

Le phénotype biologique du potentiel métastatique des cancers du sein existe-t-il ?

T. Maudelonde, N. Boulle et J. Solassol

Introduction

L'acquisition par les cellules cancéreuses d'un phénotype métastatique représente un des aspects les plus péjoratifs de la progression tumorale. Ce phénotype se caractérise par l'invasion des tissus voisins, par la migration des cellules métastatiques *via* le sang et la lymphe, vers des organes qu'elles sont capables d'envahir et dans lesquels elles prolifèrent. Ces événements résultent de l'implication directe des produits de l'activité de certains gènes, des fonctions intégrées provenant des molécules organiques synthétisées par la cellule, d'une dérégulation de l'homéostasie tumorale par des phénomènes inflammatoires et/ou des modifications d'activité enzymatique. Les innovations technologiques récentes permettent d'envisager le concept de signature moléculaire des tumeurs. Elles peuvent évaluer l'expression de plusieurs gènes à la fois. Le génome humain possède 30 000 à 40 000 gènes. Leur expression donne naissance à plus d'un million de protéines. Un gène peut donc être à l'origine de plusieurs protéines. Le choix de la synthèse d'une protéine donnée va donc dépendre non seulement de la transcription du gène en ARN mais aussi d'autres mécanismes dont les régulations sont complexes et vont varier d'un tissu à l'autre. On appelle génome, l'ADN total, le transcriptome, l'ensemble des ARN et protéome, les protéines synthétisées dans la cellule. Au cours de la cancérogenèse se produisent des anomalies de l'expression des gènes qui vont modifier ces trois grands groupes de molécules. L'étude de la génomique fonctionnelle (ARN) et de la protéomique devrait donc montrer des profils biologiques spécifiques de cancers du sein métastatiques.

Aspects physiopathologiques de la formation des métastases

Depuis longtemps, les cliniciens savent que la progression tumorale n'est pas obligatoirement corrélée à son potentiel métastatique et la recherche de marqueur spécifique du potentiel métastatique d'un cancer récemment diagnostiqué est un des enjeux majeurs de la cancérologie. Cet objectif passe par une bonne compréhension des mécanismes intimes du potentiel métastatique afin d'envisager des thérapies plus spécifiques dirigées contre les voies métaboliques impliquées.

Hypothèses mécanistiques de l'évolution métastatique d'un cancer

Plusieurs modèles d'évolution métastatique ont été proposés :

– Il s'agit d'un *événement tardif de la cancérogenèse*. Quelques cellules cancéreuses, durant la croissance tumorale, acquièrent la capacité de métastaser par le biais de mutations additionnelles mais il n'y a pas de corrélation entre la taille tumorale et l'apparition de métastase.

– Il s'agit d'un *événement précoce* et il existe deux possibilités : ou bien les sous-populations de cellules métastatiques sont relativement instables résultant dans un équilibre entre la génération et la perte de ces variants cellulaires, ou bien une fois que le clone métastatique a émergé, il prolifère à grande vitesse et domine la masse tumorale elle-même (théorie dite clonale dominante de métastase).

Il n'est pas encore possible de trancher entre ces deux hypothèses ; cependant, les études de profil d'expression génique suggèrent fortement que la capacité à métastaser est un événement précoce de la tumorigenèse mammaire. En effet, le transcriptome des tumeurs primaires et celui des métastases qui se développent plusieurs années après sont très semblables. Ces données, associées à la théorie émergente du développement des tumeurs cancéreuses à partir des cellules souches mammaires (1, 2), suggèrent qu'il existerait des cancers à fort potentiel métastatique et d'autres à faible potentiel (fig. 1). À partir des tumeurs de type métastatique, probablement sous l'influence des fibroblastes du stroma, des sous-populations pourraient essaimer. Ces variants métastatiques proviendraient de cellules souches cancéreuses subissant des mutations oncogéniques générant des tumeurs de mauvais pronostic. Au

contraire, si des événements génétiques se produisent dans des cellules progénitrices différenciées (provenant de cellules souches par division asymétrique), cela aboutirait à un cancer de bon pronostic non ou peu métastatique. Les mutations qui arrivent à différents moments de la différenciation tumorale vont alors contrôler la capacité à métastaser. Certaines cellules métastatiques pourraient exprimer un set de gènes spécifique d'un tissu permettant à la cellule cancéreuse de se développer dans un tissu particulier (os, poumon, foie...).

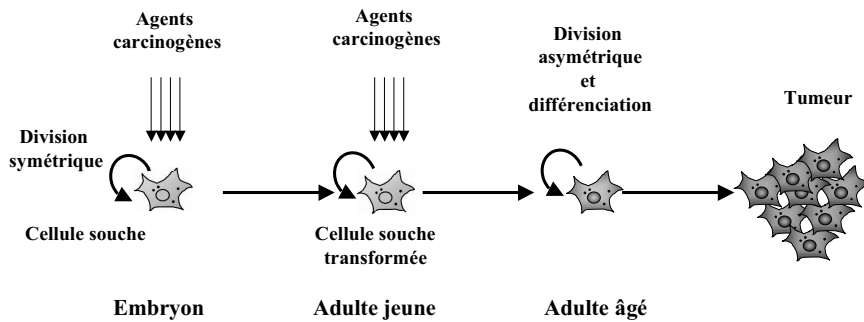


Fig. 1 – Hypothèse de carcinogénèse à partir des cellules souches (Modifiée d'après Murrell A. (2006) The ScientificWorld J 6: 1888-910).

Mécanismes moléculaires de la diffusion métastatique

Le processus de diffusion métastatique peut être divisé en trois étapes (fig. 2) :

- détachement de la cellule tumorale de son milieu d'origine et invasion de la matrice environnante ;
- passage dans la circulation sanguine ou lymphatique ;
- extravasation, survie et multiplication dans un site secondaire.

Le passage dans la circulation des cellules tumorales semble une étape « facilement » franchie par les cellules tumorales. À l'opposé, la première étape et plus particulièrement la troisième étape semblent être des étapes limitantes du processus métastatique.

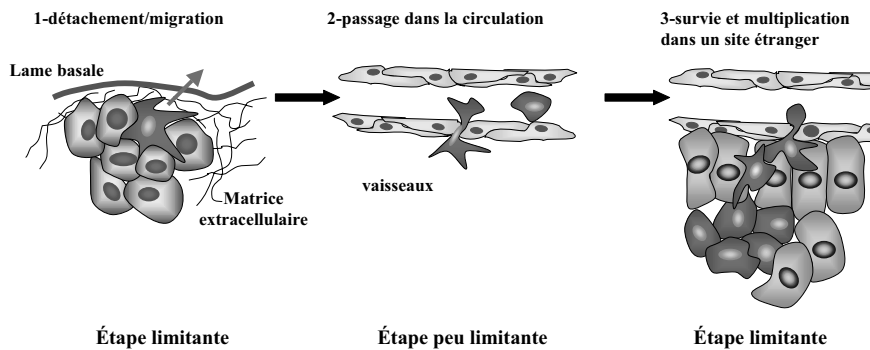


Fig. 2 – Étapes de la diffusion métastatique.

Détachement du milieu d'origine et invasion de la matrice environnante

Cette étape met en jeu les molécules d'adhésion et les protéases extracellulaires.

Molécules d'adhésion

Les interactions de la cellule avec les cellules voisines et avec la matrice extracellulaire régulent son comportement en induisant différents signaux impliqués dans la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire. Ces interactions se font par l'intermédiaire des molécules d'adhésion : molécules de la famille des cadhérines, calcium-dépendantes (exemple : cadhérine-E) ou de la superfamille des immunoglobulines, indépendantes du calcium (exemple : N-CAM ou *neural cell adhesion molecule*) pour les interactions cellule/cellule, molécules de la famille des intégrines pour les interactions cellule/matrice extracellulaire. L'adéquation de la cellule normale avec son environnement est validée par ces molécules d'adhésion et est nécessaire à sa survie : ainsi, une cellule normale, placée dans un environnement étranger, ne peut pas survivre et est vouée à l'apoptose. La cellule tumorale présente une modification de ses molécules d'adhésion. Les tissus cancéreux sont fréquemment caractérisés par la perte de la cadhérine-E et des modifications des molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines (N-CAM, etc.) ont été également décrites. La cellule tumorale devient capable de se détacher de son environnement habituel et d'établir de nouvelles liaisons adhésives. Par ailleurs, la cellule tumorale présente une résistance accrue à

l'apoptose qui lui permet de survivre hors de son environnement naturel et en l'absence des interactions normales avec ses cellules voisines et la matrice extracellulaire.

Protéases extracellulaires

Elles appartiennent à différentes familles telles que la famille des métalloprotéases matricielles (MMP), des sérines protéases (plasmine...) ou des aspartyl protéases (cathepsine D...). Elles sont fréquemment surexprimées dans les tissus tumoraux et elles sont impliquées dans la migration et l'invasion tumorale par différents mécanismes :

- la dégradation de la matrice extracellulaire et de la lame basale, favorisant la migration cellulaire ;
- la libération de facteurs de croissance et de survie séquestrés au sein de cette matrice (exemple : le facteur de croissance FGF) ;
- le clivage de molécules d'adhésion telles que la cadhérine-E ;
- une stimulation de la migration cellulaire.

Passage des cellules tumorales dans la circulation

Le suivi, dans des modèles animaux, de cellules tumorales injectées dans la circulation a permis de montrer que la survie des cellules tumorales dans le système vasculaire, leur arrêt puis l'extravasation sur un site secondaire ne constituent pas des étapes limitantes du processus métastatique (peu de pertes cellulaires). Le problème posé par cette étape est de pouvoir détecter les cellules tumorales circulantes afin d'évaluer le risque d'apparition de métastases chez un patient porteur d'une tumeur. Plusieurs approches ont été proposées pour cela, notamment des approches de biologie moléculaire ou de repérage des cellules tumorales présentes dans le sang, par exemple à l'aide d'anticorps spécifiques.

Survie et multiplication dans un site étranger

Peu de cellules tumorales sont capables de survivre et de proliférer sur un site différent de leur site d'origine (site secondaire). Ainsi, dans une expérience menée sur une lignée tumorale d'origine cutanée (mélanome B16F1) injectée dans la veine mésentérique de souris, on a pu montrer que 83 % des cellules tumorales injectées atteignaient le parenchyme hépatique, que 2 % de ces cellules formaient des micrométastases et que seulement 0,02 % des cellules injectées formaient des métastases cliniquement décelables, capables d'entraîner le décès de l'animal.

Différents obstacles s'opposent à la survie et à la prolifération de la cellule tumorale dans un site (environnement) étranger. Ces obstacles sont notamment l'inadéquation entre les molécules d'adhésion présentes à la surface de la cellule tumorale et celles présentées par son nouvel environnement (cellules, matrice extracellulaire) et l'inadéquation des facteurs de croissance et de survie présents au niveau du site secondaire. Ces inadéquations entraînent, dans une cellule normale, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Un autre obstacle important rencontré par la cellule tumorale est la réponse immunitaire antitumorale du nouveau site colonisé. Lorsqu'une cellule tumorale survit dans le site secondaire dans lequel elle a migré, elle peut donner lieu à :

- une *cellule tumorale dormante*, qui reste localisée dans le site secondaire mais ne prolifère pas (ni prolifération, ni apoptose). La présence de telles cellules permettrait d'expliquer la survenue, parfois plusieurs années après le traitement d'une tumeur primitive, de métastases secondaires ;

- des *micrométastases*. Dans ce cas, la cellule tumorale est capable de proliférer dans le site secondaire mais cette prolifération serait contrebalancée par une apoptose cellulaire limitant son développement. Ces micrométastases restent très difficiles à détecter car de petites tailles (< 2 mm) ;

- des *métastases actives*. À ce stade, les cellules tumorales prolifèrent au niveau du site secondaire. L'angiogenèse se développe permettant l'expansion des métastases, qui deviennent cliniquement décelables et capables de menacer le pronostic vital.

De nombreuses questions restent posées sur cette troisième étape et font l'objet de recherches actives : quelles sont les cellules tumorales qui, parvenues au niveau du site secondaire, vont évoluer vers des métastases actives, et quelles sont leurs caractéristiques ? Quels sont les gènes impliqués dans ce processus ?

Spécificité tissulaire des métastases

Le site des métastases secondaires est lié à l'affinité particulière des cellules cancéreuses issu d'un organe donné pour certains tissus. Ainsi, le cancer du sein donnera surtout des métastases ganglionnaires, pulmonaires, hépatiques et osseuses (fig. 3). Plusieurs hypothèses, non exclusives, permettent d'expliquer la spécificité tissulaire des métastases.

- L'hypothèse « *mécanique* » : L'arrêt et la prolifération des cellules tumorales dans un site secondaire sont liés au trajet emprunté par les cellules tumo-

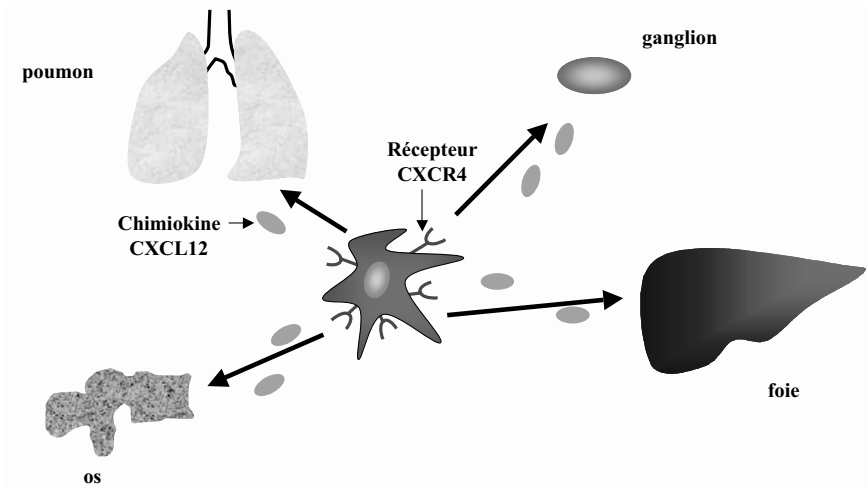


Fig. 3 – Mécanisme de la spécificité tissulaire des métastases.

rales et aux contraintes mécaniques subies par ces cellules. Ainsi, la cellule tumorale est contrainte de s'arrêter lorsque la taille des capillaires se réduit et va coloniser le tissu à proximité de ces capillaires.

– *L'hypothèse « soil and seed »* : Les cellules tumorales ne peuvent proliférer dans un site secondaire qu'en présence des facteurs adéquats, nécessaires à leur survie et à leur prolifération (facteurs de croissance, molécules d'adhésion, etc.). Ainsi, les cellules tumorales issues de cancer du sein sont probablement stimulées par des facteurs produits par les cellules osseuses (ostéoblastes, ostéoclastes) tels que le TGF- β ou la PTH-RP (*parathyroid hormone related protein*), alors que des cellules tumorales issues d'autres tumeurs primitives n'y sont pas sensibles.

– *L'hypothèse des chimiokines* : Récemment, il a été montré que les cellules tumorales étaient attirées, comme les globules blancs, sur des sites secondaires par des chimiokines spécifiquement produites au niveau de ces sites. Les cellules de cancer du sein expriment abondamment le récepteur transmembranaire CXCR4, qui lie la chimiokine CXCL12. Or, cette chimiokine est produite de manière spécifique par les tissus pulmonaire, osseux, ganglionnaire et hépatique qui sont les sites préférentiels de métastases du cancer du sein. Un aspect intéressant de cette hypothèse est qu'elle permet d'envisager des thérapeutiques ciblées contre les métastases. Ainsi, des auteurs travaillant sur le cancer du sein ont-ils diminué très significativement le développement de métastases

ganglionnaires et pulmonaires en traitant des souris, auxquelles on avait injecté des cellules issues de tumeur du sein, par des anticorps anti-CXCR4.

Au total, une cellule cancéreuse métastatique paraît avoir des caractéristiques qui devraient la différencier des autres cellules cancéreuses et depuis plusieurs années les auteurs recherchent le ou les marqueurs permettant de les détecter.

Marqueurs de métastases

La recherche de marqueurs de métastases a évolué en plusieurs étapes. Tout d'abord ce fut la corrélation entre l'intervalle libre de récurrence, la survie globale et des marqueurs protéiques détectée sur la base d'une hypothèse mécanistique (exemple : protéases, facteurs intervenant dans la croissance cellulaire) puis, sous l'impulsion donnée par le séquençage du génome humain, l'étude comparative de l'expression génique des cellules normales et de celle des cellules tumorales s'est développée définissant la notion de famille de gènes caractéristiques d'un cancer ou cluster de gènes. La dernière étape qui est en cours de développement est l'approche protéomique, plus complexe et qui est encore limitée par des aspects technologiques, mais qui est peut-être celle qui apportera le plus d'éclaircissement.

Marqueurs classiques

Ils sont essentiellement cliniques. Le cancer du sein métastase préférentiellement dans l'os, le foie et le poumon. Le risque de métastase augmente avec l'existence d'un envahissement ganglionnaire, la taille de la tumeur et la perte de différenciation cellulaire au niveau histologique. Chez les femmes sans envahissement ganglionnaire, l'envahissement vasculaire est un paramètre prédictif important. 30 % des femmes sans envahissement ganglionnaire auront des métastases et 30 % des femmes avec envahissement ganglionnaire n'auront pas de métastase plus de 10 ans après le traitement local. Les marqueurs biologiques permettant de détecter la localisation métastatique restent encore à trouver. Cependant, les cancers du sein avec des récepteurs aux œstrogènes métastasent plus à l'os et les cancers lobulaires au niveau de l'ovaire ou du tractus digestif.

Marqueurs récents

Ils sont surtout biologiques. Les premiers correspondent à des gènes dont l'activité dans les cellules cancéreuses a une logique biologique reconnue :

– *ERBB2* ou *HER2* qui est un membre de la famille du récepteur de l'EGF (*HER1*) est retrouvé amplifié ou surexprimé dans 30 % environ des cancers du sein et est associé à un mauvais pronostic dans les formes avec envahissement ganglionnaire. L'utilisation d'anticorps humanisés inhibiteurs d'*HER2* comme traitement adjuvant des cancers du sein ayant une amplification de *HER2* améliore de façon spectaculaire leur pronostic.

– La *détection de cellules cancéreuses disséminées circulantes, dans la moelle osseuse ou dans les ganglions*. Quelques études ont recherché des cellules cancéreuses circulantes par marquage immuno-histochimique ou par RT-PCR. Sur de petites séries, il a été retrouvé une corrélation entre les cellules détectées par la recherche de l'ARN messager de la cytokératine 19 ou de la mamoglobine et un raccourcissement de l'intervalle libre de récurrence. Des études plus nombreuses montrent que la présence de cellules cancéreuses mammaires dans la moelle osseuse, utilisant des anticorps contre des protéines épithéliales, principalement des cytokératines, est un marqueur de raccourcissement de l'intervalle libre de récurrence et de la survie globale mais tous ces résultats sont très controversés. Il est possible que la difficulté à établir une corrélation entre la présence de cellules cancéreuses à distance du foyer originel et le développement de métastases proviennent du fait que moins de 0,1 % des cellules cancéreuses circulantes sont capables d'établir des lésions métastatiques. Ceci voudrait dire que la plupart des cellules cytokératine-positives des micrométastases retrouvées dans la moelle osseuse ne sont pas capables de former des métastases.

– *Lurokinase type activateur du plasminogène (uPA)* et son inhibiteur (*PAI1*) qui intervient dans les étapes précoces de la cascade métastatique caractérisée par la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. Cette invasion s'accompagne de l'activation de systèmes enzymatiques dont celui des métalloprotéases et celui de l'uPA. Ce dernier est associé à un récepteur et à deux inhibiteurs (*PAI1* et *PAI2*). L'uPA active le plasminogène en plasmine qui dégrade les composants de la matrice extracellulaire et active les métalloprotéases. *PAI1* est produit par le stroma et souligne l'importance des relations entre la tumeur et le stroma, notamment pour contrôler les mécanismes de la protéolyse initiée par le cancer. Les patientes présentant un cancer du sein, avec ou sans métastase ganglionnaire et ayant une élévation de l'activité uPA ont un mauvais pronostic avec un risque élevé d'apparition de

métastases (3). Une augmentation associée de PAI1 renforce la valeur pronostique de l'uPA. L'intérêt pronostique de l'étude de l'activité uPA associée à celle de PAI1 a été évalué favorablement par le « Tumor Marker Utility Grading System » mais il n'a pas encore une large application en clinique.

L'étude du profil d'expression génique des cancers du sein devrait permettre de mieux appréhender l'hétérogénéité et d'augmenter notre efficacité thérapeutique comme l'attestent plusieurs travaux récents qui montrent qu'un cancer ne s'explique pas par l'altération d'un seul gène mais plutôt par une famille de gènes qu'on appelle *cluster*. Ce *cluster* serait spécifique d'un type de cancer.

Méthodologie

Ces méthodes exploitent une propriété des molécules d'ADN et d'ARN qui est l'hybridation par complémentarité des bases azotées des nucléotides que constituent les acides nucléiques. Une séquence d'ADN synthétisée *in vitro* et fixée sur un support devient ainsi une sonde capable de reconnaître sa séquence complémentaire dans un milieu contenant des ARN ou de l'ADN. On est capable de fixer sur une surface, parfois inférieure à 1 cm², plusieurs milliers de sondes permettant ainsi d'apprécier le transcriptome d'un type cellulaire (4). Deux technologies existent : la société Affymetrix synthétise des sondes de petite taille (20-25 nucléotides), *in situ* sur le support, concernant plusieurs milliers de gènes. D'autres synthétisent des sondes qui sont souvent plus longues, puis les fixent sur le support afin de former ainsi des puces dites « à façon », car les gènes recherchés sont choisis par le chercheur concerné. La cible à détecter est auparavant rendue fluorescente, aussi, lorsqu'elle est retenue par sa sonde complémentaire, elle émet un signal fluorescent facilement visible. Cette intensité va varier en fonction du nombre de molécules d'ARN correspondant présentes dans le milieu à analyser. Puisqu'il s'agit de plusieurs milliers de gènes, les variations d'expression mises en évidence par les puces à ADN vont générer énormément d'informations qui ne peuvent être interprétées sans l'aide de la bio-informatique qui permet de les traiter de façon globale.

Grâce à cette méthodologie, certaines équipes ont mis en évidence des *clusters* de gènes dont l'expression est altérée durant la cancérogenèse mammaire. Malheureusement, ces études sont faites sur un nombre d'échantillon encore insuffisant pour maîtriser la variabilité biologique (5).

Une première étude a permis de montrer l'existence de cinq groupes de cancer du sein non décrits auparavant (6-8) et présentant des pronostics différents. Une classification hiérarchique met en évidence les récepteurs aux estrogènes comme le facteur informatif le plus important. Les cancers du sein se divisent en RE+ et en RE-. Tout d'abord trois sous-groupes de cancer sans expression de RE α : un « type basal » qui exprime les cytokératines 5/6 et 17 et celui des tumeurs surexprimant HER2, tous deux de très mauvais pronostic ; un sous-groupe intitulé « semblable au sein normal » qui exprime les gènes des adipocytes et des autres cellules mammaires d'origine non épithéliale. Le groupe des cancers avec expression du RE α était divisé en trois sous-groupes : des tumeurs étiquetées « luminales A » qui surexpriment les cytokératines 8 et 18, et des tumeurs « luminales B » et « luminales C » qui ont des taux plus faibles de cytokératines et qui ont un moins bon pronostic. L'existence de ces groupes de cancers a été validée dans des séries de patientes indépendantes des groupes de caractérisation. Ces différentes classes ont des signatures biologiques très différentes qui suggèrent des mécanismes moléculaires particuliers à chaque type biologique étudié et permet d'espérer des thérapies ciblées adaptées (9). Cependant, des études sur de plus larges populations de patientes, de l'intérêt en tant que marqueur pronostique et d'indicateur thérapeutique, sont nécessaires avant d'envisager ce phénotypage biologique des cancers du sein en routine.

La seconde étude a été faite de façon rétrospective dans un groupe de 98 patientes de moins de 55 ans dont certaines avec des métastases à distance ($n = 34$), d'autres avec une forme familiale ($n = 20$) et ayant un suivi moyen de 10 ans afin de caractériser un sous-groupe de patientes à haut risque de métastase à distance (10). Une signature de mauvais pronostic basée sur le profil d'expression de 70 gènes a été retrouvée. Les gènes impliqués interviennent dans le cycle cellulaire, l'invasion, les métastases, l'angiogenèse et la transduction du signal. Cette signature comprend aussi des gènes exclusivement produits par les cellules stromales telles que les métalloprotéases MMP1 et MMP9 qui participent à la dégradation de la matrice extracellulaire soulignant l'importance du rôle du stroma dans l'agressivité tumorale. Cette signature a été validée dans une cohorte de 295 patientes avec ou sans envahissement ganglionnaire (11) et la classification obtenue paraissait être en accord avec les consignes de Saint-Gallen ou celles du NIH. Cette signature qui paraît donc du plus haut intérêt est en cours de validation sur des larges séries rétrospectives de patientes sous le contrôle d'un Consortium international (Trans BIG) (12). La finalité de ce travail est de savoir si l'étude de ces 70 gènes permettrait de remplacer la classique classification clinicopathologique.

Une autre étude faite dans un groupe de 115 cancers du sein sans envahissement ganglionnaire afin de prédire leur devenir a retrouvé un groupe de 76 gènes dont 60 pour les tumeurs ayant des RE α et 16 pour les tumeurs sans RE α (13). Une validation a été faite sur un autre groupe de 171 patientes sans envahissement ganglionnaire. La signature représente un marqueur pronostique indépendant permettant de définir un sous-groupe de tumeur ayant un haut risque de métastase et un raccourcissement de la survie globale. D'autres travaux ont été faits et suggèrent fortement que la classification des cancers du sein pourrait être redéfinie par l'étude des profils d'expression génique. En outre, les gènes qui auront montré une dérégulation dans ces classes définies moléculairement pourraient constituer des cibles thérapeutiques.

Il a aussi été tenté de caractériser les tumeurs métastasiées par l'étude des profils protéiques. L'approche protéomique est basée sur le couplage de trois technologies de pointe :

- l'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) qui permet de séparer plusieurs milliers de protéines d'un même échantillon ;
- la spectrométrie de masse (MS) qui permet d'identifier ces protéines et de mettre en évidence leurs modifications post-traductionnelles ;
- la bio-informatique qui permet la quantification du niveau des protéines et la constitution de bases de données.

Méthodes classiques de protéomique

La méthode classique d'électrophorèse bidimensionnelle, associée à la spectrométrie de masse (MALDI-TOF), repose sur la séparation des protéines en fonction de deux caractéristiques biochimiques : le point isoélectrique (PI) et la masse moléculaire. Une fois la 2-DE réalisée, les protéines sont révélées selon différentes méthodes de détection. Les taches d'intérêt retrouvées sur le gel, chacune pouvant contenir une ou plusieurs protéines, sont découpées et traitées individuellement. L'identification des protéines se fait par spectrométrie de masse de type MALDI-MS (*matrix assisted laser desorption/ionisation –mass spectrometry*) ou ESI-MS (*electro-spray ionisation*) couplée à la chromatographie liquide (LC). La tache du mélange séché est bombardée sous vide par un laser pulsé à 337 nm qui excite les molécules et ionise les peptides entraînés dans le champ électrique d'un aimant qui accélère les ions vers un détecteur. Tous les MALDI-MS actuels permettent une acquisition automatique des données et des bombardements programmables. Ils sont

équipés du mode de détection en Temps de Vol (TOF ou *time of flight*) et du mode Réflectron, l'arrivée des peptides chargés se faisant dans le détecteur TOF dans l'ordre croissant de masse, les plus lourds étant ralentis voire éliminés, le Réflectron permettant de focaliser la distribution isotopique et d'améliorer la résolution en diminuant la dispersion isotopique. L'automatisation de toutes ces étapes, de la 2DE à l'analyse par MALDI-MS correspond à ce que l'on appelle la protéomique à haut débit menant à identifier plusieurs centaines de protéines dans un même échantillon. Deux logiciels, MASCOT et PROFOUND, fondés sur des algorithmes différents, permettent d'interroger les principales banques de données protéiques SWISSPROT, PROTSITE et celle de la NCBI (US National Center for Biology Information) qui contiennent les traductions des séquences d'ADN de la GeneBank et les résultats de clivage par les protéases de séquences peptidiques connues. Lorsque la protéine n'est pas présente dans la banque de donnée, il est possible d'obtenir des informations sur la séquence en acides aminés des peptides tryptiques en mode MS/MS (double spectrométrie) à l'aide d'un spectromètre de masse de type *nano-electro-spray*.

Méthode de « puces » à protéines

Une nouvelle méthode est apparue, appelée SELDI-TOF pour *surface enhanced laser desorption ionisation - time of flight*. Développée par Ciphergen biosystems, cette plateforme protéomique associe le principe de « puce » à la spectrométrie de masse. La séparation, la détection et l'analyse des protéines se font directement à partir de l'échantillon biologique avec une sensibilité de l'ordre du femtomole. En pratique, quelques microgrammes de protéines issues d'échantillon variés (liquides biologiques, extraits cellulaire ou tissulaire) sont directement adsorbés sur une surface de 2 mm² (spot) présentant des propriétés chromatographiques variées. En fonction de la surface chromatographique, le mélange protéique subit un fractionnement qui dépend de la propriété chimique (anionique, cationique, hydrophobe, hydrophile ou d'affinité aux métaux) ou biologique (liaison à un anticorps, un peptide, un récepteur, un ligand ou un acide nucléique). La puce à protéine est introduite dans un spectromètre de masse. Sous l'action du rayonnement laser, les protéines liées à la « puce » sont désorbées/ionisées et analysées en termes de masse sur charge (m/z) d'après leur temps de vol pour atteindre le détecteur. Les signaux traités par des moyens informatiques sont traduits en spectre d'abondance relative *versus* la masse moléculaire des espèces détectées. Au final,

on obtient une vue d'ensemble de peptides et de protéines présents dans l'échantillon sous la forme de profils protéiques. Ces derniers sont ensuite normalisés et calibrés afin de limiter les biais liés à l'opérateur, à la surface chromatique ou à l'instrumentation elle-même. Ce système est particulièrement intéressant en analyse différentielle de type patient/témoin pour mettre en évidence des profils d'expression spécifiques. Par la suite, l'identification de marqueurs potentiels nécessite des étapes de purification supplémentaires par des méthodes électrophorétiques ou chromatographiques classiques afin de caractériser précisément des protéines d'intérêt. Méthode de microanalyse réalisée à partir de faibles quantités protéiques de l'ordre du microgramme, elle permet l'établissement de profils d'expression protéique à partir de mélanges complexes. Elle est toutefois encore limitée dans la taille des protéines qu'elle peut analyser.

Applications de la protéomique aux cancers du sein

Protéomique et tissus tumoraux

La plupart des études sur le sein avaient pour but d'identifier les protéines qui sont différentiellement exprimées dans le tissu normal et le tissu cancéreux. Afin de parvenir à ce résultat, la microdissection par capture laser a été utilisée. Elle permet d'isoler les cellules tumorales du stroma environnant et du tissu normal (14) et de permettre la caractérisation du tissu cancéreux sans contamination par le tissu voisin à l'aide des diverses techniques de protéomique (14, 15). Environ 30 000 à 50 000 cellules semblent suffisantes pour obtenir des données exploitables. Quelques études faites sur un petit nombre de cancers du sein invasifs ont été publiées et un certain nombre de différences dans l'expression protéique ont été trouvées, bien que 70 à 85 % de ces protéines ne sont pas significativement différentes entre le tissu tumoral et le tissu cancéreux (16, 17). Un autre travail portant sur une petite quantité de carcinomes *in situ* canaux objectivé 57 protéines différemment exprimées du sein normal (15). Beaucoup de ces protéines n'avaient pas encore été associées aux cancers du sein démontrant le grand intérêt de développer cette technologie dans la problématique des cancers du sein. Un travail récent recherchant l'expression de protéines dans la tumeur mammaire primaire, pouvant prédire l'envahissement ganglionnaire utilisant la microdissection laser associée au SELDI-TOF, a isolé deux pics

protéiques localisés à 4 871 et 8 596 daltons qui pourraient être considérés comme des marqueurs potentiels de métastases (18). Leur identification est en cours.

Un petit nombre d'équipes a tenté de caractériser des marqueurs spécifiques de métastases par le biais des cultures de cellules mammaires cancéreuses à fort potentiel métastatique soit en induisant une résistance à une drogue (adryamycine, paclitaxel) (19-21) et ont mis en évidence des protéines qui, souvent, ne sont pas des marqueurs classiques de métastases. Une des études les plus récentes (21), utilisant une technique HPLC/MS/MS, compare une lignée de cellules mammaires cancéreuses métastatiques (M4A4) à une lignée de cellules cancéreuses mammaires non métastatiques (NM2C5). Les auteurs ont mis en évidence 43 protéines différenciellement exprimées par les deux lignées dont 16 sont uniquement exprimées dans une des deux lignées. Douze d'entre elles sont hyperexprimées dans la lignée métastatique et ont un rôle dans l'invasion, la motilité cellulaire, le métabolisme et la transduction du signal. Parmi elles, la galectine-1 et NM23-H2. La galectine-1, membre de la famille des protéines de liaison de la β -galactoside, régule la prolifération et est impliquée dans les interactions cellule-cellule et cellule matrice extracellulaire. Elle a déjà été proposée comme marqueur de métastases dans les cancers du sein (22) et elle est exprimée très souvent avec HER2 (erbB-2) qui est un facteur de mauvais pronostic. NM23-H2 est une enzyme multifonctionnelle qui régule la transcription d'un certain nombre de gènes (23). Dans une lignée résistante au Taxol[®], Dowling *et al.* (19), analysant les protéines membranaires de ces cellules, ont retrouvé une hyperexpression de 16 protéines dont la galectine-3 et la cofiline qui intervient dans la motilité cellulaire et qui est connue pour avoir une expression altérée dans les cancers du sein (24). Certaines de ces protéines avaient été retrouvées hyperexprimées dans une lignée non métastatique par les auteurs précédents (HSP70, annexine II). Une troisième étude (20), portant sur une lignée de MCF7 résistante à l'adryamycine, montre une hyperexpression de la GST-pi, de l'annexine-5, de la chaîne B de la lactate déshydrogénase et une hypoexpression de la COMT, qui est une enzyme de détoxification utilisée notamment pour le métabolisme des estrogènes. Une autre étude portant sur des lignées de cellules mammaires cancéreuses hyperexprimant HER2 (SKBr3, BT-474) hyperexpriment aussi des enzymes du métabolisme intermédiaire et de détoxification (25) telles que l'acide gras synthétase, la glyoxalase 1, l'Hsp27.

Sérum des cancers du sein et plateforme SELDI-TOF

Les premiers travaux concernant cette technologie ont été publiés par Petricoin *et al.* en 2002. Utilisant les puces à protéines ils ont consisté à analyser le sérum de malades atteints de cancer de l'ovaire et de cancer de la prostate (26). Ils rapportaient qu'un profil protéique spécifique sans identification des protéines d'intérêt était capable de diagnostiquer ce cancer au stade infraclinique avec une spécificité de 95 %, une sensibilité de 100 % et une valeur prédictive positive de 94 % et de différencier le cancer de la prostate de l'hyperplasie bénigne (27). D'autres exemples pouvaient être donnés dans le cancer colorectal (28), le cancer du sein (29-31), l'hépatocarcinome (32), le mélanome (33) et le cancer du pancréas (34).

Cependant, plusieurs groupes de recherche utilisant les mêmes approches expérimentales et travaillant sur la même pathologie n'ont pas mis en évidence les mêmes pics permettant de discriminer le tissu normal du tissu pathologique et ont proposé des marqueurs ou des profils protéiques différents (35, 36). Diamandis (37) a mis en exergue de nombreux paramètres qui affectent la reproductibilité de cette technique : la variabilité dans le recueil des échantillons, leur traitement, le type de conservation, la diversité des groupes de patients, leur statut hormonal, leurs habitudes alimentaires, l'usage de médicament, ainsi que les biais statistiques ou la variation de la stabilité des spectromètres de masse et/ou des puces à protéines. De même, la complexité des outils informatiques augmente la probabilité d'interprétation erronée et de résultats non reproductibles.

Par ailleurs, la sensibilité de la détection n'atteint pas les concentrations inférieures à 1 mg/mL alors que les marqueurs tumoraux usuels sont à des concentrations beaucoup plus faibles et ne sont donc pas suffisamment détectés. De sorte que jusqu'à présent, dans les quelques cas où la caractérisation des marqueurs a été effectuée, les protéines identifiées correspondent à des protéines majoritaires du sérum. Il s'agit notamment de l'apolipoprotéine A, des formes tronquées de la transthyrétine, de la chaîne lourde de l'inhibiteur de l'alphatrypsine et de la sous-unité alpha de l'haptoglobine dans le cancer de l'ovaire (36, 38), des alpha 1 et alpha 2 défensine dans le cancer de la vessie (39) ou encore d'une protéine de liaison à la vitamine D dans le cancer de la prostate (40). Il reste à savoir si ces marqueurs ont leur expression altérée spécifiquement en réponse à la prolifération tumorale ou de manière non spécifique en réponse à des épiphénomènes dépendant de la tumeur.

Les biomarqueurs identifiés jusqu'ici par SELDI-TOF s'avèrent pour la plupart être des protéines majoritaires de la réponse inflammatoire produites par l'environnement péri-tumoral ou par les cellules immunitaires plutôt que par la tumeur elle-même (35, 41, 42). Ces protéines sont néanmoins potentiellement instructives s'il est démontré qu'il s'agit de fragments protéolytiques dérivés des protéines inflammatoires de la tumeur, spécifiques de chaque tumeur en fonction de son contenu enzymatique (42).

L'observation par Liotta *et al.* — certains des marqueurs identifiés par SELDI-TOF sont des formes dégradées de protéines sériques — fait avancer l'hypothèse que l'abondance de ces marqueurs clivés est le reflet direct d'événements pathologiques induits par le microenvironnement tumoral (43). Des études récentes montrent que l'équilibre entre des protéases et leurs inhibiteurs cellulaires est modifié dans le sérum et le tissu des patients en réponse à la prolifération tumorale (44). Différents membres des familles de protéases comme les métallo-protéases ou les kallikréines plasmatiques et tissulaires ont leur expression augmentée ou diminuée dans certains cancers (45-47). Ces modifications pourraient avoir un retentissement direct sur la capacité des protéases à cliver des protéines sériques et à générer ainsi une signature moléculaire spécifique. Malgré la bonne sensibilité de la technique SELDI-TOF, la détection de ces protéines minoritaires est encore délicate car elle est masquée par la présence de protéines majoritaires telles que l'albumine et les immunoglobulines (37). La détection de la fraction du sérum représentant ces protéines minoritaires est un défi technologique nécessaire à surmonter, afin d'assurer le développement du diagnostic des formes précoces des cancers.

Pour conclure, une signature moléculaire des cancers du sein avancés paraît réalisable mais n'est pas encore réalisée. L'association des informations provenant de la recherche en génomique fonctionnelle et en protéomique devrait nous permettre d'appréhender les voies métaboliques utilisées par la cellule tumorale et de mieux choisir la thérapie ciblée la plus efficace.

Références

1. Al-Hajj M, Clarke MF (2004) Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23: 7274-82
2. Smalley M, Ashworth A (2003) Stem cells and breast cancer: a field in transit. *Nature Rev Cancer* 3: 832-44
3. Janicke F, Prechtel A, Thomssen C *et al.* (2001) Randomized adjuvant chemotherapy trial in high risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plas-

- minogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 93: 913-20
4. Raetz EA, Moos PJ (2004) Impact of microarray technology in clinical oncology. *Cancer Invest* 22: 312-20
 5. Michiels S, Koscielny S, Hill C (2005) Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 365: 488-92
 6. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R *et al.* (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumour subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10869-74
 7. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J *et al.* (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8418-23
 8. Perou CM, Sorlie T, Elsen MB *et al.* (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-52
 9. Sorlie T, Wang Y, Xiao C *et al.* (2006) Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics* 7: 127
 10. Van't Veer LJ, Dal H, Van de Vijver MJ *et al.* (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-6
 11. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ *et al.* (2002) A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347: 1999-2009
 12. Piccart MJ, Loi S, Van't Veer LJ *et al.* (2004) Multicenter external validation study of the Amsterdam 70-gene prognostic signature in node negative untreated breast cancer: are the results still outperforming the clinical-pathological criteria? *Breast Cancer Res Treat* 88 (Suppl 1): abstract 38
 13. Wang Y, Klijn J, Zhang Y *et al.* (2004) Pathway analysis and validation of the 76-gene prognostic signature in lymph node negative primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 88 (Suppl 1) S20: abstract 103
 14. Shekouh AR, Thompson CC, Prime W *et al.* (2003) Application of laser capture microdissection combined with two-dimensional electrophoresis for the discovery of differentially regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 3: 1988-2001
 15. Wulfskuhle JD, Sgroi DC, Krutzsch H *et al.* (2002) Proteomics of human breast ductal carcinoma *in situ*. *Cancer Res* 62: 6740-9
 16. Somiari RI, Somiari S, Russell S, Shriver CD (2005) Proteomics of breast carcinoma. *J Chromatography B* 815: 215-25
 17. Somiari RI, Sullivan A, Russell S *et al.* (2003) High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics* 3: 1863-73
 18. Nakagawa T, Huang SK, Martinez SR *et al.* (2006) Proteomic profiling of primary breast cancer predicts axillary lymph node metastasis. *Cancer Res* 66: 11825-30
 19. Dowling P, Meleady P, Dowd A *et al.* (2007) Proteomic analysis of isolated membrane fractions from superinvasive cancer cells. *Biochem Biophys Acta* 1774: 93-101
 20. Hathout Y, Gehrman ML, Chertov A, Fenselau C (2004) Proteomic phenotyping: metastatic and invasive breast cancer. *Cancer Letters* 210: 245-53
 21. Kreulin P, Urquidí V, Lubman DM, Goodison S (2004) Identification of metastasis-associated proteins in a human tumor metastasis model using the mass-mapping technique. *Proteomics* 4: 2754-2765.
 22. Andre S, Kojima S, Yamazaki N *et al.* (1999) Galectins-1 and -3 and their ligands in tumor biology. Non-uniform properties in cell-surface presentation and modulation of

- adhesion to matrix glycoproteins for various tumor cell lines, in biodistribution of free and liposome-bound galectins and in their expression by breast and colorectal carcinomas with/without metastatic propensity. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 461-74
23. Ouatras T, Salerno M, Palmieri D, Steeg PS (2003) Basic and translational advances in cancer metastasis: Nm23. *J Bioenerg Biomembr* 35: 73-9
 24. Wang W, Eddy R, Condeelis J (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nature Rev Cancer* 7: 429-40
 25. Zhang D, Tai LK, Wong LL *et al.* (2005) Proteomic study reveals that proteins involved in metabolism and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu positive breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 4: 1686-96
 26. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA *et al.* (2002) Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359: 572-7
 27. Petricoin EF 3rd, Ornstein DK, Paweletz CP *et al.* (2002) Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 1576-8
 28. Chen YD, Zheng S, Yu JK, Hu X (2004) Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population. *Clin Cancer Res* 10: 8380-5
 29. Vlahou A, Laronga C, Wilson L *et al.* (2003) A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer. *Clin Breast Cancer* 4: 203-9
 30. Becker S, Cazares LH, Watson P *et al.* (2004) Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) differentiation of serum protein profiles of BRCA-1 and sporadic breast cancer. *Ann Surg Oncol* 11: 907-14
 31. Pusztai L, Gregory BW, Baggerly KA *et al.* (2004) Pharmacoproteomic analysis of prechemotherapy and postchemotherapy plasma samples from patients receiving neoadjuvant or adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer* 100: 1814-22
 32. Paradis V, Degos F, Dargere D *et al.* (2004) Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 41: 40-7
 33. Wilson LL, Tran L, Morton DL, Hoon DS (2004) Detection of differentially expressed proteins in early-stage melanoma patients using SELDI-TOF mass spectrometry. *Ann NY Acad Sci* 1022: 317-22
 34. Koopmann J, Zhang Z, White N *et al.* (2004) Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 10: 860-8
 35. Diamandis EP (2004) Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. *Mol Cell Proteomics* 3: 367-78
 36. Zhang Z, Bast RC Jr., Yu Y *et al.* (2004) Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 64: 5882-90
 37. Diamandis EP (2004) Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: drawing attention to potential problems. *J Natl Cancer Inst* 96: 353-6
 38. Ye B, Cramer DW, Skates SJ *et al.* (2003) Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 9: 2904-11
 39. Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S *et al.* (2001) Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 158: 1491-502

40. Hlavaty JJ, Partin AW, Shue MJ *et al.* (2003) Identification and preliminary clinical evaluation of a 50.8-kDa serum marker for prostate cancer. *Urology* 61: 1261-5
42. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-7
43. Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E (2003) Clinical proteomics: written in blood. *Nature* 425: 905
44. Mehta AI, Ross S, Lowenthal MS *et al.* (2003) Biomarker amplification by serum carrier protein binding. *Dis Markers* 19: 1-10
44. Diamandis EP (2002) Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. *Lancet* 360: 170 (author reply 170-1)
46. Matrisian LM, Sledge GW Jr., Mohla S (2003) Extracellular proteolysis and cancer: meeting summary and future directions. *Cancer Res* 63: 6105-9
45. Mok SC, Chao J, Skates S *et al.* (2001) Prostasin, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst* 93: 1458-64
47. Yousef GM, Diamandis EP (2001) The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 22: 184-204

Déclaration de conflits d'intérêts

Auteur	Aucune situation d'intérêt particulière	Participation financière dans le capital d'une entreprise	Contrat consultant, interventions ponctuelles, expertises, conférences, formation	Activité donnant lieu à versement au budget d'une structure	Autres liens Sans rémunération	Sans réponse
Thierry Maudelonde	X					