:9049–64.

323. Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res*. 1991;51:3867–73.

324. D’Amato NC, Gordon MA, Babbs B, Spoelstra NS, Carson Butterfield KT, Torkko KC, et al. Cooperative Dynamics of AR and ER Activity in Breast Cancer. *Mol Cancer Res MCR*. 2016;14:1054–67.

325. Barton VN, D’Amato NC, Gordon MA, Lind HT, Spoelstra NS, Babbs BL, et al. Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2015;14:769–78.

326. Hu DG, Hickey TE, Irvine C, Wijayakumara DD, Lu L, Tilley WD, et al. Identification of androgen receptor splice variant transcripts in breast cancer cell lines and human tissues. *Horm Cancer*. 2014;5:61–71.

327. Hickey TE, Irvine CM, Dvinge H, Tarulli GA, Hanson AR, Ryan NK, et al. Expression of androgen receptor splice variants in clinical breast cancers. *Oncotarget*. 2015;6:44728–44.

328. von Wahlde M-K, Hülsewig C, Ruckert C, Götte M, Kiesel L, Bernemann C. The anti-androgen drug dutasteride renders triple negative breast cancer cells more sensitive to chemotherapy via inhibition of HIF-1 $\alpha$ -/VEGF-signaling. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2015;31:160–4.

329. Obeid J-P, Zafar N, El Hokayem J. Steroid Hormone Receptor Coregulators in Endocrine Cancers. *IUBMB Life*. 2016;68:504–15.

330. Jung ME, Ouk S, Yoo D, Sawyers CL, Chen C, Tran C, et al. Structure-activity relationship for thiohydantoin androgen receptor antagonists for castration-resistant prostate cancer (CRPC). *J Med Chem*. 2010;53:2779–96.

331. Purushottamachar P, Godbole AM, Gediya LK, Martin MS, Vasaitis TS, Kwegyir-Afful AK, et al. Systematic structure modifications of multitarget prostate cancer drug candidate galeterone to produce novel androgen receptor down-regulating agents as an approach to treatment of advanced prostate cancer. *J Med Chem*. 2013;56:4880–98.

332. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*. 2009;324:787–90.

333. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:2431–42.

334. Hortobagyi GN. Everolimus plus exemestane for the treatment of advanced breast cancer: a review of subanalyses from BOLERO-2. *Neoplasia N Y N*. 2015;17:279–88.

335. Shameem R, Hamid MS, Xu KY, Wu S. Comparative analysis of the effectiveness of abiraterone before and after docetaxel in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *World J Clin Oncol*. 2015;6:64–72.

336. Merseburger AS, Haas GP, von Klot C-A. An update on enzalutamide in the treatment of prostate cancer. *Ther Adv Urol*. 2015;7:9–21.

337. Fushimi C, Tada Y, Takahashi H, Nagao T, Ojiri H, Masubuchi T, et al. A prospective phase II study of combined androgen blockade in patients with androgen receptor-positive metastatic or locally advanced unresectable salivary gland

- carcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017;
338. Williams L, Thompson LDR, Seethala RR, Weinreb I, Assaad AM, Tuluc M, et al. Salivary duct carcinoma: the predominance of apocrine morphology, prevalence of histologic variants, and androgen receptor expression. *Am J Surg Pathol*. 2015;39:705–13.
339. Dalin MG, Desrichard A, Katabi N, Makarov V, Walsh LA, Lee K-W, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Salivary Duct Carcinoma Reveals Actionable Targets and Similarity to Apocrine Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016;22:4623–33.
340. O’Shaughnessy J, Campone M, Brain E, Neven P, Hayes D, Bondarenko I, et al. Abiraterone acetate, exemestane or the combination in postmenopausal patients with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27:106–13.
341. Baum M, Buzdar A, Cuzick J, Forbes J, Houghton J, Howell A, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer*. 2003;98:1802–10.
342. Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, 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 Lond Engl*. 2011;378:771–84.
343. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2009;20:1319–29.
344. Arce-Salinas C, Riesco-Martinez MC, Hanna W, Bedard P, Warner E. Complete Response of Metastatic Androgen Receptor-Positive Breast Cancer to Bicalutamide: Case Report and Review of the Literature. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016;34:e21–4.
345. McNamara KM, Yoda T, Miki Y, Chanplakorn N, Wongwaisayawan S, Incharoen P, et al. Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumors: its correlation with tumor cell proliferation. *Cancer Sci*. 2013;104:639–46.
346. Guiu S, Charon-Barra C, Vernerey D, Fumoleau P, Campone M, Spielmann M, et al. Coexpression of androgen receptor and FOXA1 in nonmetastatic triple-negative breast cancer: ancillary study from PACS08 trial. *Future Oncol Lond Engl*. 2015;11:2283–97.
347. Parker JS, Peterson AC, Tudor LC, et al. A novel biomarker to predict sensitivity to enzalutamide (ENZA) in TNBC. *ASCO Annu Meet Abstr* 1083.
348. Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Jindal S, Butler LM, Leung S, McNeil CM, et al. The Magnitude of Androgen Receptor Positivity in Breast Cancer is Critical for Reliable Prediction of Disease Outcome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018;
349. Pereira B, Chin S-F, Rueda OM, Vollan H-KM, Provenzano E, Bardwell HA, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun*. 2016;7:11479.
350. Tsutsumi Y. Apocrine carcinoma as triple-negative breast cancer: novel definition of apocrine-type carcinoma as estrogen/progesterone receptor-negative and androgen receptor-positive invasive ductal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42:375–86.

351. Krop I, Ismaila N, Andre F, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017;35:2838–47.
352. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol*. 2008;26:317–25.
353. Li W, O'Shaughnessy J, Hayes D, Campone M, Bondarenko I, Zbarskaya I, et al. Biomarker Associations with Efficacy of Abiraterone Acetate and Exemestane in Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016;22:6002–9.
354. Efstathiou E, Titus M, Tsavachidou D, Tzelepi V, Wen S, Hoang A, et al. Effects of abiraterone acetate on androgen signaling in castrate-resistant prostate cancer in bone. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012;30:637–43.
355. Cai C, Chen S, Ng P, Bublely GJ, Nelson PS, Mostaghel EA, et al. Intratumoral de novo steroid synthesis activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer and is upregulated by treatment with CYP17A1 inhibitors. *Cancer Res*. 2011;71:6503–13.
356. Chen EJ, Sowalsky AG, Gao S, Cai C, Voznesensky O, Schaefer R, et al. Abiraterone treatment in castration-resistant prostate cancer selects for progesterone responsive mutant androgen receptors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015;21:1273–80.
357. Gucaip A, Traina TA. The Androgen Receptor: Is It a Promising Target? *Ann Surg Oncol*. 2017;
358. Aapro M, Wildiers H. Triple-negative breast cancer in the older population. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2012;23 Suppl 6:vi52–5.
359. Cailliot C, Simon G, Baron C et al. Programme ESMÉ d'UNICANCER : améliorer la prise en charge des patients à partir des données de vie réelle en cancérologie. *Innov Thérapeutiques En Oncol ITO*. Volume 2, numéro 4. 2016;
360. Chang MT, Asthana S, Gao SP, Lee BH, Chapman JS, Kandoth C, et al. Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat Biotechnol*. 2016;34:155–63.
361. Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, Kundra R, Zhang H, Wang J, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol*. 2017;2017.
362. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6:pl1.
363. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014;505:495–501.
364. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat*. 2016;37:865–76.
365. Bérout C, Letovsky SI, Braastad CD, Caputo SM, Beaudoux O, Bignon YJ, et al. BRCA Share: A Collection of Clinical BRCA Gene Variants. *Hum Mutat*. 2016;37:1318–28.
366. Baselga J, Im S-A, Iwata H, Cortés J, De Laurentiis M, Jiang Z, et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a

- randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18:904–16.
367. Martín M, Chan A, Dirix L, O'Shaughnessy J, Hegg R, Manikhas A, et al. A randomized adaptive phase II/III study of buparlisib, a pan-class I PI3K inhibitor, combined with paclitaxel for the treatment of HER2- advanced breast cancer (BELLE-4). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017;28:313–20.
368. Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, et al. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem.* 2003;278:21767–73.
369. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010;40:179–204.
370. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011;474:609–15.
371. Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, Saunders E, Dadaev T, Castro E, et al. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Br J Cancer.* 2012;106:1697–701.
372. van Asperen CJ, Brohet RM, Meijers-Heijboer EJ, Hoogerbrugge N, Verhoef S, Vasen HFA, et al. Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary. *J Med Genet.* 2005;42:711–9.
373. Abulaiti A, Fikaris AJ, Tsygankova OM, Meinkoth JL. Ras induces chromosome instability and abrogation of the DNA damage response. *Cancer Res.* 2006;66:10505–12.
374. Campaner S, Amati B. Two sides of the Myc-induced DNA damage response: from tumor suppression to tumor maintenance. *Cell Div.* 2012;7:6.
375. Ferrao PT, Bukczynska EP, Johnstone RW, McArthur GA. Efficacy of CHK inhibitors as single agents in MYC-driven lymphoma cells. *Oncogene.* 2012;31:1661–72.
376. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science.* 2017;355:1152–8.
377. Feijoo C, Hall-Jackson C, Wu R, Jenkins D, Leitch J, Gilbert DM, et al. Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *J Cell Biol.* 2001;154:913–23.
378. Stark GR, Taylor WR. Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol.* 2006;32:227–48.
379. Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, et al. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem.* 2003;278:21767–73.
380. McNeely S, Beckmann R, Bence Lin AK. CHEK again: revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2014;142:1–10.
381. Syljuåsen RG, Sørensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, et al. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol.* 2005;25:3553–62.
382. Karanika S, Karantanos T, Li L, Wang J, Park S, Yang G, et al. Targeting DNA Damage Response in Prostate Cancer by Inhibiting Androgen Receptor-CDC6-ATR-Chk1 Signaling. *Cell Rep.* 2017;18:1970–81.
383. Ma Z, Yao G, Zhou B, Fan Y, Gao S, Feng X. The Chk1 inhibitor AZD7762 sensitises p53 mutant breast cancer cells to radiation in vitro and in vivo. *Mol Med Rep.* 2012;6:897–903.
384. Mitchell JB, Choudhuri R, Fabre K, Sowers AL, Citrin D, Zabludoff SD, et al. In

- vitro and in vivo radiation sensitization of human tumor cells by a novel checkpoint kinase inhibitor, AZD7762. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010;16:2076–84.
385. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27–55.
386. Gordon MA, D’Amato NC, Gu H, Babbs B, Wulfkühle J, Petricoin EF, et al. Synergy between Androgen Receptor Antagonism and Inhibition of mTOR and HER2 in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017;
387. Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im S-A, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375:1925–36.
388. McClendon AK, Dean JL, Rivadeneira DB, Yu JE, Reed CA, Gao E, et al. CDK4/6 inhibition antagonizes the cytotoxic response to anthracycline therapy. *Cell Cycle Georget Tex.* 2012;11:2747–55.
389. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a001008.
390. <http://p53.iarc.fr>.
391. Tse AN, Carvajal R, Schwartz GK. Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007;13:1955–60.
392. Ma CX, Janetka JW, Piwnica-Worms H. Death by releasing the breaks: CHK1 inhibitors as cancer therapeutics. *Trends Mol Med.* 2011;17:88–96.
393. Bryant C, Rawlinson R, Massey AJ. Chk1 inhibition as a novel therapeutic strategy for treating triple-negative breast and ovarian cancers. *BMC Cancer.* 2014;14:570.
394. Richards J, Lim AC, Hay CW, Taylor AE, Wingate A, Nowakowska K, et al. Interactions of abiraterone, eplerenone, and prednisolone with wild-type and mutant androgen receptor: a rationale for increasing abiraterone exposure or combining with MDV3100. *Cancer Res.* 2012;72:2176–82.
395. Soifer HS, Souleimanian N, Wu S, Voskresenskiy AM, Collak FK, Cinar B, et al. Direct regulation of androgen receptor activity by potent CYP17 inhibitors in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2012;287:3777–87.
396. Behbod F, Kittrell FS, LaMarca H, Edwards D, Kerbawy S, Heestand JC, et al. An intraductal human-in-mouse transplantation model mimics the subtypes of ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res BCR.* 2009;11:R66.
397. Richard E, Grellety T, Velasco V, MacGrogan G, Bonnefoi H, Iggo R. The mammary ducts create a favourable microenvironment for xenografting of luminal and molecular apocrine breast tumours. *J Pathol.* 2016;240:256–61.

# ANNEXES

---

**Annexe 1. Compound Request Form/Formulaire de demande de collaboration avec le laboratoire BAYER HealthCare concernant l'ODM-201.**



**Compound Request Form:**

Instructions: Please complete the form being as thorough as possible. Provide a full and concise description of your proposed work, including any key references to previous relevant work or methods. The research described in this form will be appended to the material transfer agreement and define the scope and limits of the research agreed to. Return the form by e-mail to: [vineta.moran@bayer.com](mailto:vineta.moran@bayer.com)

|                          |   |                          |                                  |
|--------------------------|---|--------------------------|----------------------------------|
| <b>Requester:</b>        | Pr H. Bonnefoi / Pr R. Iggo<br>Dr T. Grellety   | <b>Phone:</b>            | +335563332<br>69                 |
| <b>Title:</b>            |   | <b>FAX:</b>              | +33556333330                     |
| <b>Location:</b>         | Breast cancer   | <b>Email:</b>            | h.bonnefoi@bordeaux.unicancer.fr |
| <b>Compound:</b>         | ODM-201   | <b>Amount requested:</b> | 17'500€                          |
| <b>Title of study:</b>   | ODM-201 as a potential new treatment for androgen-driven molecular apocrine breast cancer.  |                          |                                  |
| <b>Shipping Address:</b> | INSERM Unit 1218<br>INSTITUT BERGONIE<br>229 cours de l'Argonne<br>33000 BORDEAUX<br>FRANCE | <b>Date Request:</b>     | of 2016-03-05                    |

**Rationale and Specific Goals**

**Describe the basis for the requested support**

Several microarray-based studies have converged on the identification of a new breast cancer subtype characterised by expression of the androgen receptor (AR), absence of the oestrogen receptor  $\alpha$  (ER), and paradoxical expression of many genes that are typically expressed in ER-positive luminal tumours [1-3]. We named these tumours "molecular apocrine" as they have an expression profile indicative of

increased androgen signalling and some morphological hallmarks of apocrine tumours [1]. These tumours are derived from the hormone sensing cells in the luminal layer of the mammary ducts. From an evolutionary perspective, the mammary gland is derived from androgen-driven scent glands called apocrine glands. Hence, we interpret apocrine metaplasia, a common benign change in the mammary epithelium, to be a reversion of the cells to their ancestral fate. Putting together these different strands of information, our model for the formation of these tumours is that they arise when transformed hormone-sensing cells undergo apocrine metaplasia [4]. Since the commonest genomic change in these tumours is HER2 amplification, we suspect that pathological activation of the HER2 pathway sets up hormone sensing cells to undergo apocrine metaplasia and thereby lose expression of ER.

The frequency of molecular apocrine cancers, based on gene expression array studies performed in all types of breast cancers, is 8-11%; one-third being HER2-negative and the remainder HER2-positive [1, 5]. In a recent large gene expression array study on triple-negative tumours, the frequency of molecular apocrine tumours was reported to be 11% [3]. Furthermore, in a large immunohistochemistry (IHC) series, 36% of triple-negative cancers were reported as AR-positive [6]. In France, nearly 50,000 women are diagnosed with breast cancer every year [7], 15% of which are triple-negative. Therefore, we estimate that the number of new cases of HER2-negative molecular apocrine tumours is approximately 1,000 based on gene expression and 3,000 based on IHC. A significant proportion of these patients will relapse: 34-38% at 5 years depending on the definition used (microarray array or IHC) [5, 7]. When these tumours relapse, the patients typically receive different lines

of chemotherapy, but they eventually progress.

AR is expressed by virtually all ER-positive tumours and by a specific subset of ER-negative tumours [6]. However, the function of AR depends on the tumour type: it inhibits the growth of classic ER-positive luminal tumours [8] but stimulates the growth of ER-negative molecular apocrine tumours [1, 2, 8]. Analysis of gene expression profiles led to the identification of the MDA-MB-453 breast cancer cell line as a potential model for molecular apocrine tumours [2]. Growth of this cell line is stimulated by androgen, and this proliferative effect is abrogated by the AR antagonist bicalutamide [2]. Interestingly, recent work has cast doubt on the simple model that androgens inhibit the growth of luminal tumours and promote the growth of molecular apocrine tumours [9]. Specifically, the authors showed that in some situations anti-androgens may inhibit the growth of classic luminal ER positive models like MCF7.

Promising clinical benefit rates at 6 months in triple-negative and AR-positive tumours have been reported in three trials evaluating drugs that directly target the androgen receptor in AR-positive patients: 19% with bicalutamide [10], 19% with abiraterone acetate [11], and 29% with enzalutamide [12]. In our trial, 5 patients remain on treatment with clinical benefits lasting between 6.4 months to 36 months (patient in CR). In the recently presented phase II study with enzalutamide in a similar population of patients, two CRs and five PRs were observed.

Based on these promising clinical results we wish to develop a new clinical trial with ODM-201 in patients with molecular apocrine tumours. Before embarking on a

clinical trial we would like to generate preclinical data showing that ODM-201 is effective in these tumours.

List the specific goal(s) of the proposed program

Our goal is to test whether ODM-201 inhibits the growth of molecular apocrine breast cancer in vitro and in vivo. As soon as we have evidence that ODM-201 is effective in preclinical models we will make a separate application for funding of a clinical trial of ODM-201 in patients with molecular apocrine breast cancer.

Projected Timeline

Indicate the major milestones and completion date of the proposed program

**Milestones**

1. Measure the IC50 for ODM-201 in the MDA-MB-453 molecular apocrine breast cancer cell line.
2. Analyse cell cycle distribution, apoptosis induction, AR level and nuclear localisation in MDA-MB-453 cells after treatment with ODM-201.
3. Test the response to ODM-201 in intraductal xenografts of MDA-MB-453 cells.

**Timeline**

Month 3: milestones 1 and 2

Month 6: milestone 3

## Detailed Study Design

Please indicate the specific study design to be utilized, including all controls and reference agents that will be included

Three cell lines will be used:

- AR+ ER- molecular apocrine cells MDA-MB-453 (ATCC HTB-131)
- AR+ ER+ luminal B cells MCF7 (ATCC HTB-22)
- AR- ER- basal-like cells MDA-MB-231 (ATCC HTB-26)

To measure IC<sub>50</sub>, 3000 MDA-MB-453 cells will be seeded in 96-well plates and treated with log dilutions of ODM-201 or DMSO vehicle from 24 to 96 hr after plating. Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT, Sigma) will then be applied for 3 hours, absorbance measured at 570 nm, and IC<sub>50</sub> calculated with a four parameter logistic function in the drc package in R. Given the provocative results from Cochrane et al. [9], we will also measure the IC<sub>50</sub> of ODM-201 in MCF7 cells. To measure apoptosis and cell cycle distribution,  $2 \times 10^5$  MDA-MB-453 cells will be seeded in 35 mm wells, treated with drug, incubated with FITC-Annexin and propidium iodide, then analysed by flow cytometry. To demonstrate inhibition of AR we will perform transcription assays with in-house lentiviral transcription reporters scored by flow cytometry for GFP or tdTomato fluorescence. To demonstrate that the response to ODM-201 is AR and androgen-dependent we will infect AR-negative MDA-MB-231 cells with the transcription reporters and AR vectors and measure fluorescence by flow cytometry in the presence or absence of AR, DHT and ODM-201. To introduce AR we will use the lentiviral vectors described by Chen et al 2004 [13]. Virus production and transductions will be performed in our level 3 biosafety containment lab in compliance with French laws on GMOs. To test for blockade of nuclear import we will treat MDA-MB-453 cells with ODM-201 and image AR by

immunofluorescence on a Zeiss confocal microscope. To test the level of AR after treatment of MDA-MB-231 cells with ODM-201 we will perform western blots.

To test the response to therapy *in vivo*, we have established a technique for xenografting tumour cells directly into the mammary ducts of the fourth mammary glands of immunodeficient mice [14]. This approach places the grafted cells in a uniquely favourable microenvironment and distributes them evenly throughout the ductal tree at the moment of injection leading to more rapid and uniform engraftment. To facilitate visualisation, grafted cells are infected with a lentiviral vector expressing tdTomato prior to injection. Tumour size is followed by PhotonIMAGER (Biospace Lab) *in vivo*, and scored by histology and immunohistochemistry at the end of the experiment.

To test the response to ODM-201 *in vivo* we will initially use the MDA-MB-453 molecular apocrine cell line. We have shown that these cells rapidly form tumours after intraductal injection of 300'000 cells into the mammary ducts of NOD-SCID-IL2RG<sup>-/-</sup> (NSG) mice. The mice will be provided by the level 2 containment animal facility at the University of Bordeaux, and the study will be performed in the same animal facility in compliance with French laws on GMOs and animal experiments. The mice will be assigned to matched groups of 10 mice after scanning for red fluorescence with the PhotonIMAGER at 2 weeks, then treated orally for 3 weeks with 50 mg/kg ODM-201 bid in Macrocol (Merck) + propylene glycol + 5% glucose (50:30:20, v/v/v) or vehicle alone, as described by Moilanen et al. [15]. Female mice will be used because mammary ducts are only present in female mice (oophorectomy will not be performed). We have shown that endogenous androgens

are sufficient for growth of MDA-MB-453 in female mice so will not give the mice androgen pellets.

To perform these experiments we ask Bayer Healthcare to supply ODM-201 formulated for cell culture and gavage. Given the short half-life in vivo, we would be happy to test a slow-release formulation (oral or parenteral) if you can provide one.

## References

1. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 2005; 24: 4660-4671.
2. Doane AS DM, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, Gerald WL. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 2006; 25: 1-15.
3. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011; 121: 2750-2767.
4. Iggo, R. (2011). New insights into the role of androgen and oestrogen receptors in molecular apocrine breast tumours. *Breast Cancer Res*, 13(6), 318.
5. Guedj M, Marisa L, de Reynies A et al. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene* 2012; 31: 1196-1206.
6. Collins LC, Cole KS, Marotti JD et al. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol* 2011; 24: 924-931.
7. Lehmann-Che J, Hamy AS, Porcher R et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res* 2013; 15: R37.
6. Hickey TE, Robinson JL, Carroll JS, Tilley WD. Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? *Mol Endocrinol* 2012; 26: 1252-1267.
9. Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res* 2014; 16: R7.
10. Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5505-5512.
11. Bonnefoi H, Grellety T, Tredan O et al. A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with a molecular apocrine HER2-negative locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 2012-1). *Ann Oncol* (in press) 2016.
12. Traina TA, Miller K, Yardley DA et al. Results of a phase 2 study of enzalutamide, an androgen receptor (AR) inhibitor, in advanced AR+ triple-negative breast cancer. *ASCO* 2015; abstract 1003.
13. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 2004;10:33-9.
14. Verbeke S, Richard E, Monceau E et al. Humanization of the mouse mammary gland by replacement of the luminal layer with genetically engineered preneoplastic human cells.

Breast Cancer Res 2014; 16: 504.

15. Moilanen AM, Riikonen R, Oksala R, et al. Discovery of ODM-201, a new-generation androgen receptor inhibitor targeting resistance mechanisms to androgen signaling-directed prostate cancer therapies. *Sci Rep* 2015; 5: 12007.

**Annexe 2. Contrat de recherche avec le laboratoire BAYER HealthCare concernant l'ODM-201.**

*Contrat non reproduit dans sa totalité car confidentiel*

AGREEMENT  
FOR THE SUPPORT OF NON-CLINICAL INSTITUTION INITIATED RESEARCH (IIR)

between Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc.  
100 Bayer Boulevard  
PO Box 915  
Whippany, NJ 07981-0915  
USA

– hereinafter referred to as "BAYER" –

and Institut Bergonié  
229 cours de l'Argonne  
33000 Bordeaux  
France

– hereinafter referred to as "INSTITUTION" –

(BAYER and INSTITUTION hereinafter jointly or individually referred to as the "Parties" or a "Party")

Customer File Number: US2083164304

BHCP (US) / Pre-Clinical IIR / Opt 2A  
June 2016 (JAC)

1

### Annexe 3. Consentement de recherche biomédicale de l'Institut Bergonié.



Volet 1 (blanc) à remettre au patient  
Volet 2 (canari) à mettre dans le dossier médical  
Volet 3 (rose) à transmettre au département de Pathologie

#### CONSENTEMENT POUR LE DON D'ELEMENTS DU CORPS HUMAIN ET D'INFORMATIONS BIOMEDICALES A DES FINS DE RECHERCHE

Je confirme que j'ai été informé(e) des modalités de recueil des échantillons et des informations associées ainsi que des conditions de gestion des collections dans le cadre du Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Bergonié (CRB-IB).

J'ai pu poser toutes les questions à l'équipe médicale.

J'ai bien compris que ma participation était volontaire et que j'étais libre de modifier ou révoquer mon consentement à tout moment sans aucune justification, sans que cela n'ait de conséquence sur mon suivi médical.

Mon consentement ne décharge pas le CRB-IB de sa responsabilité et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Je donne mon accord pour que les échantillons et produits dérivés, ainsi que les données biocliniques associées puissent être gérés par le CRB-IB afin qu'ils puissent être :

- utilisés à des fins de recherche fondamentale et appliquée dans le domaine de ma pathologie,
- utilisés à des fins de toute autre recherche scientifique sous contrôle de la pertinence scientifique et éthique de l'utilisation par le CRB-IB,
- inclus dans des recherches de marqueurs génétiques constitutionnels de manière anonyme sans que le résultat ne permette d'identifier ma personne ou ma famille,
- utilisés pour le développement de produits qui pourraient être commercialisés après l'aboutissement de la recherche, sans qu'aucun bénéfice financier ne puisse me revenir.

J'ai bien conscience que :

- je peux demander à tout moment la destruction de mes échantillons conservés en le demandant à

**Institut Bergonié - Département de Pathologie - CRB  
229 cours de l'Argonne CS 61283 - 33076 Bordeaux Cedex**

- je n'aurai aucun retour financier
- aucun bénéfice direct ne peut être attendu des recherches scientifiques qui pourront être faites grâce à mes échantillons
- je pourrai obtenir des informations globales sur les activités du CRB-IB et les avancées de la recherche en m'adressant au Dr. NEUVILLE, Médecin Responsable du CRB-IB (adresse ci-dessus).
- j'accepte que le CRB-IB puisse recontacter mon médecin si des informations importantes pour mon suivi médical sont obtenues lors des recherches.

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| Nom et prénom du patient :<br>.....   | <i>Etiquette Patient</i>        |
| Date de naissance: .....  |                                 |
| <input type="checkbox"/> J'accepte que les « surplus biologiques » de mes prélèvements soient utilisés à des fins de recherche                        |                                 |
| <input type="checkbox"/> J'accepte que l'examen de mes caractéristiques génétiques constitutionnelles soit réalisé pour les recherches le nécessitant |                                 |
| <input type="checkbox"/> Je m'oppose à l'utilisation de mes prélèvements à des fins de recherche ou à l'examen de mes caractéristiques génétiques     |                                 |
| Date : .....  | Signature du patient :<br>..... |
| Nom et signature de la personne ayant recueilli le consentement :   |                                 |
| Signature :<br>.....  | .....                           |

## Annexe 4. Protocole de prélèvement tumoral sur pièce opératoire en vue d'établissement d'un *Patient Derived Xenograft* (PDX).

|   |   |                         |
|---|---|-------------------------|
|  <b>INSTITUT BERGONIÉ</b><br>100 cours de l'Argonne<br>F-33000 Bordeaux cedex<br>www.bergonie.org<br><small>Centre National de la Recherche en Cancérologie et en Biologie</small> | Révisé le 17/02/2017  | Création : 07/02/2017   |
|   | Responsible : Gaëtan marie MAC GROGAN<br>Service : BioPathologie/Anatomie et cytologie pathologique | Application: 17/02/2017 |

### Protocole de prélèvement de tumeurs mammaires pour la culture primaire (projet PDX SEIN)

*Modifications identifiées par un trait orange dans la marge*

#### 1. Objectif

Décrire les actions à mener pour le prélèvement de tumeurs mammaires pour la culture primaire dans le cas du projet PDX SEIN.

#### 2. Personnel concerné

- Responsable du projet en Anapath : Gaëtan MacGrogan
- Internes de routine, macro fraîche
- Médecins de routine, macro fraîche
- Techniciens de routine, macro fraîche
- Techniciennes du CRB
- Techniciennes de Recherche clinique
- Cadre du laboratoire

#### 3. Matériels et produits utilisés

- Tubes 15 ml contenant du milieu de culture « DMEF12+PS » préparé par l'unité de recherche, conservé à 4°C dans le frigo de la salle de macroscopie.
- Fragment tissulaire frais de cancer du sein.

#### 4. Prélèvements concernés

- Toute tumeur du sein réceptionnée à l'état frais dont la taille macroscopique est > 25mm.

#### 5. Actions à réaliser

- Sortir du frigo un tube 15 ml contenant du milieu de culture « DMEF12+PS ».
- Le laisser se réchauffer 15 min à température ambiante, pendant la prise en charge macroscopique de la pièce opératoire.
- Après repérage, encrage, photo macro, prélèvement pour la tumorotheque (minimum 250mg) et prélèvement miroir.
- Découper un fragment de la tumeur de la dimension d'un pois chiche ou plus si beaucoup de matériel tumoral.
- Mettre le fragment tissulaire dans le tube 15 ml.
- Noter sur le tube au feutre indélébile le numéro d'anapath, la date et les 2 premières lettres du nom et du prénom.

*L'impression de ce document est de votre responsabilité, il n'est plus valable s'il fait l'objet d'une révision*

- Indiquer sur le bon de demande d'examen (feuille verte) de la tumeur qu'un prélèvement a été effectué pour la recherche (prélèvement PDX).
- Laisser le tube sur la paillasse à température ambiante.

#### 6 Personnes du laboratoire de Richard Iggo à contacter

- Richard Iggo: 06 88 52 88 85
- Thomas Grellety: 06 43 43 94 88
- Julie Sentis: 06 27 45 82 56

Si personne est joignable, laisser un message sur le répondeur et laisser le prélèvement à température ambiante.


#### 7 Récupération du consentement

- But : vérifier que la patiente a bien été informée et a signé le consentement pour l'utilisation de son matériel tumoral à des fins de recherche
- Une fois que le prélèvement est stocké dans le laboratoire de recherche, prévenir le responsable du projet de recherche Anapath qui contacte une ARC.
- L'ARC vérifie que la patiente a bien signé le consentement pour l'utilisation de son matériel tumoral à des fins de recherche selon le logigramme en annexe.

#### 8 Traçage des cas

- Un fichier .xls se trouvant sur P/IggoIab fait le point de tous les cas recueillis dans le cadre de l'étude avec le numéro anapath du prélèvement, l'immunophénotype, le statut consentement, la date de prélèvement, la date de conditionnement dans le laboratoire de recherche.

## 9 Annexe



**Annexe 5. Contrat relatif à la réalisation de recherche ancillaire biologique à partir du matériel de l'essai UCBG12-1 entre UNICANCER (Promoteur) et l'Institut Bergonié (Plateforme).**

*Contrat non reproduit dans sa totalité car confidentiel*

**CONTRAT RELATIF À LA REALISATION  
D'UNE ANALYSE A PARTIR D'UNE COLLECTION  
CONSTITUEE DANS LE CADRE D'UNE RECHERCHE  
BIOMEDICALE  
ETUDE BIOLOGIQUE « FACTEURS PRÉDICTIF DE RÉPONSE À  
L'ACÉTATE D'ABIRATÉRONNE »  
DANS LE CADRE DE L'ESSAI CADUSEIME02 - AMA**

SPONSOR N° : UC-0140/1206

EUDRACT N° : 2012-002525-29

**Entre les soussignés :**

**UNICANCER**, Groupement de Coopération Sanitaire (GCS) à gestion privée et à but non-lucratif, dont le siège social est situé au 101, rue de Tolbiac – 75654 Paris Cedex 13, représenté par

Madame Beata JUZYNA, Directeur des Programmes Cliniques,

Ci-après dénommée le «Promoteur»

**D'une part,**

**Et**

**L'INSTITUT BERGONIE**, Centre de Lutte Contre le Cancer, établissement participant au service public hospitalier (art. L.6162-1 à L.6162-13 du Code de la santé publique), dont le siège social est situé au 229 cours de l'Argonne 33076 BORDEAUX CEDEX,

représenté par

Monsieur le Professeur François-Xavier MAHON, Directeur Général et par délégation par Monsieur Christian FILLATREAU, Directeur Général Adjoint,

Ci-après dénommé la « Plateforme »

**D'autre part,**

**En présence de Monsieur Thomas Grellety**

Interne en Oncologie Médicale, Doctorant dans l'Unité INSERM de l'Institut Bergonié.

La Plateforme et le Promoteur étant collectivement désignés « les Parties »

**Après avoir exposé que :**

UNICANCER, dans le cadre de ses missions de soutien à la recherche clinique en cancérologie est le promoteur, en France, d'une recherche biomédicale intitulée :

**« A phase II trial evaluating the Activity of Abiraterone Acetate plus Prednisone in Patients with a Molecular Apocrine HER2-negative locally advanced or metastatic Breast Cancer »**

AMA\_Convention UNICANCER-Bergonie\_Facteurs prédictifs de réponse à l'AA v1  
Paraphes

Page 1/13

**Annexe 6. Contrat relatif à la réalisation de recherche ancillaire biologique à partir du matériel de l'essai UCBG12-1 entre UNICANCER (Promoteur) et l'Institut Curie (Plateforme).**

*Contrat non reproduit dans sa totalité car confidentiel*

**CONTRAT RELATIF À LA REALISATION  
D'UNE ANALYSE A PARTIR D'UNE COLLECTION  
CONSTITUEE DANS LE CADRE D'UNE RECHERCHE  
BIOMEDICALE**

**ETUDES BIOLOGIQUES « SÉQUENCAGE NGS ET ANALYSE DE  
TRANSCRITS VIA L'APPROCHE NANOSTRING »  
DANS LE CADRE DE L'ESSAI CADUSEIME02 - AMA**

SPONSOR N° : UC-0140/1206

EUDRACT N° : 2012-002525-29

**Entre les soussignés :**

**UNICANCER**, Groupement de Coopération Sanitaire (GCS) à gestion privée et à but non-lucratif, dont le siège social est situé au 101, rue de Tolbiac – 75654 Paris Cedex 13,

représenté par

Madame Beata JUZYNA, Directeur des Programmes Cliniques,

Ci-après dénommée le « Promoteur »

**D'une part,**

**Et**

**L'Institut Curie** Fondation reconnue d'Utilité Publique, dont le siège est situé 26, rue d'Ulm – 75005 PARIS, pris en son établissement de Paris, situé 26 rue d'Ulm 75005 PARIS,

représenté par

Monsieur le Professeur François DOZ, Directeur de la Recherche Clinique et de l'Enseignement et Monsieur Claude HURIET, Président du Conseil d'Administration et par délégation Monsieur Amaury MARTIN, Directeur des Brevets et Partenariats Industriels, dûment habilités,

Ci-après dénommé la « Plateforme »

**D'autre part,**

**En présence de Dr Céline Callens**

Salariée de l'Institut Curie dans le service de Génétique-Unité de Pharmacogénomique.

La Plateforme et le Promoteur étant collectivement désignés « les Parties »

**Après avoir exposé que :**

UNICANCER, dans le cadre de ses missions de soutien à la recherche clinique en cancérologie est le promoteur, en France, d'une recherche biomédicale intitulée :

**« A phase II trial evaluating the Activity of Abiraterone Acetate plus Prednisone in Patients with a Molecular Apocrine HER2-negative locally advanced or metastatic Breast Cancer »**

**Annexe 7. *Material Transfer Agreement* avec le laboratoire Genentech concernant le GDC-0575 (MTA ID: OR-216276).**

*Contrat non reproduit dans sa totalité car confidentiel*

ID: OR-216276

**Material Transfer Agreement**

This Material Transfer Agreement ("Agreement") is made and entered into, effective as of the final signature date or, if earlier, the date Genentech ships Genentech Materials to Institution ("Effective Date"), by and between Institut Bergonié, ("Institution") and Genentech, Inc., having a principal place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 ("Genentech").

This Agreement governs the transfer of the Genentech Materials (as defined below) from Genentech, or its written authorized designee ("Designee"), to Institution and Institution's use of the Genentech Materials received from Genentech, or its Designee, under this Agreement. Genentech and Institution hereby agree as follows:

1. **Genentech Materials.** "Genentech Materials" means the GDC-0575, provided pursuant to this Agreement. "Research" means the studies to be performed by, or on behalf of, the Principal Investigator, and set out in the attached Research Proposal.