

Biomarqueurs de résistance à l'hormonothérapie dans le traitement des cancers du sein

Dr P de Cremoux

Hôpital Saint Louis / Université Paris-Diderot, Paris

XIV^{èmes} journées de Sénologie Interactive 2011

Journées du centre des Maladies du Sein de l'Hôpital Saint Louis

Définition de l'hormono-sensibilité

- Le récepteur des estrogènes est la cible principale des traitements hormonaux des cancers du sein
- Hormono-sensibilité / hormonodépendance = présence de récepteurs des estrogènes (RE) ± récepteurs de progestérone (RP)
- Environ 70% des cancers du sein sont hormono-dépendants

Mécanismes de résistance à l'hormonothérapie

- Hormonothérapie des cancers RH+ : résistance *de novo* ou acquise
- Meilleure connaissance des mécanismes potentiels de résistance

 *Optimisation des stratégies thérapeutique*

Principaux mécanismes de résistance à l'hormonothérapie

1. *Altération de la signalisation du RE*

- Perte du RE α (méthylation)
- Variant tronqué RE α (ER α 36)
- Phosphorylation du RE α
- ER β (ER β 2, ER β 5..)
- Coactivateurs (AIB1, NCOA1 , NCOA3..)

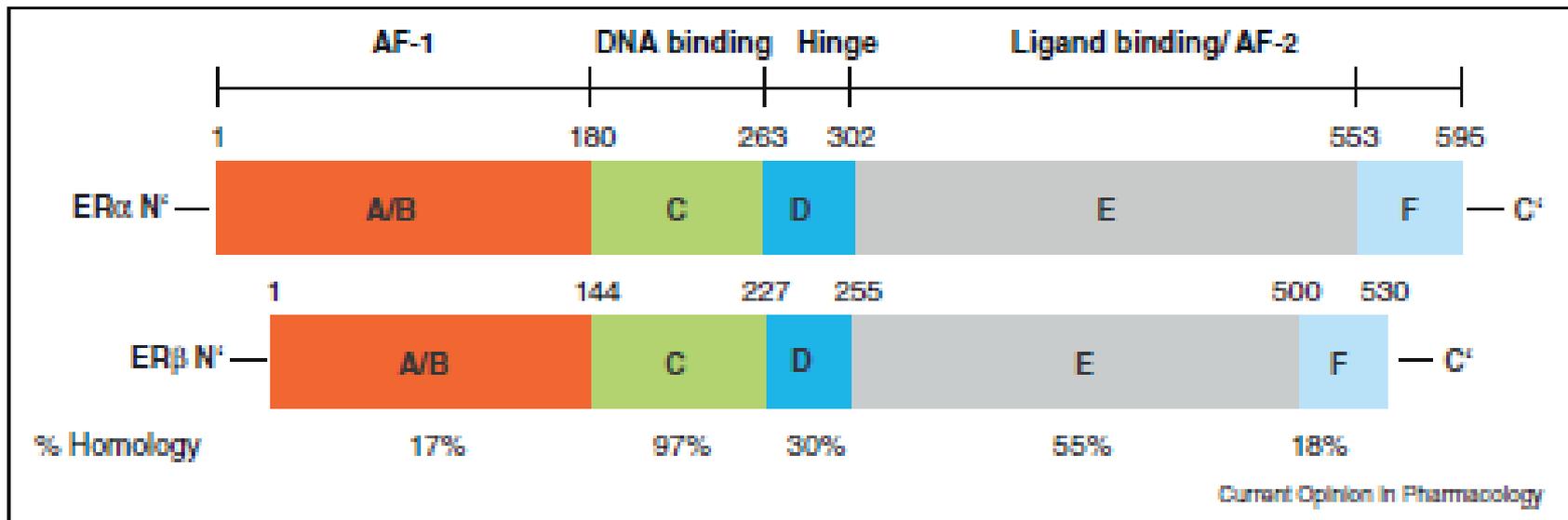
2. *Up-régulation des voies de signalisation des récepteurs de facteur de croissance*

- Surexpression EGFR, amplification HER2
- Surexpression IGF1R, FGFR
- Activation MAPK, Erk, Akt, src
- ...

3. *Altération du métabolisme des médicaments*

1. Altération de la signalisation du RE

Structure, fonction du RE



Activation de la transcription

Liaison à l'ADN

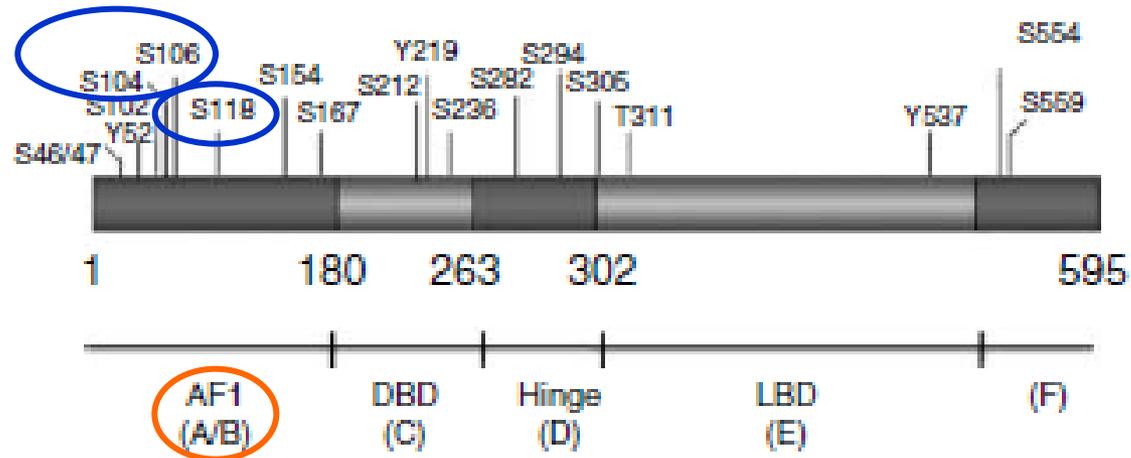
Liaison de l'hormone, dimérisation, Activation de la transcription

Altération de la signalisation RE

- *Perte du RE α (méthylation)*
 - Acquisition de modifications épigénétiques du RE α et des promoteurs de ses gènes cibles
 - Résultante = absence de protéine
 - Réversible / cible potentielle de traitement
- *Variants du RE α*
 - Mutations du RE α observé dans moins de 10% des tumeurs résistantes au traitement
 - Variant tronqué RE α 36 (-AF1 & AF2 + DBD & LBD)
 - localisé dans le cytoplasme et la membrane des cellules RE α + et -.
 - Fonctionne comme un dominant négatif du RE α 66
 - Surexpression du RE α 66 et du RE α 36 : moins bonne réponse au tam
 - Variant tronqué RE α 46 (-AF1 + DBD & LBD)
 - Expression diminuée dans les tumeurs tam résistantes

Altération de la signalisation RE

- *Phosphorylation du RE α*



- *EGF et IGF , MAPK , (E2) phosphorylation S118 ligand -indépendant*
- *Turn over protéine (S118)*
- *Diminution de l'activité transcriptionnelle (combinaison d'altération)*

Sites de phosphorylation du RE α

Table 1 Phosphorylation sites identified experimentally in human estrogen receptor α

Site of phosphorylation	Domain	Method of identification	Substrate source	References	Breast tumors <i>in vivo</i>
Ser46/47	A/B	1	TT/COS1	Williams <i>et al.</i> (2009)	ND
Tyr52	A/B	3	TT/HEK	He <i>et al.</i> (2010)	ND
Ser102	A/B	2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009)	ND
Ser104	A/B	2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009)	Y
Ser106	A/B	2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009)	Y
Ser118	A/B	2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009)	Y
Ser154	A/B	2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009)	ND
Ser167	A/B	2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009)	Y
Ser212	C	2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009)	ND
Tyr219	C	3	TT/HEK	He <i>et al.</i> (2010)	ND
Ser236	C	2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009)	ND
Ser282	D	1	TT/COS1	Williams <i>et al.</i> (2009)	Y
Ser294	D	1, 2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009) and Williams <i>et al.</i> (2009)	Y
Ser305	D	3	TT/HeLa	Wang <i>et al.</i> (2002)	Y
Thr311	E	1, 3	TT/Ishikawa	Lee & Bai (2002)	Y
Tyr537	E	1	Sf9rER/MCF7	Arnold <i>et al.</i> (1995a)	ND
Ser554	F	2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009)	ND
Ser559	F	1, 2	MCF7	Atsriku <i>et al.</i> (2009) and Williams <i>et al.</i> (2009)	Y

1, [32 P]H $_3$ PO $_4$ labeling; Edman degradation; phosphoamino acid analysis; phosphopeptide mapping. 2, mass spectroscopy. 3, site-directed mutagenesis; *in vitro* kinase assay; western blotting. ND, not determined; TT, transient transfection; Y, yes. Adapted from Murphy *et al.* (2006) with permission.

Altération de la signalisation RE

- *Deux récepteurs distincts : $RE\alpha$ et $RE\beta$:*
 - *seul le $RE\alpha$ est utilisé en diagnostic dans les cancers du sein (IHC et RT-qPCR)*
 - *les deux récepteurs sont quantifiés en LBA; peuvent être spécifiquement quantifiés en RT-qPCR*
- *Rôle du $RE\beta$ ($ER\beta1-ER\beta5..$) encore mal défini :*
 - *lié à un bas **grade tumoral** :*
 - *expression plus forte dans le tissu mammaire normal*
 - *Perte d'expression de $RE\beta$ dans de nombreuses tumeurs du sein*
 - ***Suggère un rôle du $RE\beta$ dans le maintien du phénotype bénin?***
 - ***Rôle $ER\beta$ dans la résistance ?***
 - *$ER\beta$ / $ER\alpha$ et prolifération*
 - *Surexpression $ER\beta1$ / $ER\beta2$ -cx?*

Altération de la signalisation RE

- *Interaction facteurs de transcription*

- AP1
- SP1
- NF κ B

⇒ *Activation de la transcription de facteurs de prolifération*

- *Corégulateurs (AIB1, NCOA1 , NCOA3..)*

- Surexpression ou phosphorylation de co-activateurs du RE α (AIB1)
- Diminution de l'expression du co-represseurs du RE α (NCoR)

⇒ *Activation ou diminution de l'inhibition de la transcription de gènes dépendants des estrogènes*

Altération de la signalisation RE

Conclusions 1

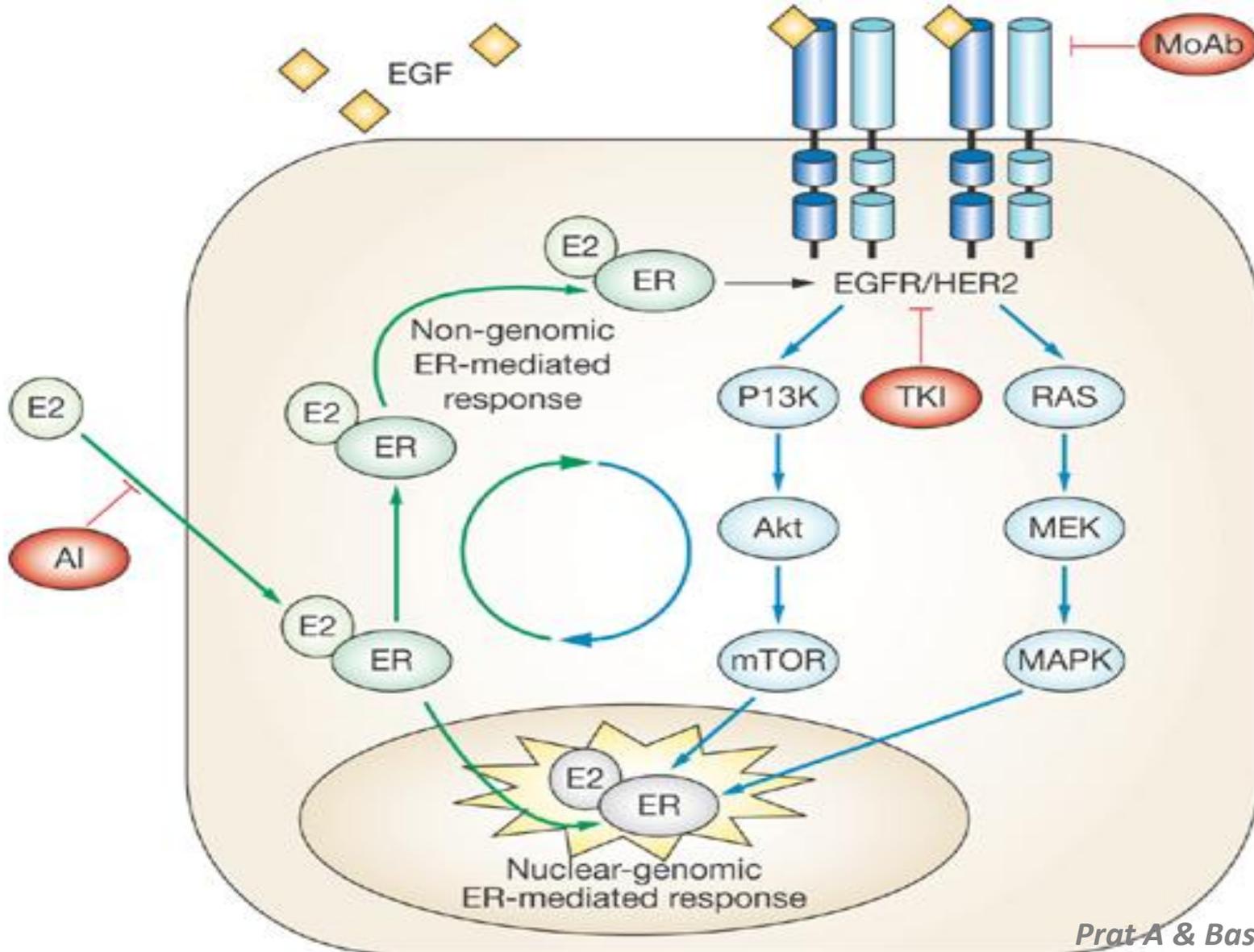
- Les cancers du sein RE+ sont hormono-dépendants
- Cette réponse n'est pas constante et varie au fil du temps.

2. Up-régulation des voies de signalisation des récepteurs de facteur de croissance

Interaction entre les voies RE et RFC « bidirectionnelle »

- Surexpression EGFR, amplification HER2
- Surexpression IGF1R, FGFR
- Activation MAPK, Erk, Akt, src...

Récepteurs hormonaux / récepteurs de facteurs de croissance



Expression HER2 et RH dans les cancers du sein

Relation inverse entre RH et HER2

HER2	Total	ER+	ER-	PR+
Négatif	3083 (84.35%)	2410 (78.17%)	673 (21.83%)	1638 (53.13%)
Positif	572 (15.65%)	281 (49%)	291 (50.9%)	139 (24.3%)

Environ la moitié des cancers qui surexpriment HER2 expriment des RH

Expression HER2 et RH dans les cancers du sein

	<i>RE</i>			
<i>HER2</i>	négatif	faible	Positif	total
Positif	<u>63 (68%)</u>	<i>17 (27%)</i>	51 (9%)	131 (16%)
Négatif	133 (32%)	47 (73%)	<u>502 (91%)</u>	682 (84%)
	196	64	563	813

Données pré-cliniques : lignées résistantes aux antiestrogènes

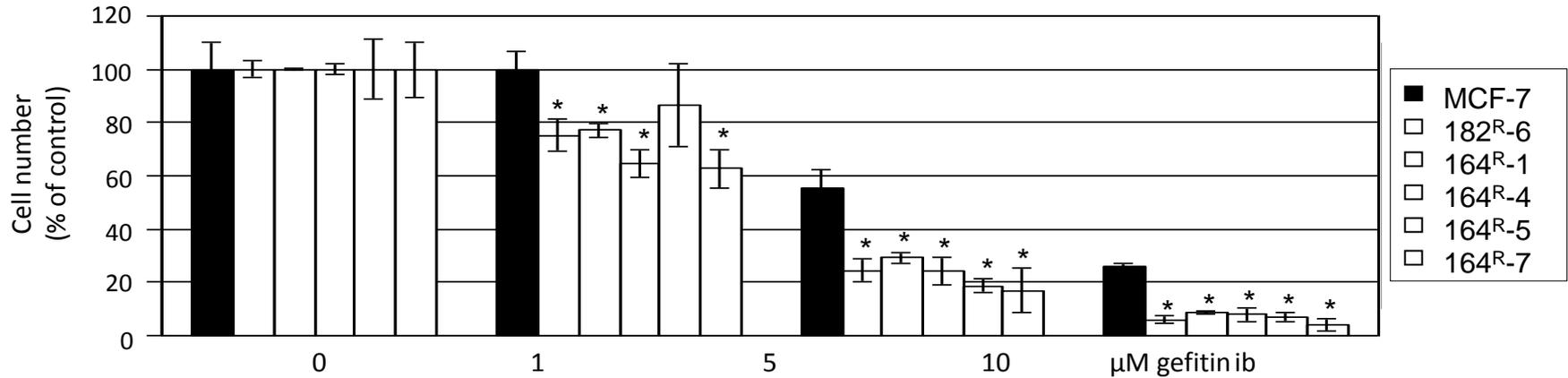
	MCF-7/SO.5 control	MCF-7/TAM ^R -1	MCF-7/164 ^R -5	MCF-7/182 ^R -6	MCF-7/182 ^R -7
EGFR	Low level	Increase (9 fold)	Increase (6 fold)	Increase (33 fold)	Increase (6 fold)
ErbB-2	++	NC	NC	NC	NC
ErbB-3	+ / ++	NC	NC	Increase (2 fold)	Increase (2 fold)
ErbB-4	+ / ++	Decrease (3.4 fold)	Decrease (4.8 fold)	Decrease (6.3 fold)	Decrease (29 fold)

NC : No Change

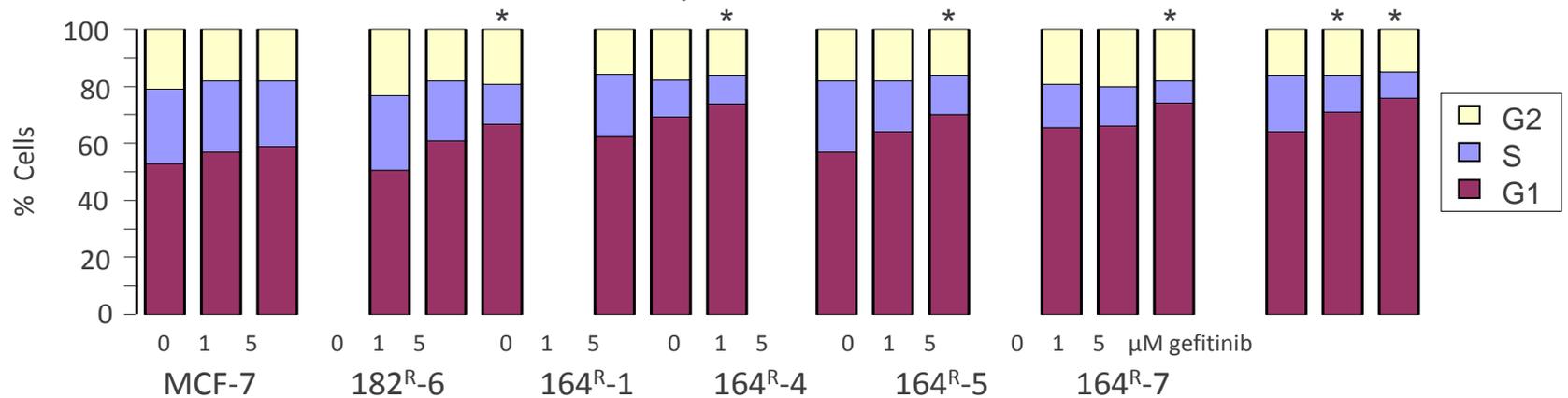
Low level means that the Ct is just above of the limit of sensitivity of detection

Functional analysis - blockade EGFR (Gefitinib)

Growth assay



Cell cycle distribution

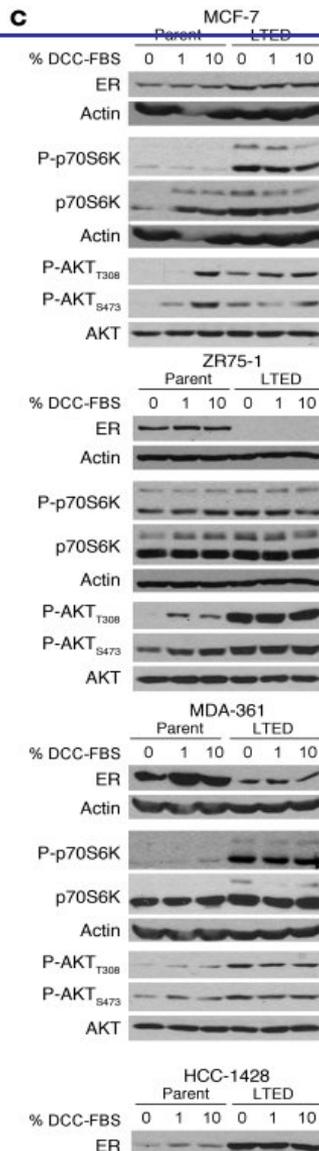
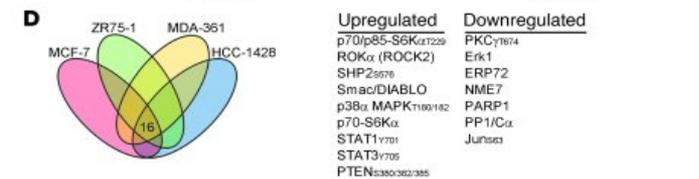
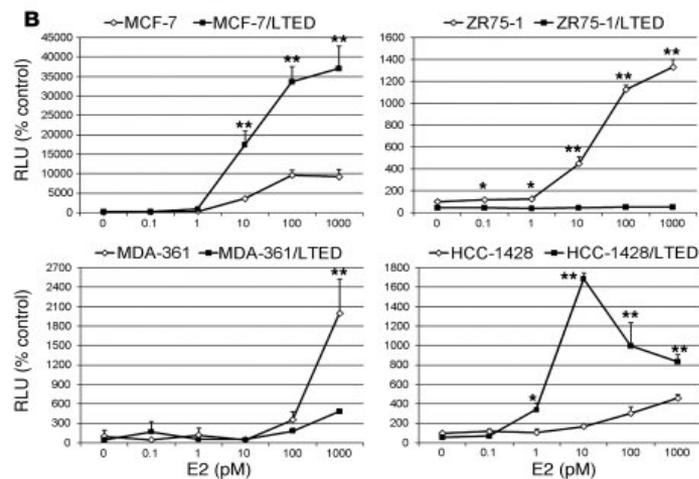
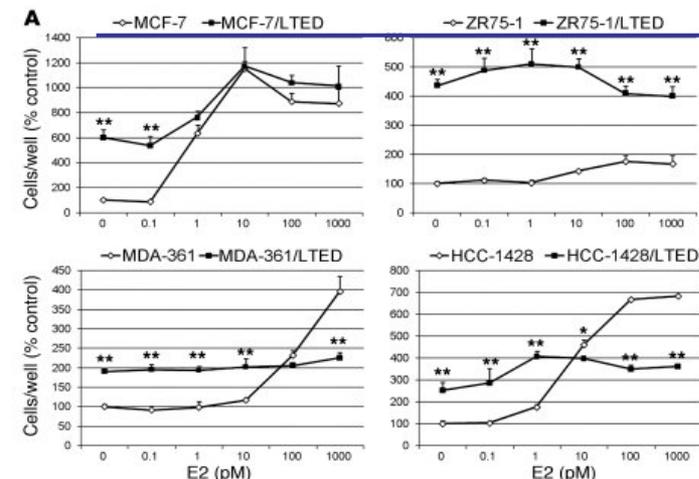


Gefitinib more strongly inhibits growth and cell cycle progression of resistant cells

Conclusions 1

- Lignées résistantes au fulvestrant
activation des voies des RFC et Akt
- Les lignées résistantes au fulvestrant
répondent au blocage de l'EGFR (gefitinib)
de Erk (U0126) et ATB α HER3

Modèle de lignée humaine de cancer du sein résistance à la privation estrogénique (LTED)



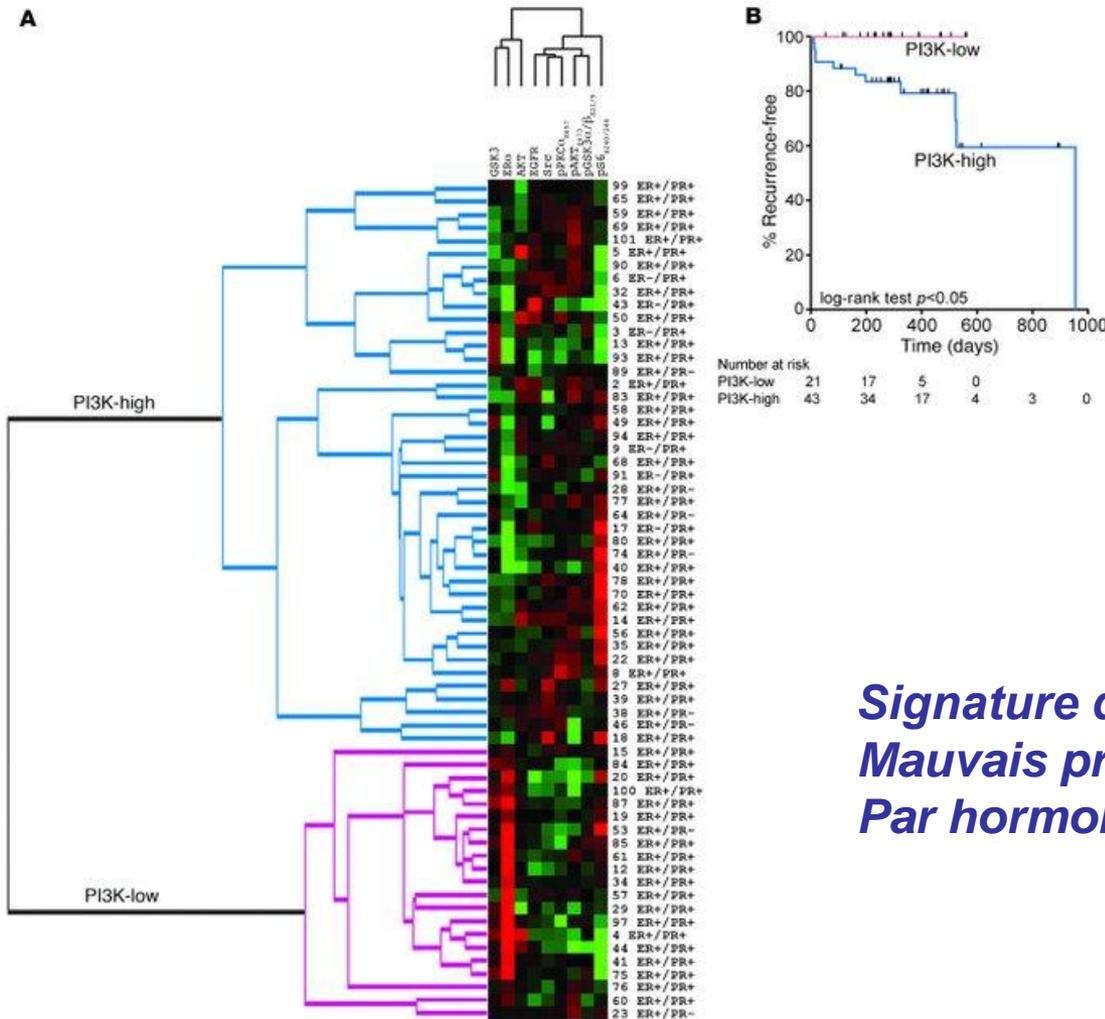
MCF7, MDA-361, ZR75-1, HCC-1428
- Lignées humaines de cancer du sein ER+ :
- Lignées LTED

*Déprivation estrogénique :
Activation de la voie PI3K /Akt*

- Augmentation de
- Phosphorylation PS6 kinase
- Phosphorylation Akt
substrats de mTor
- Régulation variable ER

*Inhibition voie PI3K inhibe
la prolifération cellulaire
E2-indépendante*

Modèle de lignée humaine de cancer du sein résistance à la privation estrogénique (LTED)



**Signature d'activation PI3K prédictive
Mauvais pronostic tumeurs traitées
Par hormonothérapie adjuvante**

Clinical Evidence for Co-Targeting Growth Factor Receptors in ER+ MBC

Trial	Regimen	Population	No. of patients	Median PFS, mo	
				Endocrine therapy alone	Endocrine therapy + anti-ErbB
TAnDEM ¹ Phase III	Anastrozole +/- trastuzumab	HER2+	208	2.4 *	4.8 *
Osborne et al² Randomized, placebo- controlled phase II	Tamoxifen +/- gefitinib	ITT	206[†]	8.8	10.9
		HER2+ subset	37	5.8	6.7
Cristofanilli et al³ Randomized, placebo- controlled phase II	Anastrozole +/- gefitinib	ITT	93	8.2	14.5
<p><i>*Increased slightly in exploratory analysis of centrally confirmed ER status, 3.8 vs 5.6 mo.</i></p> <p><i>[†]Stratum 1 of trial defined as never receiving tamoxifen or completed adjuvant tamoxifen > 1 year prior.</i></p>					

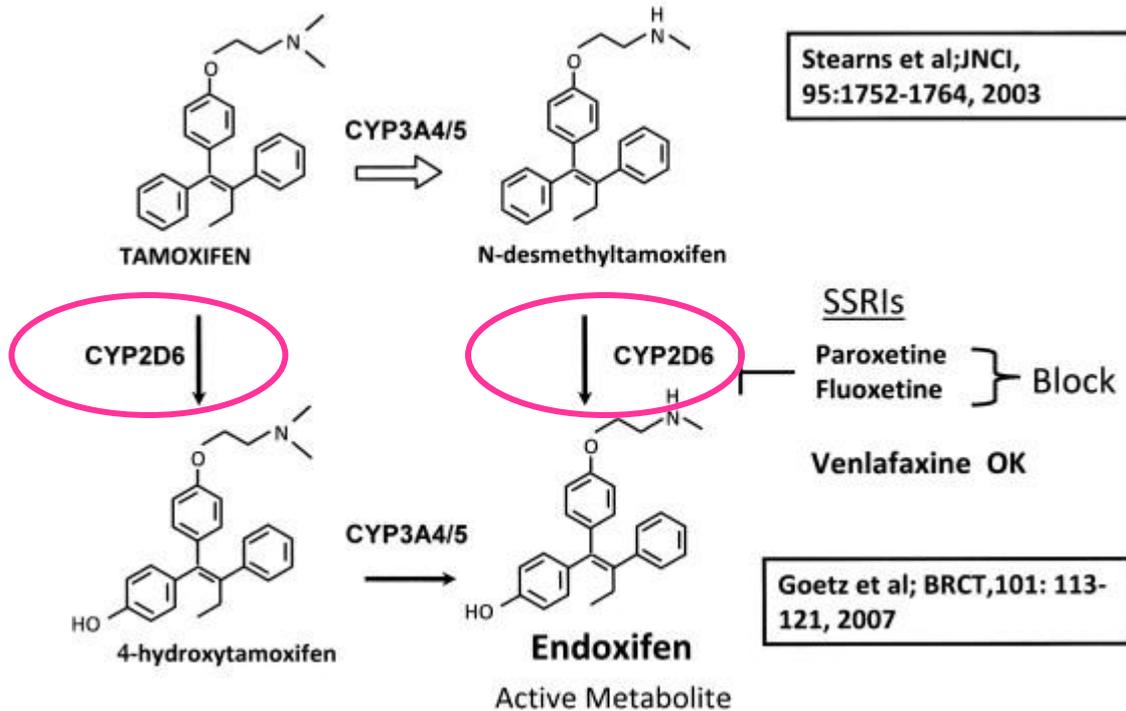
¹Mackey J, et al. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;100. Abstract 3; ²Osborne K, et al. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;106. Abstract 2067; ³Cristofanilli M, et al. *J Clin Oncol.* 2008;26(No 15S). Abstract 1012.

Résumé

- Rôle central du RE comme cible des traitements hormonaux des cancers du sein Central role of
- Interactions entre RE et RFC et leurs voies de signalisation
- Validation de l'efficacité d'un double blocage dans les modèles précliniques
- Résultats cliniques d'associations à confirmer

3. Altération du métabolisme des médicaments

Foie



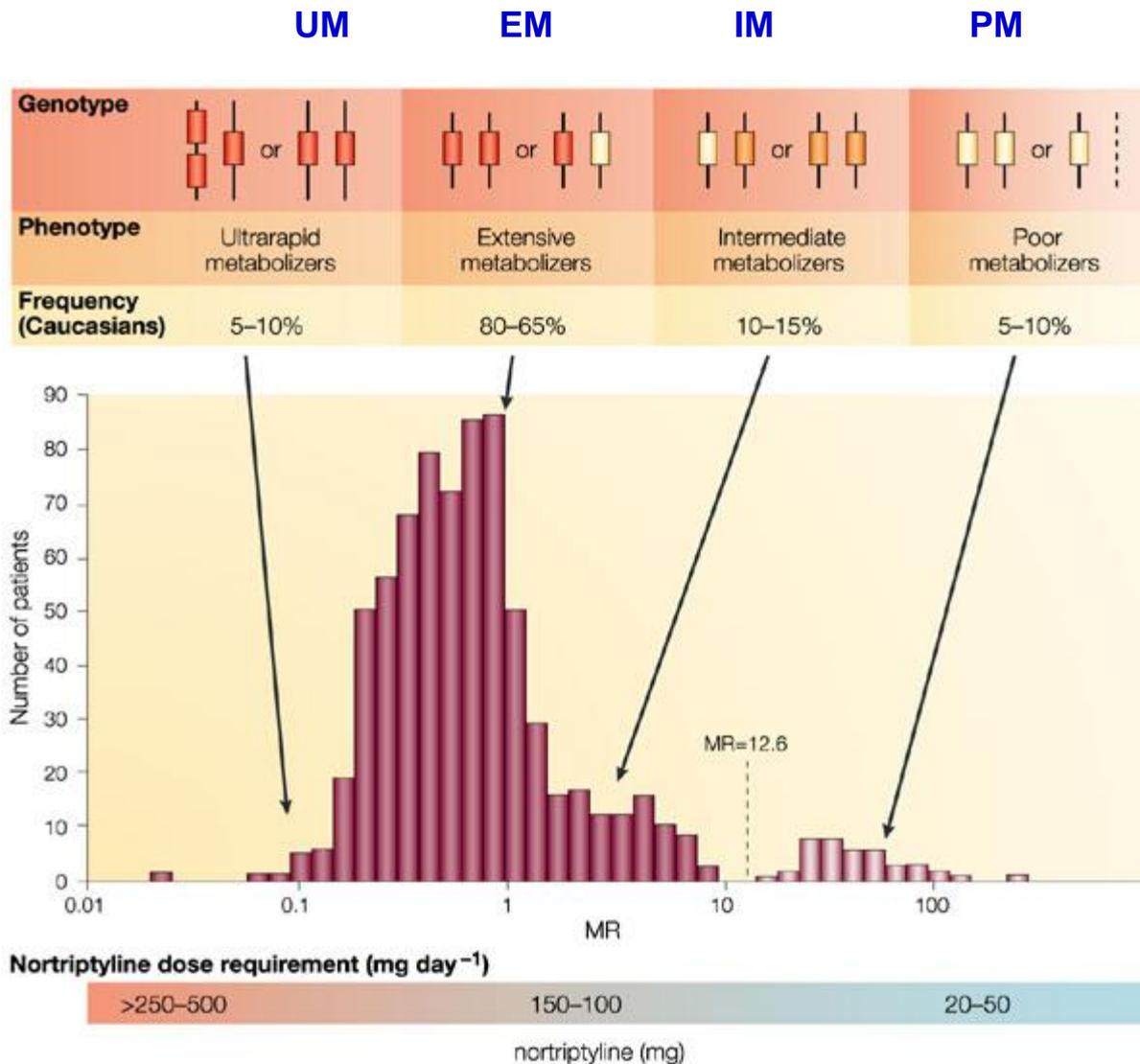
Cytochrome 2D6

- Protéine exprimée dans le foie, métabolise 25% des médicaments (chr 22q13.1).
- Fonction absente chez 7-10% caucasiens
- CYP2D6 métabolise :
 - Antipsychotiques
 - Anti-arythmiques
 - B-bloquants
 - Antidépresseurs
 - Codéine
 - tamoxifène
- CYP2D6 est *inhibé* par:
 - Paroxétine (Deroxat et génériques)
 - Fluoxétine (Prozac et génériques)

Variants CYP2D6

- Plus de 80 variants alléliques différents décrits pour CYP2D6
- Résultant en 4 phénotypes distincts en fonction de leur activité enzymatique
 - Faible ou nulle (« poor » PM)
 - Métaboliseur intermédiaires (IM)
 - Extensif ou (normal) métaboliseur (EM)
 - Ultra-métaboliseurs (UM)

Variants CYP2D6 (2)

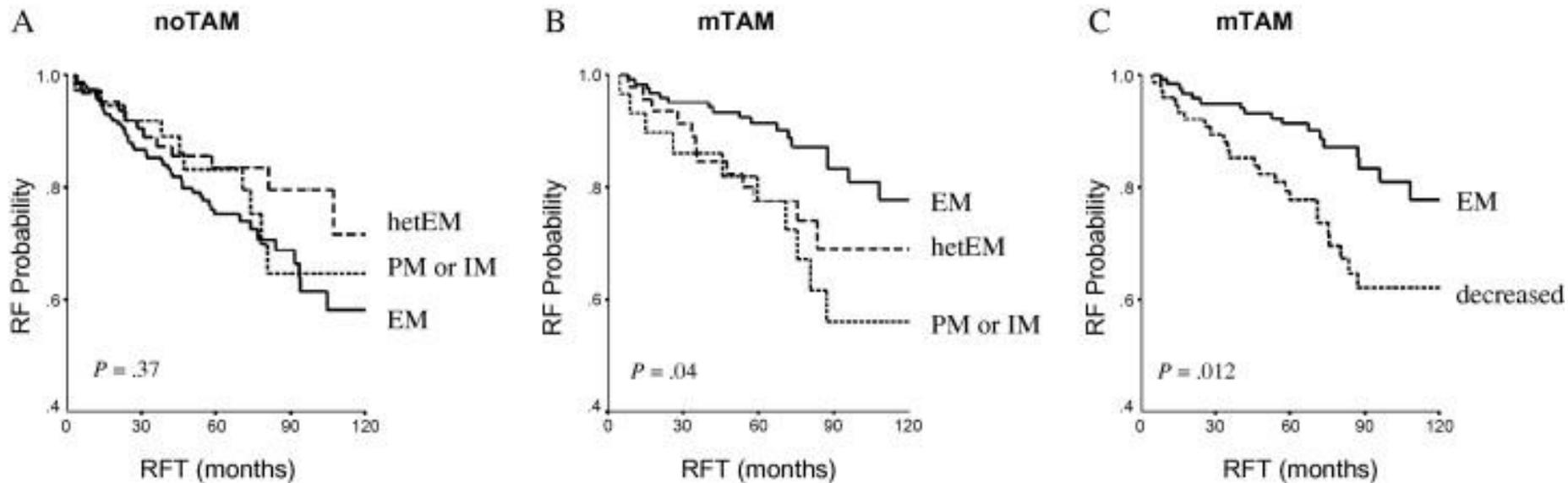


Variants CYP2D6 *(4 phénotypes distincts)*

CYP2D6 allèles	Allèles	Activité enzyme	Abréviation
*1, *2, *33, *35	Normal ou wt	Normale	EM
*3, *4, *5, *8, *11, *16, *18, *21, *36, *38, *40, *42, *44, *56, *62 ou délétion gène	« Nulls »	0 protéine, ou activité négligeable ou nulle	PM
*9, *10, *17, *29, *41, *59	Activité réduite	diminuée	IM
*22, *28, *30, *32, *34, *37, *39, *43, *45, *55	NC	NC	Non applicable
Allèles dupliqués			
*1xN, *2xN, *35xN *10xN, *17xN, *29xN, *41xN	Multiplication d'allèles normaux Multiplication d'allèles d'activité réduite	Augmentée Diminuée	UM IM
*4xN, *6xN, *36xN	<u>Multiplication d'allèles nuls</u>	0 ou négligeable	PM
*43xN, *45xN	Multiplication d'allèles d'activité NC	NC	Non applicable

PM/PM = PM ; IM/IM ou IM/PM = IM; PM/EM ou EM/EM = EM; ampli CYP2D6 = UM Hoskins et al, 2009

Relapse free time (RFT) / CYP2D6 phenotypes



no Tam: Patients not treated by tamoxifen

mTam: Patients treated with adjuvant tamoxifen

Synthèse

1) Etudes en faveur du rôle CYP2D6

- Goetz (2005/2007) Phase III, 256 ptes Post méno, ER+, Tam adjuvant PM/PM (CYP2D6*4 et 6) PM/PM RFS et DFS diminuée. Effet inhibiteurs CYP2D6
- Schroth (2007) 486 pts, post méno, Tam adjuvant vs no Tam EM/EM & EM/IM vs EM/PM, PM/PM, IM/IM
- Bilj (2009) 108 pts, Tam adjuvant IM & PM vs EM RFS . O effer si no Tam

2) Etudes contradictoires

- Wegman (2005) 226 pts, EM vs PM
- Nowell (2005) 337 ptes, Tam adjuvant post méno ER+ PM vs EM (CYP2D6*/*1 vs CYP2D6*1/*4 & CYP2D6*4/*4)
- ATAC et BIG1-98



PHRC en cours

Conclusions et perspectives

- Les cancers du sein RE+ sont hormono-dépendants
- Cette réponse n'est pas constante et varie au fil du temps.
 - » **Adaptation** des cellules (prolifération) / résistance au traitement
 - » Il n'existe pas de mécanisme univoque de **résistance** à l'hormonothérapie,
- Le RE est le marqueur prédictif le plus important dans les cancers du sein, mais non suffisant: marqueurs prédictifs complémentaires?