

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Caractérisation du Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF)  
comme antigène tumoral candidat des cancers invasifs du sein**

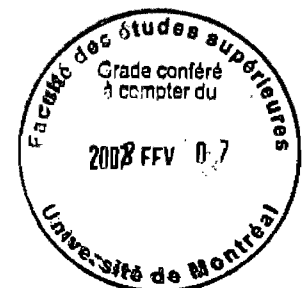
Par  
Simon Turcotte

Programme Sciences biomédicales  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc. en Sciences biomédicales

Août 2007

© Simon Turcotte, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Caractérisation du Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF)  
comme antigène tumoral candidat des cancers invasifs du sein**

Présenté par :  
Simon Turcotte

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Isabelle Royal, Ph.D.  
Président rapporteur

Réjean Lapointe, Ph.D.  
Directeur de recherche

Pierre Dubé, M.D., M.Sc.  
Membre du Jury

## Résumé

Les stratégies immunothérapeutiques qui ciblent les antigènes tumoraux (AT) présentés à la surface cellulaire par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) ont démontré des effets cliniques encourageants pour le traitement des cancers. L'objectif général de ce projet de maîtrise est de déterminer si le Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) serait un AT candidat pour les cancers invasifs du sein.

Nous démontrons par technique de RT-PCR en temps réel que PDEF est transcrit à des niveaux appréciables dans environ 75 % des 86 échantillons cliniques de cancer du sein testés, et qu'il est peu ou pas détectable dans les organes vitaux. Nous observons aussi que le niveau d'expression de PDEF pourrait avoir une valeur pronostique, puisque la surexpression est associée à un risque accru de dissémination du cancer primaire aux ganglions de l'aisselle. Des essais de reconnaissance de PDEF, réalisés à partir d'un système de culture des lymphocytes de patientes opérées pour un cancer du sein, ont aussi permis d'identifier 3 peptides de PDEF, restreints pour HLA-A\*0201, les plus susceptibles d'être reconnus par les lymphocytes et de déclencher une réponse cytotoxique spécifique.

Ces premiers résultats de caractérisation de PDEF comme AT devraient inciter à poursuivre les efforts de validation de ses séquences les plus immunogéniques. Les données à venir, qui portent sur l'expression protéique, détermineront si PDEF pourra être considéré dans l'élaboration de stratégies immunothérapeutiques contre le cancer du sein.

**Mots clés**

Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF)

Cancer invasif du sein

Antigène tumoral

Immunogénicité anti-tumorale spécifique

Immunothérapie

Marqueur moléculaire

Facteur pronostic

Profil d'expression

## Summary

Cancer immunotherapy strategies targeting tumor antigens (TA) presented by the major histocompatibility complex (MHC) at the surface of cancer cells have led to promising results in cancer treatment. The main objective of this work is to determine if Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) could become a TA candidate for invasive breast cancer.

We demonstrate, by real-time RT-PCR, that PDEF expression is substantial in about 75% of the 86 breast cancer clinical specimens tested, whereas it is not, or weakly detected, in vital organs. PDEF also shows a potential use as a prognostic factor, since its overexpression in primary breast cancer appears to be an independent risk factor for regional cancer dissemination to axillary lymph nodes. Results obtained from PDEF recognition assays by culturing lymphocytes taken from breast cancer patients, permitted the identification of the 3 most immunogenic HLA-A\*0201 restricted PDEF peptides

These preliminary data on PDEF characterization as a candidate TA for invasive breast cancer should encourage the validation of its most immunogenic sequences. PDEF protein expression remains to be further documented before considering PDEF in the elaboration of future breast cancer immunotherapeutic strategies.

**Key words**

Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF)

Invasive breast cancer

Tumor antigen

Specific anti-tumoral immunogenicity

Immunotherapy

Molecular marker

Prognostic factor

Expression profile

## Table des matières

### *Pages liminaires*

Résumé .....	i
Mots clés.....	ii
Summary .....	iii
Key words.....	iv
Table des matières .....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux .....	ix
Liste des sigles et abréviations .....	x
Avant-propos et remerciements.....	xiii

## SECTION 1. INTRODUCTION

<i>Objectif général et structure du mémoire.....</i>	1
<b>1.1 Cancer du sein .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Épidémiologie et limites des approches thérapeutiques actuelles ...	1
1.1.2 Classification clinico-pathologique des carcinomes mammaires ....	3
1.1.3 Classification moléculaire des carcinomes mammaires .....	6
- Gènes impliqués dans la carcinogenèse.....	6
- Profils d'expression géniques.....	9
1.1.4 Conclusion : besoin de nouvelles approches thérapeutiques .....	10
<b>1.2 Immunothérapie anti-tumorale .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Définitions et justifications.....	11
1.2.2 Immunothérapie ciblant les antigènes tumoraux .....	12
- Interaction entre antigènes tumoraux et lymphocytes .....	12
- L'antigène tumoral « idéal ».....	13
- Classification des AT connus du cancer du sein .....	15
1.2.3 Efficacité et défis des stratégies immunothérapeutiques .....	19
- Vaccination anti-tumorale .....	19
- Transfert adoptif de lymphocytes autologues.....	20
- Immunogénicité des tumeurs solides.....	22
1.2.4 Conclusion : défis de l'immunothérapie.....	24



<b>1.3</b>	<b>Identification de nouveaux antigènes du cancer du sein.....</b>	<b>25</b>
1.3.1	Stratégies d'identification de nouveaux antigènes tumoraux.....	26
1.3.2	Le Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) comme antigène candidat.....	26
	- Hypothèse du projet de maîtrise.....	26
	- Facteurs de transcription Ets et cancer du sein.....	26
	- Prostate-derived Ets transcription factor.....	29
<b>1.4</b>	<b>Objectifs du projet de maîtrise.....</b>	<b>32</b>

## SECTION 2. MANUSCRIT

<b>PDEF overexpression is associated with nodal metastasis and hormone receptor positivity in invasive breast cancer .....</b>	<b>33</b>
Abstract.....	34
Introduction.....	35
Materials and methods.....	37
Results.....	41
Discussion.....	45
Figures and Tables.....	49

## SECTION 3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

<b>3.1</b>	<b>Immunogénicité des peptides de PDEF testés avec les lymphocytes de quatre patientes.....</b>	<b>55</b>
3.1.1	Justification.....	55
3.1.2	Matériels et méthodes.....	56
3.1.3	Résultats .....	61
	- Sélection bioinformatique de 15 peptides de PDEF restreints pour HLA-A*0201.....	61
	- Immunogénicité des 15 peptides de PDEF testés chez 4 patientes HLA-A*02 .....	61

<b>3.2</b>	<b>Mise au point d'une micro-matrice de tissus cancéreux et de lignées cellulaires en vue de caractériser l'expression protéique de PDEF .....</b>	<b>68</b>
3.2.1	Justification.....	68
3.2.2	Matériels et méthodes.....	69
3.2.3	Résultats .....	74
	- Validation de la technique, détection du récepteurs ER- $\alpha$ .....	74
	- Détection de PDEF .....	74
SECTION 4. DISCUSSION, PERSPECTIVES et CONCLUSIONS		
<b>4.1</b>	<b>Objectifs poursuivis, sommaire et critique des résultats obtenus .....</b>	<b>78</b>
4.1.1	Expression de PDEF dans le cancer du sein .....	78
4.1.2	Expression de PDEF dans les tissus normaux .....	81
4.1.3	Immunogénicité de PDEF .....	82
4.1.4	Implication de PDEF dans la transformation oncogénique.....	84
<b>4.2</b>	<b>Perspectives et conclusions.....</b>	<b>86</b>
4.2.1	PDEF pourrait-il être un marqueur tumoral d'intérêt clinique ? ....	86
4.2.2	PDEF est-il impliqué dans les mécanismes de résistance aux thérapies anti-oestrogéniques ?.....	90
4.2.3	Conclusions générales .....	96
	BIBLIOGRAPHIE .....	97

## Liste des figures

### SECTION 1. INTRODUCTION

Figure 1	Taux d'incidence et de mortalité par cancer, femmes canadiennes, 1977-2006 .....	4
Figure 2	Présentation antigénique classique par les cellules cancéreuses et présentatrices d'antigènes.....	14
Figure 3	Modèle théorique de participation des facteurs de transcription Ets à la progression du cancer du sein.....	30

### SECTION 2. MANUSCRIT

Figure 1 <sup>m</sup>	PDEF expression in breast cancer cell lines.....	49
Figure 2 <sup>m</sup>	PDEF expression in normal tissues .....	50
Figure 3 <sup>m</sup>	PDEF expression in invasive breast carcinoma.....	51
Figure 4 <sup>m</sup>	PDEF and DKK1 differential expression patterns .....	52

### SECTION 3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Figure 4	Protocole de stimulation des lymphocytes avec les peptides de PDEF et épreuves de reconnaissance .....	59
Figure 5	Sélection de 15 peptides de PDEF restreints pour HLA-A*0201 .....	62
Figure 6	Micro-matrice tissulaire et cellulaire, et immunohistochimie.....	71
Figure 7	Détection immunohistochimique de PDEF et de ER dans les lignées cellulaires, les tissus de seins normaux et néoplasiques .....	76

### SECTION 4. DISCUSSION, PERSPECTIVES et CONCLUSIONS

Figure 8	Physiologie des récepteurs de l'œstrogène.....	92
----------	--	----

## Liste des tableaux

### SECTION 1. INTRODUCTION

Tableau 1	Classification clinico-pathologique du cancer du sein et modalités thérapeutiques .....	7
Tableau 2	Antigènes tumoraux connus du cancer du sein .....	18
Tableau 3	Expression aberrante de certains facteurs de transcription Ets dans les cancers humains.....	28

### SECTION 2. MANUSCRIT

Table 1 <sup>m</sup>	PDEF expression and clinicopathological factors of 86 invasive breast cancers.....	53
Table 2 <sup>m</sup>	Univariate and multivariate analyses for metastatic nodal involvement in the set of clinical samples tested for PDEF expression .....	54

### SECTION 3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Tableau 4	Lignées lymphocytaires cytotoxiques et spécifiques aux peptides de PDEF.....	65
Tableau 5	Immunogénicité des peptides de PDEF, représentée en fonction des lignées lymphocytaires des quatre patientes HLA-A*02 testées .....	66

### SECTION 4. DISCUSSION, PERSPECTIVES et CONCLUSIONS

Tableau 6	Lignes directrices résumées de l' <i>American Society of Clinical Oncology</i> pour l'utilisation des marqueurs tumoraux du cancer du sein.....	89
-----------	---	----

**Liste des signes et abréviations**

**a.a.**, acide aminé

**ADNc**, acide désoxyribonucléique complémentaire

**AI**, aromatase inhibitor

**APC**, antigen presenting cells, cellules présentatrices d'antigènes

**AT**, antigène tumoral

**BCG**, bacille Calmette Guérin

**BAGE**, B antigen

**CEA**, carcinoembryonic antigen

**CMH**, complexe majeur d'histocompatibilité

**CSF-1R**, colony-stimulating factor receptor

**E2**, estradiol

**EGFR**, epidermal growth factor receptor

**ELIspot**, enzyme-linked immunospot assay

**ELISA**, enzyme-linked immunosorbent assay

**Ets**, E26 transformation-specific

**Ese**, epithelial-specific Ets

**ER**, estrogen receptor

**GAGE**, G antigen

**Gp100**, glycoprotein 100 kDa

**GM-CSF**, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

**h**, heure

**HER-2/*neu***, human epidermal receptor 2/neurological

**HLA**, human leukocyte antigen

**hTERT**, human telomerase reverse transcriptase

**IDO**, indoleamine 2,3-dioxygenase

**IL**, interleukine

**INF- $\gamma$** , Interféron gamma

**kDa**, kilodalton

**LTc**, lymphocyte T cytotoxique CD8<sup>+</sup>

**LTh**, lymphocyte T helper CD4<sup>+</sup>

**MAPK**, mitogen-activated protein kinases

**MAGE**, melanoma-associated gene

**min**, minute

**MUC1**, mucin 1

**NY-BR-1**, breast cancer antigen NY-BR-1

**NY-ESO-1**, New-York esophageous 1

**PAI-1**, plasminogen activator inhibitor 1

**PBMC**, peripheral-blood mononuclear cells

**PDEF**, prostate-derived Ets transcription factor.

*Autres appellations* : SPDEF, SAM-pointed domain containing Ets transcription factor; bA375E1.3

**PEST motif**, séquence protéique riche en proline, glutamate, sérine et/ou thréonine

**PgR**, progesterone receptor

**PSA**, prostate-specific antigen

**RAG**, recombinase activating gene

**RIP**, rat insulin promotor

**RTK**, receptor tyrosine kinase

**SAM**, sterile alpha motif

**SERM**, selective estrogen receptor modulator

**TGF- $\beta$** , transforming growth factor-Beta

**TIL**, tumor-infiltrating lymphocytes

**TNF- $\alpha$** , tumor necrosis factor alpha

**U**, unité

**uPA**, urokinase plasminogen activator

**$\mu$** , micro

**VIH**, virus de l'immunodéficience humaine

**%**, pourcentage

**°C**, degré Celsius

## **Avant-propos et remerciements**

Ce travail de recherche a été entrepris au milieu de mes études post-doctorales de chirurgie générale à l'Université de Montréal. L'objectif que je poursuivais était d'apprendre le langage de la recherche fondamentale, plus particulièrement dans le domaine de la cancérologie et de l'immunologie des tumeurs solides. À plus long terme, j'ai pensé que cette démarche me permettrait de collaborer, comme chirurgien oncologue, avec les chercheurs fundamentalistes, à la recherche dans le domaine de l'immunothérapie du cancer.

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, D<sup>r</sup> Réjean Lapointe, de m'avoir accueilli, guidé, donné l'opportunité de poursuivre mes objectifs et démontré ce qu'était la persévérance. Je remercie aussi le D<sup>r</sup> Gilles Beauchamp, directeur du Département universitaire de chirurgie, pour le soutien institutionnel.

De nombreux remerciements vont à tous les membres du laboratoire qui m'ont initié patiemment aux techniques de laboratoire : Diane Beauseigle, Marie-Andrée Forget, Jessica Godin Ethier, Urszula Krzemien, Stéphanie Lepage et Sandy Pelletier. D'autres remerciements vont aussi aux membres du laboratoire du D<sup>r</sup> Anne-Marie Mes-Masson, qui m'ont aidé à mettre au point plusieurs expériences, à interpréter les résultats obtenus et à mieux formuler de nouvelles hypothèses de recherche. Finalement, je remercie les D<sup>rs</sup> Louis Gaboury et Francine Jolicoeur d'avoir rendu possible les expériences d'immunohistochimie, à partir de la plateforme d'histologie de l'Institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC) de l'Université de Montréal.



## SECTION 1. INTRODUCTION

### *Objectif général et structure du mémoire*

L'objectif général de ce travail est de déterminer si le Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) peut se qualifier comme antigène tumoral d'intérêt pour l'immunothérapie des cancers invasifs du sein. La SECTION 1 est une mise en contexte et une recension de la littérature pertinente. La SECTION 2 est une présentation, sous forme d'article, du profil d'expression de PDEF dans les échantillons cliniques de cancer du sein et les tissus normaux. La SECTION 3 rapporte les résultats complémentaires sur l'immunogénicité et sur l'expression protéique de PDEF. Enfin, la SECTION 4 comporte une discussion sur les résultats obtenus, une ouverture sur quelques pistes qui pourraient être poursuivies, ainsi que les conclusions générales.

### **1.1 Cancer du sein**

#### 1.1.1 Épidémiologie et limites des approches thérapeutiques actuelles

##### *Épidémiologie et progrès*

Chez les femmes nord-américaines, le cancer le plus souvent diagnostiqué est celui du sein. On estime que le cancer non-héréditaire du sein touche environ une femme sur neuf. L'Institut national du cancer du Canada chiffrait à 22 200 le nombre de nouveaux cas de cancer du sein en 2006, dont 6000 femmes au Québec [1]. La hausse graduelle des cancers du sein diagnostiqués entre 1977 et 1992 est en partie expliquée par la mise en place des programmes de dépistage par mammographie, dans les années 1980, pour les femmes asymptomatiques âgées de 50 à 69 ans [2]. Le nombre de nouveaux cas diagnostiqués s'est cependant stabilisé depuis 1993, à environ 106 par 100 000 (Figure 1A). Durant cette période, le taux de mortalité due au cancer du sein, qui stagnait à 30 par 100 000 personnes entre 1950 et 1990, a diminué à

environ 23 par 100 000 au Canada en 2006. Ceci représentait 5 300 décès attribuables au cancer du sein en 2006, dont 1 400 au Québec (Figure 1B). Cette diminution annuelle de 2,7% a aussi été observée aux Etats-Unis et au Royaume-Uni [3]. On l'attribue au dépistage précoce et à la plus grande efficacité de la thérapie multimodale, qui combine chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, hormono-thérapie et, plus récemment, l'utilisation d'anticorps humanisés. La survie des femmes atteintes d'un cancer du sein s'est donc améliorée ou a été prolongée.

### *Limites des approches thérapeutiques actuelles*

Pourtant, la survie des patientes dépend encore beaucoup de l'agressivité du cancer au moment du diagnostic. Si un cancer de petite taille envahit néanmoins les ganglions de l'aisselle (ganglions axillaires), la survie des femmes, à dix ans, est significativement compromise [4]. Il demeure encore difficile de prévenir les récurrences et de traiter la maladie au stade métastatique. La biologie du cancer explique en partie ces apparents échecs. La moitié des cancers invasifs diagnostiqués grâce aux programmes de dépistage canadiens en 2000 avaient un diamètre supérieur à 1,5 cm. Or on estime qu'à 1 cm de diamètre, une tumeur contient déjà  $10^9$  cellules cancéreuses, et qu'elle se développe depuis environ 8 ans si le temps de division cellulaire moyen est de 100 jours, bien qu'il varie entre 30 et 900 jours. Peu importe la taille de la tumeur initiale, il semble que des sous-clones de cellules cancéreuses, qui possèdent les attributs nécessaires pour migrer et survivre à distance, peuvent engager rapidement le processus métastatique.

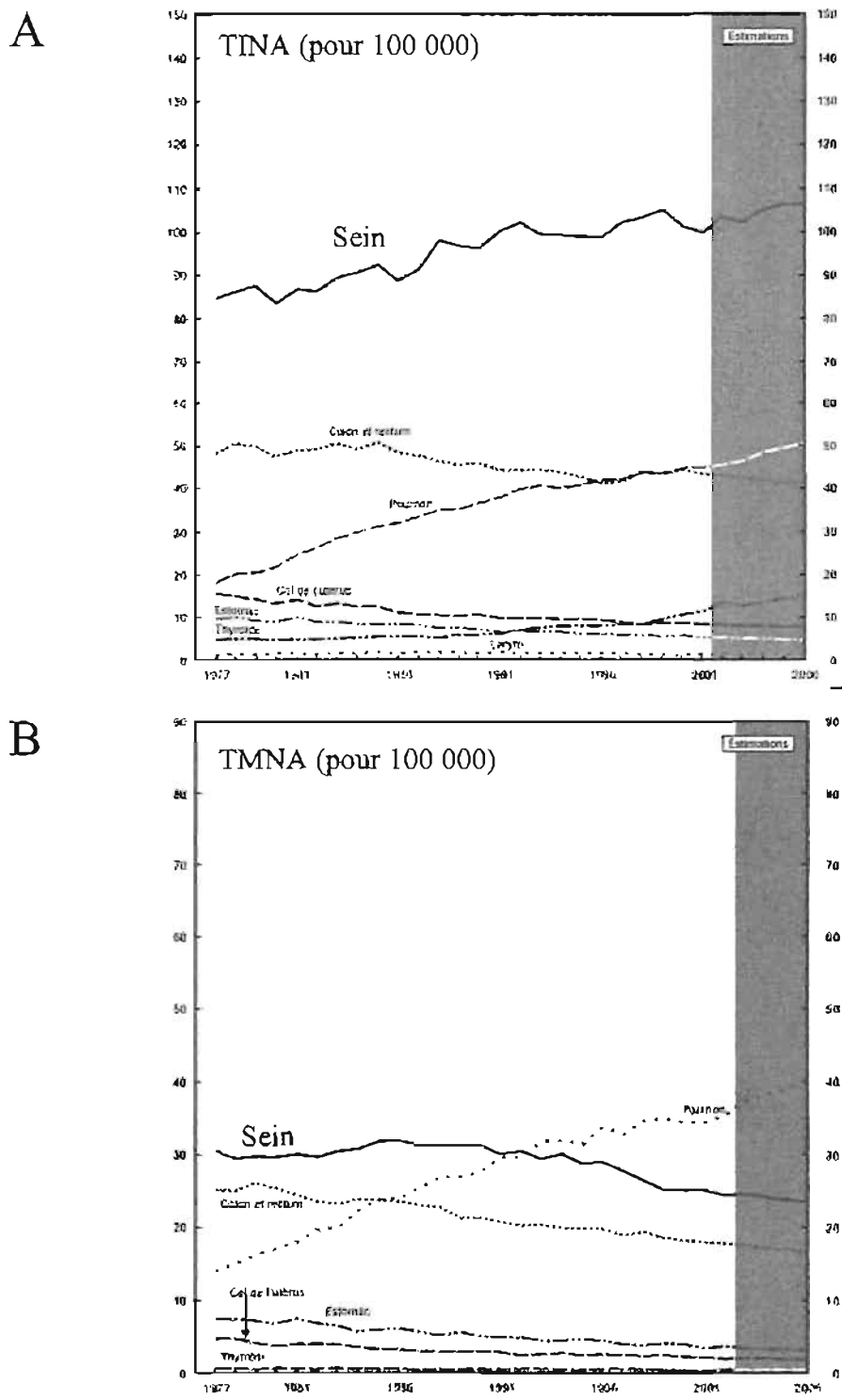
Dans ces situations, la chirurgie seule est insuffisante comme modalité thérapeutique. Les chimiothérapies peuvent prolonger la vie dont la qualité est acceptable aux yeux des patientes, d'environ 7 à 10 mois avant la récurrence et l'éventuel décès [5]. Ces traitements sont toutefois offerts sans qu'il n'existe de facteurs prédictifs de la réponse thérapeutique, à l'exception possible de la surexpression du récepteur Human epidermal receptor-2/neurological (HER-2/*neu*), qui est associée à une meilleure réponse aux anthracyclines [6]. La mise au point d'un anticorps contre

HER-2/*neu* (Trastuzumab, Herceptin®) est actuellement la seule thérapie ciblée qui a amélioré la survie globale des patientes en plus de retarder la récurrence, cependant qu'elle ne s'applique qu'à environ 25% des cancers du sein. D'autre part, bien que les thérapies anti-œstrogéniques jouent un rôle essentiel dans la prévention des récurrences et le ralentissement de la progression des cancers disséminés, différents mécanismes de résistance se développent invariablement dans toutes les tumeurs métastatiques [7]. En dépit des progrès récents, environ 2 femmes sur 10 ne guériront pas d'un cancer du sein.

### 1.1.2 Classification clinico-pathologique des carcinomes mammaires

La classification classique des carcinomes mammaires est basée sur leurs caractéristiques cliniques et pathologiques. On appelle carcinome invasif une tumeur dont les cellules néoplasiques malignes détruisent l'architecture générale de la glande mammaire, et infiltrent la membrane basale sur laquelle reposait l'épithélium normal. Lorsque les cellules néoplasiques ne traversent pas la membrane basale, le carcinome n'est pas appelé « invasif », mais plutôt *in situ*; nous ne traiterons pas des carcinomes *in situ* dans ce travail.

Les transformations néoplasiques ont lieu dans les cellules épithéliales des canaux de la glande (carcinomes canaux infiltrants) dans 85% des cancers du sein, et forment un nodule compact. Une minorité des carcinomes provient des lobules (carcinomes lobulaires infiltrants) et prolifère de manière plus diffuse, en pelure d'oignon, autour des canaux, ce qui rend leur détection plus difficile. Alors qu'environ 7% des cellules mammaires épithéliales normales expriment des récepteurs œstrogène (ER) [8], la majorité des carcinomes canaux et lobulaires invasifs surexpriment ER, qui a un effet trophique pour la tumeur. L'expression du récepteur de la progestérone (PR) dépend du ER fonctionnel. La quantité ou la probabilité que les récepteurs hormonaux soient exprimés par la tumeur augmentent en fonction de l'âge; 90% des femmes ménopausées contre environ 60% des femmes pré-ménopausées



**Figure 1 Taux d'incidence et de mortalité par cancer, femmes canadiennes, 1977-2006**

**Légende :** **A** Taux d'incidence normalisés selon l'âge (TINA). **B** Taux de mortalité normalisé selon l'âge (TMNA). Les taux sont corrigés en fonction de la répartition par âge de la population canadienne de 1991. Les données réelles sont disponibles jusqu'en 2003, après quoi il s'agit d'estimés [1].

des tumeurs ER<sup>+</sup> et PR<sup>+</sup>. Par ailleurs, le stroma, tissu de soutien de la glande mammaire, donne rarement lieu à des transformations néoplasiques malignes (tumeurs phyllodes malignes, sarcome, etc.), et ces tumeurs n'expriment pas de récepteurs hormonaux.

En considérant 1) la taille (T, envahissement local) de la tumeur primaire, 2) le nombre de ganglions axillaires (N, envahissement régional des ganglions de l'aisselle) envahis par des cellules cancéreuses et 3) la présence de métastases (M, envahissement systémique) dans les organes distants, les tumeurs peuvent être classées d'après la survie attendue des patientes [9]. Cette classification nommée « TNM », proposée par l'*American Joint Committee on Cancer*, est actuellement largement utilisée dans les études cliniques internationales [10].

Le nombre de ganglions axillaires atteints est le plus important facteur prédictif de la dissémination systémique et de la survie des patientes [11]. Moins de 30% des patientes vivront 5 ans si elles présentent plus de 10 ganglions atteints, tandis qu'environ 60% seront en vie si 1 à 3 ganglions étaient atteints au moment du diagnostic [12]. La chirurgie seule est insuffisante comme traitement pour ces patientes, qui peuvent bénéficier des chimiothérapies dites adjuvantes. D'autres critères clinico-pathologiques sont aussi considérés pour établir le bénéfice de survie attendu suite aux chimiothérapies adjuvantes (Tableau 1) [13]. Il s'agit de 1) l'âge des patientes, 2) le degré de différenciation des tumeurs observé au microscope (Grade I à III), 3) l'envahissement tumoral de la microcirculation lymphatique et vasculaire, 4) l'absence d'expression de récepteurs hormonaux de l'oestrogène et de la progestérone et 5) la surexpression du gène du récepteur HER-2/*neu*. Plusieurs outils informatiques se sont développés au cours des dernières années pour aider les cliniciens à calculer, à partir des données épidémiologiques, le bénéfice des traitements adjuvants. Ceci permet aussi aux patientes de participer plus activement aux prises de décisions thérapeutiques [14].

La classification clinico-pathologique standardisée des carcinomes mammaires a permis d'évaluer l'effet des thérapies, de comparer les résultats d'études internationales regroupant un grand nombre de patientes, et d'établir les meilleures pratiques médicales. Malgré tout, les tumeurs regroupées d'après leurs caractéristiques clinico-pathologiques sont biologiquement hétérogènes et leur agressivité est difficile à prédire. Les efforts de recherche se tournent donc vers des classifications moléculaires du cancer du sein, basées sur l'expression génique et protéique des tumeurs, dans l'espoir de mieux caractériser l'agressivité d'une tumeur donnée et de développer des thérapies mieux ciblées et personnalisées.

### 1.1.3 Classification moléculaire des carcinomes mammaires

#### *Gènes impliqués dans la carcinogenèse*

L'étude du génotype des cellules de carcinomes mammaires révèle que l'expression de plusieurs gènes est qualitativement ou quantitativement altérée. Les mutations des gènes suppresseurs BRCA1 et BRCA2, identifiées il y a environ 12 ans dans les cancers héréditaires du sein, concernent moins de 10% de tous les cancers du sein et sont rarement retrouvées dans les cancers sporadiques [15]. L'expression altérée d'autres gènes a été documentée dans les tumeurs sporadiques. Nous présentons ici brièvement les plus étudiés, qui comprennent Cycline D1, Ras, Myc, Wnt1, p53 et HER-2/*neu*.

La Cycline D1 joue un rôle clé dans le développement normal de la glande mammaire et est surexprimée dans environ 50% des carcinomes mammaires [16]. Dans le cycle cellulaire, les cyclines D facilitent le passage de la phase G1 à la phase S. Dans les modèles murins, un déficit de fonction de la cycline D1 protège du développement du cancer en présence de surexpression de Ras et de HER-2/*neu*, mais est insuffisante pour contrer l'effet d'une surexpression de Myc ou de la voie canonique de Wnt1 [17]. L'oncogène Ras est peu ou pas exprimé dans le sein normal,

	Cancers précoces		Cancers avancés		Cancers disséminés
	Faible risque	Haut risque	Opérables	Non-opérables	
<b>Taille (T)</b>	< 1cm <i>Sans critère de mauvais pronostic</i>	≥ 1 cm <i>ou</i> ≥ 0,5 cm avec <i>critères de mauvais pronostic:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Grade III</li> <li>• ER/PR<sup>+</sup></li> <li>• Envahissement microvasculaire</li> <li>• Surexpression de HER-2/neu</li> </ul>	> 2 cm	Fixés à la paroi thoracique	Toute taille
<b>Ganglions (N)</b>	Aucune atteinte		Métastases ganglionnaires		Toute atteinte
<b>Métastases à distance (M)</b>	NON				Poumons, os longs, cerveau, foie
<b>Stades cliniques (AJCC)</b>	Stade I		II et IIIA	IIIB et IIIC	Stade IV
<b>Chirurgie</b>	OUI			NON	
<b>Chimio/radio thérapies</b>	NON	OUI, adjuvantes			OUI, palliatives
<b>Hormonothérapie</b>	Indiquée pour tout cancer qui exprime les récepteurs hormonaux, œstrogène et/ou progestérone				

Les critères cliniques et pathologiques classiques permettent de déterminer quelles patientes bénéficieront d'autres thérapies que l'exérèse chirurgicale. Les stades cliniques de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) sont basés sur la taille de la tumeur primaire (T), l'atteinte ganglionnaire (N) et la présence de métastases à distance, au moment du diagnostic initial (classification TNM). En moyenne, au moins 90% des patientes atteintes d'un cancer de moins de 1 cm de diamètre, sans critère pathologique de mauvais pronostic, seront encore en vie 20 ans plus tard si elles ont été traitées par mastectomie radicale modifiée, ou mastectomie partielle et radiothérapie. Par contre, plus une patiente est jeune et son cancer agressif, plus grands sont les risques de récurrences et moins longue est la survie attendue. Dans ce contexte, les bénéfices de survie gagnés par l'ajout des traitements adjuvants sont significatifs.

ER, récepteur œstrogène; HER-2/neu, human epidermal receptor-2/neurological; PgR, récepteur progestérone.

**Tableau 1 Classification clinico-pathologique du cancer du sein et modalités thérapeutiques**

mais serait surexprimé dans plus de 50% des carcinomes invasifs du sein. Ras jouerait un rôle dans la progression plutôt que dans l'initiation du cancer [18]. Ras serait détectée à de plus hauts niveaux dans les cancers qui envahissent les ganglions axillaires [19].

Ras est sollicité par les récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance tyrosine kinase (RTK). Un grand intérêt a été récemment porté aux niveaux d'expression des RTK, mutés ou non, sur les cellules cancéreuses, qui caractérisent souvent les tumeurs agressives. La surexpression de HER-2/*neu*, dont la structure est homologue à l'Epidermal growth factor receptor (EGFR), a été particulièrement étudiée en cancer du sein. HER-2/*neu*, exprimé dans environ 20 à 30% des cancers du sein, est maintenant reconnu i) comme la marque distincte d'un groupe de tumeurs associé à un mauvais pronostic, ii) comme facteur prédictif de réponses aux anthracyclines, iii) comme cible thérapeutique d'anticorps humanisés et iv) est à l'essai comme antigène tumoral en immunothérapie.

Quant à Myc, une méta-analyse de 29 études, bien que limitée par l'hétérogénéité de ces études, rapporte une amplification de ce gène dans 16% des cancers du sein [20]. Une faible association est notée avec les tumeurs envahissant les ganglions axillaires, mais l'impact sur la survie des patientes n'est pas significatif. Finalement, on retrouve plusieurs mutations du gène p53 dans au moins 20-30% des cancers du sein [21]. Dans une métanalyse de 11 études concernant 2300 patientes, la mutation de p53 était associée à une survie sans récurrence environ 2 fois moins longue, que les ganglions de l'aisselle soient atteints ou non [22].

Même si des associations statistiquement significatives ont souvent été rapportées entre l'expression de ces gènes et des critères clinico-pathologiques de mauvais pronostic, la mesure isolée d'aucun de ces gènes n'est suffisante pour prédire la survie, le risque de récurrence ou la réponse à une chimiothérapie. Les modèles murins supportent l'hypothèse que le degré de malignité d'une cellule dépend de l'accumulation d'erreurs géniques. Afin de prédire l'évolution des cancers précoces du



sein, on cherche actuellement à développer des outils pronostics qui tiendraient compte de l'expression de multiples gènes plutôt que de gènes isolés [23, 24].

### *Profils d'expression génique des cancers du sein*

De nouvelles techniques d'hybridation microscopique de brins d'ADNc sur micro-matrice (DNA microarray), combinées à de puissants outils bioinformatiques de lecture et d'analyse d'une quantité phénoménale d'information, suggèrent qu'il est possible de classifier les tumeurs selon leur génotype et d'en prédire l'histoire naturelle.

Le groupe de Perou et collaborateurs, à partir d'une matrice de 1753 gènes et d'un échantillonnage d'une centaine de cancers invasifs du sein, a proposé l'existence de 4 grands groupes de cancers du sein qui renvoient aux phénotypes histologiques connus, à savoir : 1) les tumeurs d'épithélium luminal ER<sup>+</sup>, associées à une survie de 95% à 5 ans, 2) les tumeurs d'épithélium luminal ER<sup>-</sup>, associées à un moins bon pronostic, avec une survie d'environ 60% à 5 ans, 3) les tumeurs d'épithélium basal, qui n'expriment pas de récepteurs hormonaux (ER<sup>-</sup> et PgR<sup>-</sup>), dont aucune patiente n'avait survécu au-delà de 4 ans, puis 4) les tumeurs qui surexpriment HER-2/*neu* et autres gènes associés, dont le pronostic est assez sombre [25, 26].

L'identification du récepteur de l'œstrogène, en 1974, a rapidement été reconnue comme un facteur pronostic important, tout en conduisant au développement du tamoxifène, un antagoniste compétitif de l'œstrogène. Par ailleurs, le phénotype basal ER<sup>-</sup>, ou myoépithélial, avait déjà été documenté en immunohistochimie, grâce à l'expression caractéristique des kératines 5, 6 et 14. Des études immunohistochimiques ont déjà confirmé que ce phénotype présentait un moins bon pronostic [27]. Les profils génétiques confirment donc en partie les grandes classifications phénotypiques connues. Ils nous poussent par contre à constater que des éléments singuliers comme l'expression des récepteurs stéroïdiens, HER-2/*neu* ou de certaines kératines ne sont pas des caractéristiques isolées; les « signatures géniques » semblent recouvrir un

« comportement » ou « programme » donné, assez constant entre les tumeurs. Ces signatures ouvrent notamment la porte à un raffinement dans la classification du plus grand groupe de tumeurs, d'épithélium luminal ER<sup>+</sup>, en fonction de l'agressivité des tumeurs. Des modèles de prédiction des métastases et de survie développés à partir des signatures géniques semblent plus sensibles et spécifiques que la classification clinicopathologique classique ou l'expression isolée de gènes. À titre d'exemples, ces modèles pourraient permettre d'identifier des tumeurs qui envahissent préférentiellement les ganglions de l'aisselle, mais à faible risque de métastases à distance, ou d'identifier les sites préférentiels de métastases [28, 29].

Bien que les travaux récents améliorent notre compréhension de la biologie du cancer, la place que pourraient prendre les signatures géniques dans les algorithmes cliniques reste à être établie. La reproductibilité des résultats, la contrainte de devoir travailler à partir de matériel frais ou cryopréservé, les bénéfices cliniques réels en termes de survie, ainsi que les coûts, demandent d'être évalués dans des études cliniques prospectives, multicentriques, randomisées et contrôlées.

#### 1.1.4 Conclusion : besoin de nouvelles approches thérapeutiques

Malgré les progrès effectués, plusieurs avenues restent encore à être explorées enfin d'améliorer la survie des femmes atteintes du cancer du sein, notamment en dépistant plus précocement le cancer à l'aide de marqueurs tumoraux, en prévenant l'apparition de récurrences, en évaluant mieux le pronostic individuel des tumeurs, en traitant plus efficacement la maladie métastatique, en développant des thérapies ciblées sur des sous-groupes de tumeurs plus agressives et de nouvelles alternatives thérapeutiques pour les tumeurs réfractaires à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie.

## 1.2 Immunothérapie anti-tumorale

### 1.2.1 Définitions et justifications

L'immunothérapie anti-tumorale repose sur la manipulation du système immunitaire dans le but de détruire les cellules cancéreuses de l'hôte. Une des utilisations cliniques les plus précoces de l'immunothérapie anti-tumorale date du début des années 1970. Il s'agit de l'injection du bacille Calmette Guérin (BCG) dans les vessies de patients atteints de carcinomes de l'épithélium transitionnels [30]. Cette thérapie est encore utilisée pour prévenir les récurrences et a remplacé la résection chirurgicale pour les carcinomes *in situ* [31]. Des travaux récents ont montré que l'internalisation du BCG par l'épithélium transitionnel entraînait une sécrétion importante d'interleukine-12 (IL-12) et une infiltration prédominante de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> helper (LTh), laissant penser qu'une réponse de type Th1 faciliterait l'action des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) CD8<sup>+</sup> [32, 33]. L'inflammation provoquée par le BCG est locale, mais la réponse immunitaire anti-tumorale, dans ce cas, n'est pas nécessairement spécifique aux cellules cancéreuses.

L'immunothérapie ciblant les antigènes tumoraux (AT) cherche à produire une réponse cytotoxique spécifique à un cancer donné. Cette approche thérapeutique pourrait repousser les limites des thérapies actuelles, si on considère ses nombreux avantages théoriques : 1) il s'agirait d'une forme de thérapie ciblée, 2) la fonction mémoire des lymphocytes pourrait produire une réponse anti-tumorale durable, 3) les lymphocytes auraient le potentiel d'infiltrer les tumeurs solides et de circuler par les lymphatiques et les ganglions, voies de dissémination privilégiées des cancers et 4) une immunité anti-tumorale pourrait être utile à tous les stades d'évolution du cancer, pour la prévention chez les personnes les plus à risque de développer un cancer, pour le traitement des tumeurs primaires, pour la prévention des récurrences, ou pour le traitement des cancers disséminés.

## 1.2.2 Immunothérapie ciblant les antigènes tumoraux

### *Interaction entre antigènes tumoraux et lymphocytes*

L'immunothérapie repose sur la possibilité que des cellules cancéreuses soient reconnues de manière spécifique, au niveau moléculaire, par des lymphocytes cytotoxiques. Cette reconnaissance est basée sur l'expression d'AT par la cellule transformée. Les AT sont des bouts de protéines endogènes dégradées appelés peptides qui sont présentés à la surface des cellules cancéreuses par les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Les AT, sous forme de peptides, peuvent être reconnus par les lymphocytes à l'aide de récepteurs uniques au niveau clonal, appelés T-cell receptors (TCR) (Figure 2A). Le protéome des cellules cancéreuses se retrouve ainsi reflété à la surface cellulaire, et entre en dialogue avec le système immunitaire. Comme nous venons de le décrire, l'expression des gènes dans les cellules cancéreuses est altérée, ce qui modifie conséquemment le protéome, et rend possible la présence de peptides issus des AT, présentés à la surface des cellules transformées par les CMH. En effet, les AT résultent de 1) la surexpression de gènes habituellement faiblement transcrits et traduits en protéines dans les cellules normales, 2) l'expression de gènes normalement silencieux au stade de différenciation final des cellules d'un organe donné et 3) l'expression de protéines à partir de gènes mutés.

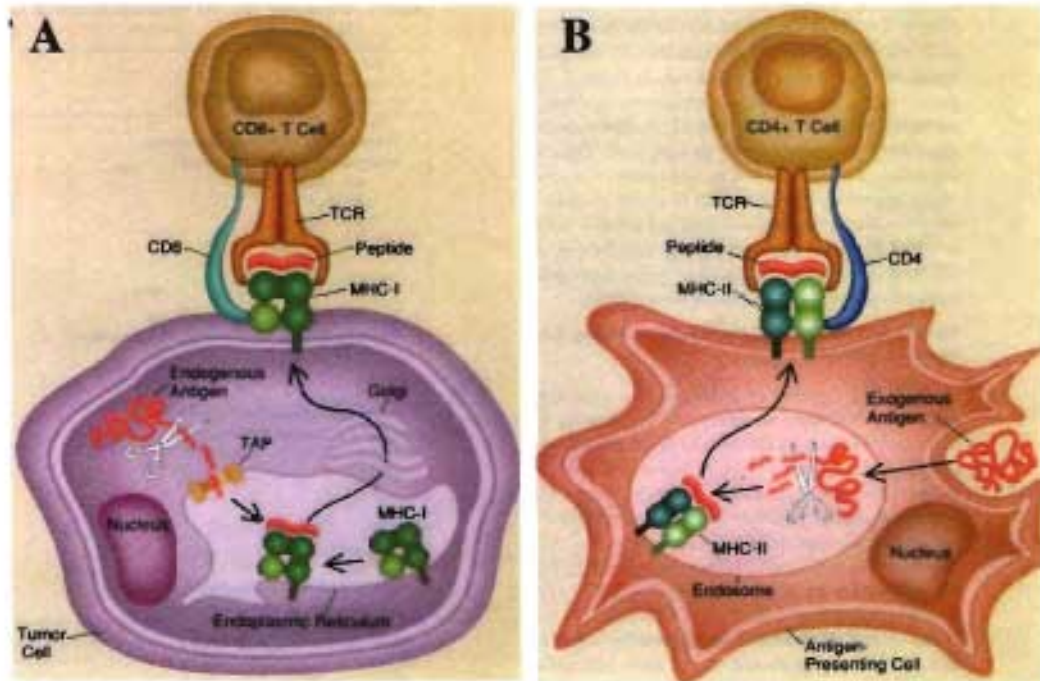
Lorsque les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (LTc) reconnaissent un peptide présenté dans un CMH-I par les cellules cancéreuses, la destruction cytotoxique de la tumeur peut s'effectuer grâce à trois mécanismes : 1) la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles le tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ) et l'IL-2, 2) l'induction de l'apoptose et 3) la lyse cellulaire médiée par perforine et granzyme. Des conditions particulières doivent être réunies pour qu'ait lieu la destruction cytotoxique de la cellule tumorale, comme la présence de molécules de co-simulation, dont le CD40. Les LTc gagnent en efficacité s'ils sont en présence de lymphocytes T helper CD4<sup>+</sup> (LTh) sensibilisés au même AT via le CMH-II (Figure 2B) [34]. Contrairement aux notions classiques, les études récentes démontrent que les

peptides des protéines endogènes, comme les AT, peuvent être présentés non seulement par les CMH-I, mais aussi par les CMH-II. Ceci s'effectue autant par les cellules tumorales que par les cellules présentatrices d'antigènes (APC), dans la tumeur ou dans les organes lymphoïdes secondaires [35].

De nombreux mécanismes de « présentations croisées » et de transferts inter-cellulaires de complexes CMH-peptides font actuellement l'objet d'études [37]. Au centre de ces mécanismes se trouvent les cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes, les cellules dendritiques. Selon leur état d'activation, elles pourraient moduler positivement ou négativement la réponse immunitaire périphérique cytotoxique, et ainsi permettre d'éviter les réactions auto-immunes.

#### *L'antigène tumoral « idéal »*

L'AT « idéal », défini d'après les études d'immunisation anti-tumorale menées depuis environ dix ans, devrait répondre aux critères suivant : 1) être exprimé sélectivement par le cancer d'intérêt et non par les tissus normaux, 2) être apprêté efficacement par les cellules cancéreuses, 3) être densément retrouvé sous forme de complexe CMH-peptide à la surface cellulaire, 4) être présenté par les allèles de CMH les plus fréquemment rencontrés dans la population, comme l'HLA-A\*02, présent chez plus de 50% des caucasiens, et 5) être reconnu par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> avec suffisamment d'affinité pour déclencher une réponse immunitaire cytotoxique [38]. Il est aussi suggéré que de cibler un AT issu d'une protéine impliquée dans l'initiation ou la progression du cancer pourrait accroître l'efficacité de l'immunothérapie.



**Figure 2** Présentation antigénique classique par les cellules cancéreuses et présentatrices d'antigène. (Figures tirées de [36])

**Légende :**

**A. Présentation des protéines endogènes par les molécules du CMH de classe I.**

Les protéines endogènes, qui ont une demi-vie variable, finissent par être dégradées en peptides dans le cytoplasme, par un complexe de protéases. Les peptides cheminent ensuite à l'intérieur du réticulum endoplasmique (RE) en passant par un complexe protéique (TAP) qui agit comme transporteur peptidique. Selon leurs affinités respectives, certains peptides se lient aux molécules du CMH de classe I et seront ensuite acheminé à la surface cellulaire, où ils pourront être reconnus par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques.

**B. Présentation des protéines exogènes par les molécules du CMH de classe II.**

Les protéines exogènes sont internalisées par pinocytose ou phagocytose par plusieurs cellules présentatrices d'antigènes, dont les cellules dendritiques et les macrophages. Les protéines empruntent la voie d'apprêtement endocytaire (endosomes/MIIC), où se produit leur dégradation en peptides. Puisque les molécules CMH de classe II ont déjà cheminé du RE vers les endosomes, les peptides peuvent s'y lier selon leurs affinités respectives et pourront être présentés à la surface et être reconnus par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et d'autres cellules impliquées dans l'immunité humorale.

### *Classification des antigènes tumoraux connus du cancer du sein*

Les AT sont des protéines dont l'immunogénicité de certains peptides a été prouvée expérimentalement. Conceptuellement, leur classification repose sur le type de gènes qui codent pour ces protéines. L'expression de ces gènes a lieu, à des niveaux variables, dans un ou plusieurs types de cancers, et dans les tissus sains. Quatre grandes familles d'AT peuvent être retenues [39]. Nous les présentons et les illustrons à l'aide d'AT connus du cancer du sein, dont certains ont été testés dans des protocoles de vaccination chez l'humain (Tableau 2). Certains AT recourent les gènes dont l'expression est altérée qui ont été présentés précédemment (*Section 1.1.3*).

#### 1) Antigènes des cellules germinales (*cancer-testis antigens, germline antigens*) :

Le plus grand nombre d'AT caractérisés à ce jour appartiennent à ce groupe, qui comprend aussi le premier AT humain documenté, le melanoma-associated gene-1 (MAGE-1) [40]. Les noms *cancer-testis antigens* ou *germline antigens* tiennent du fait que ces AT sont absents des tissus sains matures, à l'exception des spermatozoïdes et parfois du placenta. Normalement silencieux, les gènes sous-jacents sont réactivés dans les cellules cancéreuses [41]. Leurs rôles dans la progression ou l'initiation des tumeurs demeurent mal connus. Les essais d'immunothérapie n'entraînent pas de réactions auto-immunes, puisque les spermatozoïdes n'expriment pas de HLA de classe I ou II (organe immuno-privilegié) [42]. Les AT de cette famille sont exprimés dans plusieurs types de cancers. Des données prospectives tirées de 100 spécimens ont montré que 90% des cancers du sein exprimeraient au moins un AT de cellules germinales, sur un panel de 11 [43]. L'immunogénicité de plusieurs AT de cette famille, pour plusieurs types d'HLA, a été documentée pour le mélanome. Leurs profils d'expression dans d'autres types de cancers suggèrent que certains pourraient être utiles en cancer du sein, notamment le B antigen (BAGE) [44], la famille des G antigens (GAGE) [45], des melanoma antigens

(MAGE) [46], et du New York esophageous 1 (NY-ESO-1) [47]. Aucun essai clinique n'a toutefois été réalisé avec ces peptides en cancer du sein.

2) Antigènes de différenciation (*Differentiation antigens*) :

Ces AT sont exprimés à différents niveaux dans un organe sain et dans la tumeur qui s'y développe. Les niveaux d'expression varient entre le tissu normal et cancéreux et selon le grade de différenciation histologique de la tumeur. Les AT les mieux documentés de cette famille sont liés à la biosynthèse de la mélanine dans les mélanocytes normaux et cancéreux, tels Gp100 et melan-A [48]. Pour le mélanome, ces AT ont été utilisés avec succès en immunothérapie, bien qu'ils aient aussi entraîné des réactions auto-immunes comme le vitiligo, une dépigmentation de la peau normale. D'autres AT de différenciation, propres aux épithélium glandulaires, sont actuellement en voie d'être caractérisés. En cancer du sein, l'immunogénicité de peptides HLA-A3 et A2 de la mammaglobin-A a été documentée à partir de lymphocytes humains et testés en modèles murins [49]. Le carcinoembryonic antigen (CEA), surtout étudié dans les cancers intestinaux, a été testé dans des protocoles de vaccination de patients atteints de cancers métastatiques, dont un petit nombre de cancers du sein [50]. Le dernier AT de différenciation documenté est le breast cancer antigen NY-BR-1 [51].

3) Antigènes universels, surexprimés (*Widely occurring, overexpressed antigens*) : Cette famille hétérogène regroupe des gènes qui sont fréquemment surexprimés dans différents types de tumeurs. Les peptides les plus immunogéniques sont souvent générés par des aberrations d'expression. Ces aberrations peuvent être retrouvées dans les tissus normaux, mais à des niveaux beaucoup moins importants. Plusieurs AT de cette famille ont conduit à des essais cliniques de vaccination en cancer du sein. Le mieux caractérisé et testé demeure HER-2/*neu*. Plusieurs peptides HLA-A2, présentés par classe I aux LTc, ainsi que 2 peptides HLA-DR11,



présentés par classe II aux LTh, ont été caractérisés [52, 53]. Des essais cliniques de vaccination (phase I, toxicité et faisabilité) ont été réalisés pour le traitement de cancers métastatiques du sein [54], puis en thérapie adjuvante, chez des femmes à haut risque de récurrence [55]. Le même niveau d'études cliniques a été effectué avec des peptides de mucin 1 (MUC1) [56, 57], tandis que des peptides de p53 et de la human telomerase reverse transcriptase (hTERT) ont été testés pour les cancers métastatiques seulement [58, 59].

4) Antigènes spécifiques à une tumeur, uniques ou partagés (*unique and shared tumor-specific antigen*)

Les peptides de ces AT proviennent de mutations ponctuelles de gènes normaux, de protéines de fusion, de translocation ou d'inclusion virale. Ces phénomènes peuvent survenir de manière isolée dans une tumeur donnée (AT spécifique, unique) ou dans différents types de tumeurs (AT spécifique, partagé). Un exemple bien connu d'antigène spécifique partagé est la protéine de fusion bcr/abl rencontrée dans certaines leucémies, dont certains peptides de classe I et II ont été caractérisés [60]. Pour l'immunothérapie, les AT spécifiques possèdent potentiellement la meilleure spécificité. Aucun n'a encore été décrit pour le cancer du sein, quoique les peptides dérivés des mutations ponctuelles du gène Ras, pour le moment documenté dans le mélanome, les cancers du colon et du pancréas [61], pourraient s'avérer utiles. Le cas du Sialyl-Tn, à partir duquel ont été développés des vaccins utilisés en cancer du sein, est particulier, dans la mesure où il s'agit d'une protéine incomplètement glycosylée, dont l'épitope est reconnue par des anticorps spécifiques [62, 63]. L'immunogénicité cellulaire, par présentation via les CMH de classe I et II, n'est pas caractérisée.

Un certain nombre d'AT a donc été caractérisé pour le cancer du sein et a conduit à des essais cliniques de vaccination anti-tumorale. Que peut-on conclure sur l'efficacité thérapeutique de ces essais ?

Familles d'AT	Noms*	Évaluation clinique†
Protéines des cellules germinales	BAGE [44] GAGE [45] MAGE [46] <u>NY-ESO-1</u> [47]	Immunogénicité <i>in vitro</i>
Antigènes de différenciation	Mammaglobin-A [64]	Immunogénicité <i>in vitro</i> Modèles animaux [49]
	<u>NY-BR-1</u> [51]	Immunogénicité <i>in vitro</i>
	<u>CEA</u> [65, 66]	Vaccination, phase I – métastatique [50]
Antigènes universels, surexprimés	<u>HER-2/neu</u> [52, 53]	Vaccination, phase I – métastatique [54, 67] Vaccination, phase I – adjuvant [55]
	<u>MUC-1</u> [68, 69]	Vaccination, phase I – métastatique [56] Vaccination, phase I – adjuvant [57]
	p53 [70]	Vaccination, phase I – métastatique [58]
	hTERT [71]	Vaccination, phase I – métastatique [59]
Antigènes spécifiques à une tumeur	Sialyl-Tn [62]	Vaccination, phase III – métastatique [63]

\* Les études citées à côté des noms d'AT correspondent aux premières données d'immunogénicité *in vitro* de peptides de l'AT nommé, pour différents HLA. Les noms soulignés correspondent aux AT dont l'immunogénicité de peptides de classe I et II a été démontrée, tandis que les autres ne caractérisent que l'expression par classe I. L'immunogénicité cellulaire de Sialyl-Tn n'est pas établie au même titre que tous les autres AT du tableau, l'épitope est un site de liaison d'anticorps monoclonal. † En plus du cancer du sein, les études cliniques citées comprennent aussi des patients atteints d'autres types de cancers.

AT, antigènes tumoraux; BAGE, B antigen; CEA, carcinoembryonic antigen; GAGE, G antigen; HER-2/*neu*, human epidemral receptor 2/neurological; hTERT, human telomerase reverse transcriptase; MAGE, melanoma antigen; MUC-1, mucin 1; NY-BR-1, breast cancer antigen; NY-ESO-1, New York esophageous 1.

**Tableau 2 Antigènes tumoraux connus du cancer du sein**

### 1.2.3 Efficacité et défis des stratégies immunothérapeutiques

#### *Vaccination anti-tumorale*

La caractérisation des AT de différents cancers hématologiques et solides, en premier lieu pour le mélanome, a mené au développement de plusieurs vaccins anti-cancer. Pour le traitement des cancers métastatiques, l'administration des vaccins en monothérapie n'a toutefois pas souvent démontré de grands bénéfices cliniques. Une analyse récente, regroupant les résultats d'études de vaccination effectuées chez 1200 patients, conclut que le taux de réponse thérapeutique objective était d'environ 3% [72]. Des remarques importantes doivent être faites à propos de cette dernière étude, qui est loin de signifier l'échec de la vaccination anti-tumorale.

D'abord, la plupart des études cliniques recensées sont de phase I et II et ont pour objectif principal de tester l'innocuité et la toxicité de nouvelles thérapies, puis d'établir les meilleurs doses et modes d'administration. À ce chapitre, il est dorénavant établi que la vaccination anti-tumorale est bien tolérée par les patients, qui présentent rarement les toxicités observées suite à l'administration de chimiothérapies ou de cytokines à hautes doses. Ensuite, ces résultats combinent des stratégies de vaccination différentes, où sont testés différents types de vaccins, selon différents protocoles d'administration. Les vaccins peuvent en effet être constitués de lignées de cellules cancéreuses modifiées, de lysat de tumeurs autologues, de protéines et de peptides tirés d'AT connus, puis être ou ne pas être administrés en combinaison avec d'autres chimiothérapies et/ou adjuvants de la réponse immunitaire.

La grande majorité de ces études ont toutefois établi qu'il était possible de produire une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique grâce aux vaccins anti-tumoraux. Certaines ont aussi démontré des effets cliniques prometteurs. À titre d'exemple, Kontani et al. ont administré un vaccin de MUC1 chargé sur des cellules dendritiques autologues à 14 patients atteints de cancers métastatiques du sein ou du poumon. Les 9 patient(e)s dont la tumeur exprimait MUC1 (MUC1<sup>+</sup>) ont développé

une immunité cellulaire spécifique, ce qui ne fut le cas que pour 1 patient dont la tumeur n'exprimait pas MUC1 (MUC1<sup>-</sup>). La survie moyenne des patient(e)s MUC1<sup>+</sup> vaccinés était de 17 mois, comparée à 4 mois chez les patients MUC1<sup>-</sup> (p = 0.01) [73].

Il faut aussi souligner que ces études de vaccination ont été pour la grande majorité effectuées chez des patients porteurs de tumeurs pluri-métastatiques, souvent réfractaires aux traitements standards. La réponse immunitaire générée par la vaccination chez ces patients a pu être qualitativement et quantitativement insuffisante. Il reste maintenant à voir si la survie des patientes traitées pour des cancers à haut risque de récurrences, non métastatiques, dans des contextes de thérapies adjuvantes, sera améliorée par la vaccination. Au moins 4 équipes réalisent actuellement des études de phase III, qui comparent la vaccination aux traitements standards, dans des contextes de thérapies adjuvantes (prostate [74], pancréas [75]) tumeurs non-réséquables du poumon [76], cancers métastatiques de la prostate [77]). Finalement, la vaccination anti-tumorale a fait sa preuve de principe immunitaire, tandis que le rôle qu'elle pourrait jouer en clinique fait actuellement l'objet d'études. Comme nous le verrons, la vaccination anti-tumorale pourrait aussi être utilisée en combinaison avec le transfert adoptif de lymphocytes anti-tumoraux.

#### *Transfert adoptif de lymphocytes cytotoxiques spécifiques autologues*

Parmi les stratégies immunothérapeutiques testées chez les patients atteints de cancers métastatiques, les résultats les plus impressionnants proviennent du transfert adoptif de lymphocytes effecteurs, anti-tumoraux, autologues. Une des techniques consiste à prélever, chez un patient, les lymphocytes qui infiltrent sa tumeur ou les métastases (TIL, tumor-infiltrating lymphocytes), puis de lui re-transfuser ces cellules après les avoir activées, avoir sélectionné les plus spécifiques et les avoir démultipliées *ex-vivo*. Dans le cas du mélanome, ceci permet d'obtenir jusqu'à  $1 \times 10^{11}$  TIL [78]. Le groupe de Steven Rosenberg du National Cancer Institute américain a rapporté que le transfert adoptif d'en moyenne  $8 \times 10^{10}$  TIL autologues, combiné à environ 7 doses d'IL-2, avait produit une réponse objective chez 6 des 13 patients atteints de

mélanomes métastatiques réfractaires aux traitements standards, dont la survie attendue n'était que de quelques mois [79]. Dans cette étude, la plus efficace à ce jour, du cyclophosphamide et de la fludarabine avaient été administrés aux patients avant le transfert adoptif de TIL, de manière à créer une immunodépression relative. La repopulation clonale stable de la moelle osseuse, par des lymphocytes spécifiques à MART-1 et Gp-100, a aussi été observée chez 2 patients de cette étude, toujours en vie 10 mois après le traitement. Par ailleurs, 5 des 13 patients testés, dont 3 qui avaient obtenu une régression tumorale significative, ont développé des réactions auto-immunes. Une décoloration de la peau (vitiligo) est survenue chez 4 patients, puis un cinquième a développé une inflammation auto-immune de l'œil (uvéite) facilement réversible avec des cortico-stéroïdes.

L'administration préalable d'une chimiothérapie immunodépressive, non-myéloablatrice, et d'IL-2 concomitante au transfert adoptif, avaient d'abord montré son efficacité dans les modèles murins. Elle permet possiblement d'éviter que les lymphocytes effecteurs transférés ne soient rendus anergiques par les lymphocytes régulateurs de l'hôte, ce qui fait partie des mécanismes de la tolérance périphérique [80]. Les modèles animaux ont aussi démontré que la réponse clinique dépendait 1) de la quantité de lymphocytes transférés, 2) de la capacité de ces lymphocytes à sécréter l'INF- $\gamma$ , 3) de l'avidité des lymphocytes pour les AT présentés par la tumeur d'intérêt et 4) de l'importance que les LTh coopèrent avec les LTc, sensibilisés aux mêmes antigènes [81].

Les TIL d'autres tumeurs solides, dont le sein, pourraient toutefois ne pas montrer une cytotoxicité anti-tumorale aussi hautement lytique que les TIL du mélanome [82]. L'expansion *ex-vivo* de lymphocytes anti-tumoraux spécifiques n'est pas nécessairement transposable du mélanome aux autres tumeurs solides les plus fréquentes. D'autre part, le transfert adoptif de lymphocytes activés mais non-spécifiques au cancer d'intérêt (lymphokine-activated killer, LAK cells) n'a pas été prouvé plus efficace que l'administration unique d'IL-2 à haute doses, dans un essai clinique randomisé contrôlé [83]. Pour pallier à ces difficultés, certains groupes

étudient la combinaison entre vaccination anti-tumorale et génération de lymphocytes spécifiques récupérés pour expansion *ex-vivo* en vue de transfert adoptif [84]. D'autres stratégies comme la stimulation *ex-vivo* de lymphocytes naïfs, à l'aide de cellules dendritiques chargées d'AT, font actuellement l'objet d'études.

### *Immunogénicité des tumeurs solides*

Malgré le peu de données qui existent pour déterminer dans quelle mesure le système immunitaire prévient l'initiation ou ralentit le développement des tumeurs solides, le débat sur l'immunosurveillance fait rage depuis la formulation de cette hypothèse il y a bientôt cent ans [85]. Plusieurs chercheurs soutiennent l'hypothèse de l'immuno-édition (*immunoediting*), qui consisterait en une sélection naturelle des tumeurs les moins immunogéniques, capables d'échapper à l'immunosurveillance du système immunitaire (*tumor-escape mechanisms*) [86].

Bien que cette hypothèse soit difficile à démontrer, la caractérisation récente de plusieurs AT, les essais expérimentaux dans les modèles murins et les essais cliniques de différentes stratégies immunothérapeutiques démontrent qu'à l'état de base, les tumeurs solides sont peu immunogéniques, ou échappent au système immunitaire compétent. Dans des modèles de souris transgéniques où des cancers du pancréas se développent grâce à la transcription d'oncogènes sous contrôle du gène rat insulino-promoteur (RIP), le transfert de lymphocytes spécifiques aux AT de la tumeur est insuffisant, seul, pour ralentir la progression tumorale ou améliorer le destin des souris [87]. Chez l'humain, la voie privilégiée de dissémination de la plupart des tumeurs épithéliales solides est le réseau lymphatique; les cellules cancéreuses prolifèrent au niveau des ganglions lymphatiques, entourés de lymphocytes de toutes sortes. En bout de ligne, tout se passe comme si le système immunitaire compétent « ignorait » les tumeurs solides.

Mais qu'en est-il du rôle du système immunitaire pour prévenir l'apparition des tumeurs ? Chez l'humain, on sait que l'immunosuppression des patients porteurs d'une

allogreffe entraîne une hausse des tumeurs liées aux infections virales, mais n'entraîne pas une hausse de l'incidence des tumeurs épithéliales solides les plus fréquentes, dont celle du sein. Classiquement, les personnes atteintes du VIH qui développent le SIDA, lors de la destruction quasi complète de leurs lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, développent certains types rares de tumeurs solides, comme le sarcome de Kaposi. Les modèles murins indiquent toutefois que des déficits immunitaires majeurs pourraient être associés à l'initiation spontanée de tumeurs solides épithéliales. Par exemple, les souris transgéniques (RAG-2<sup>-/-</sup>), dont les lymphocytes n'ont pas de TCR à leur surface, développeraient plus d'adénocarcinomes intestinaux spontanés et présenteraient un plus bas seuil d'induction de sarcomes par des agents carcinogènes chimiques [88]. Selon le même groupe, les souris 129/SvEv, qui n'ont pas de TCR ni de récepteur à INF- $\gamma$  (STAT1), développeraient des tumeurs mammaires spontanées [89]. Ces observations n'ont toutefois pas été reproduites chez des souris dont le bagage génétique de fond diffère. De tels déficits immunitaires ne sont pas, par ailleurs, compatibles avec la vie humaine. Ainsi, de deux choses l'une : l'immunosurveillance continue, qui préviendrait le développement des tumeurs solides, pourrait être remise en question, ou bien dépendre de mécanismes primitifs, qui persistent même dans des états d'immunodépression sévères.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'absence apparente de réponse immunitaire contre le développement ou la progression des tumeurs solides :

- 1) pour ce qui est d'empêcher l'initiation du cancer, il existe déjà plusieurs mécanismes cellulaires de surveillance et de réparation de l'ADN qui sont actifs lors de la division cellulaire, et capables d'induire l'apoptose des cellules dont le génome est instable, sans nécessairement faire appel au système immunitaire;
- 2) lorsque les cellules cancéreuses prolifèrent, elles expriment souvent des AT qualitativement normaux, et pourraient être simplement perçues par le système immunitaire comme des cellules du soi;
- 3) les mécanismes de la tolérance immunitaire périphérique, à travers l'action des cellules dendritiques immatures et des cellules T régulatrices (Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), peuvent aussi participer à l'anergie des lymphocytes effecteurs qui se retrouvent au site de la tumeur;
- 4) la longue période de temps nécessaire au développement des tumeurs

pourrait aussi être liée à la tolérance immunitaire, de manière analogue aux infections virales chroniques, latentes; 5) dans un microenvironnement péri-tumoral non-inflammatoire, l'absence de molécules de co-stimulation sur les cellules tumorales ou d'autres lymphocytes ou cellules présentatrices d'antigènes, pourrait rendre difficile l'activation des lymphocytes effecteurs; 6) les tumeurs peuvent elles-mêmes sécréter des molécules immuno-suppressives, tels le transforming growth factor-Beta (TGF- $\beta$ ), l'IL-10, l'IL-13 ou l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui crée un environnement immunosuppresseur au site de la tumeur [90]; et finalement 7) les tumeurs peuvent empêcher la reconnaissance de peptides anormaux par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH), notamment par des mutations des chaînes lourdes des molécules de classe 1.

#### 1.2.4 Conclusion : défis de l'immunothérapie

En dépit du fait que les tumeurs épithéliales, à l'état de base, semblent échapper au système immunitaire, la recherche démontre qu'il est possible d'utiliser la machinerie cytotoxique du système immunitaire pour détruire de façon spécifique les cellules cancéreuses. Pour que l'immunothérapie fonctionne, un nombre suffisant de lymphocytes cytotoxiques, au stade optimal de différenciation, dans l'état d'activation approprié, qui démontrent une grande affinité pour les AT, doivent infiltrer la tumeur solide dans un environnement pro-inflammatoire où les mécanismes de la tolérance périphérique sont inhibés [72]. Les combinaisons entre transfert adoptif de lymphocytes autologues, vaccination anti-tumorale et l'utilisation judicieuse d'autres chimiothérapies cytotoxiques immunosuppresseives, promettent d'améliorer le traitement des cancers avancés ou à haut risque de récurrences. Finalement, comme la plupart des AT sont aussi des antigènes du soi, un des défis majeurs de l'immunothérapie demande d'éviter les réactions auto-immunes délétères.



### 1.3 Identification de nouveaux antigènes tumoraux du cancer du sein

Comme nous l'avons souligné, un nombre insuffisant d'AT a été caractérisé pour le cancer du sein et limite actuellement le développement de stratégies immunothérapeutiques efficaces. Nous décrivons différents moyens qui permettent d'identifier des AT potentiels, de même que ce qui nous a poussé à vouloir clarifier si PDEF était un AT candidat d'intérêt pour le cancer du sein.

#### 1.3.1 Stratégies d'identification de nouveaux AT

Plusieurs méthodes ont été décrites pour identifier des AT qui seraient reconnus par des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, d'abord élaborées à partir du mélanome. Boon et collègues ont été les premiers à décrire ces méthodes [91], en démontrant chez la souris qu'un peptide muté d'un acide aminé seulement pouvait être reconnu de manière spécifique par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [92].

Des techniques de sensibilisation *in vitro* (culture cellulaire) sont utilisées pour générer des lymphocytes T réactifs et potentiellement spécifiques à des peptides d'AT candidats [93]. Une fois sensibilisés, les lymphocytes sont évalués pour leur capacité à reconnaître l'AT candidat, jauger d'après la quantité de cytokines produites ou par des essais de lyse cellulaire. L'élaboration de banques d'ADNc de tissus normaux et cancéreux et la possibilité de cloner des AT ont facilité ces approches expérimentales. Des logiciels bio-informatiques permettent dorénavant de prédire les sites de clivages des protéines endogènes et l'affinité que pourrait avoir un peptide pour un CMH donné, d'après les motifs d'acides aminés. Le profilage génétique par micro-matrice d'ADN (*Section 1.1.3*) a aussi facilité la comparaison des niveaux relatifs d'expression des gènes dans les tissus cancéreux et normaux (ex : Serial analysis of gene expression, SAGE). Par ailleurs, l'extraction biochimique directe des peptides liés aux CMH a permis de purifier les lysats de cellules tumorales et d'en extraire les peptides naturellement présentés par les cellules tumorales [94]. Cette approche a notamment

été utile pour caractériser des peptides liés aux CMH de classe II dans le cas du mélanome [95].

La combinaison de ces approches a permis d'identifier un certain nombre d'AT des cancers du sein qui sont reconnus par les lymphocytes (Tableau 2). Pour notre part, afin de caractériser un nouvel AT en cancer du sein, nous avons privilégié l'analyse des banques d'ADNc accessibles publiquement, pour ensuite synthétiser des peptides dont l'immunogénicité seraient testée *in vitro* par la sensibilisation des lymphocytes de patientes opérées pour un cancer du sein. La méthodologie de cette approche a déjà été publiée [96] et sera décrite sommairement à la Section 3.1 des résultats complémentaires.

### 1.3.2 Le Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) comme antigène candidat

#### *Hypothèse du projet de maîtrise*

L'analyse des banques d'ADNc par une approche bioinformatique, qui permet de comparer les niveaux d'expression de gènes du sein normal et cancéreux, a mis le laboratoire sur la piste de gènes potentiellement surexprimés par le cancer du sein. Le Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) faisait partie des gènes identifiés par l'approche bioinformatique. **C'est à partir de ces données préliminaires que nous avons posé l'hypothèse que PDEF pourrait être un AT candidat en cancer du sein.**

#### *Facteurs de transcription Ets et cancer du sein*

Les facteurs de transcription E26 transformation-specific (Ets) ont en commun un domaine hautement conservé de liaison à l'ADN, le domaine Ets, long d'environ 85 acides aminés. Cette famille est constituée d'environ 30 à 40 homologues du gène Ets-1, identifié en 1983 d'après l'oncogène viral v-ets du rétrovirus transformant aviaire

E26, décrit en 1983 [97]. Certains de ces facteurs sont exprimés préférentiellement par les épithéliums et sont regroupés sous l'appellation Epithelial-specific Ets (Ese1, Ese2 et Ese3), [97]. D'autres sont ubiquitaires (Ets-2), ou exprimés préférentiellement par le système hématopoïétique (Ets-1, Fli1, PU.1, Elf1) (Tableau 3). Ils sont regroupés en sous-famille selon l'homologie de séquence du domaine Ets. La moitié d'entre eux contiennent aussi des domaines de liaison protéine:protéine (sterile alpha motif (SAM) ou pointed domain), qui participent à la formation de différents complexes et modulent la transcription de gènes cibles [98, 99]. L'état d'activation des facteurs de transcription Ets dépend de multiples cascades de phosphorylation intracellulaires, les mieux documentées étant les voies Ras-Mitogen-activated protein kinases (MAPK) [100, 101].

En physiologie normale, les facteurs Ets seraient impliqués dès l'embryogénèse dans la différenciation et la maturation tissulaires, en modulant l'expression de gènes liés à l'apoptose, à l'angiogénèse et à la motilité [102]. Dans les cellules cancéreuses, l'expression aberrante des facteurs de transcription Ets participerait aux transformations oncogéniques de plusieurs manières (Figure 3). Plusieurs anomalies d'expression qualitative ou quantitative des facteurs de transcription Ets ont donc été documentées dans différents types de cancers solides et hématologiques (Tableau 3).

<b>Facteurs de transcription Ets</b>	<b>Organes ou tissus</b>	<b>Anomalies</b>	<b>Types de cancers</b>
<b>Ets-1</b>	Épithélium de plusieurs organes, tissus lymphoïde, endothélium vasculaire et stroma	Surexpression	Cancers du sein, ovaires, thymome, estomac, colorectaux, pancréatique et biliaire, foie, poumons, angiosarcome, chondrosarcome, autres
<b>Ets-2</b>	Ubiquitaire	Surexpression	Cancer du sein, pancréas, colon, prostate, col utérin, autres
<b>PEA3/E1AF</b>	Glande mammaire, épiderme, cerveau, autres	Translocation (EWS-E1AF) Surexpression	Sarcome d'Ewing [t(17;22)] Cancer du sein, NSCLC, épidermoïde de la bouche, ovaire
<b>PEA3/ER81</b>		Translocation (EWS-ER81) Surexpression	Sarcome d'Ewing [t(7;22)] Cancer du sein
<b>Ese1/ESX</b>	Épithélium, plusieurs organes	Surexpression	Cancer du sein et autres cancers
<b>PU.1</b>	Lymphocytes B, macrophages, neutrophiles	Mutation Downregulation	LMA (~7%) LMA [t(8;21)]

*Données tirées de Oikawa et al, 2004 et Kurpios et al, 2003*

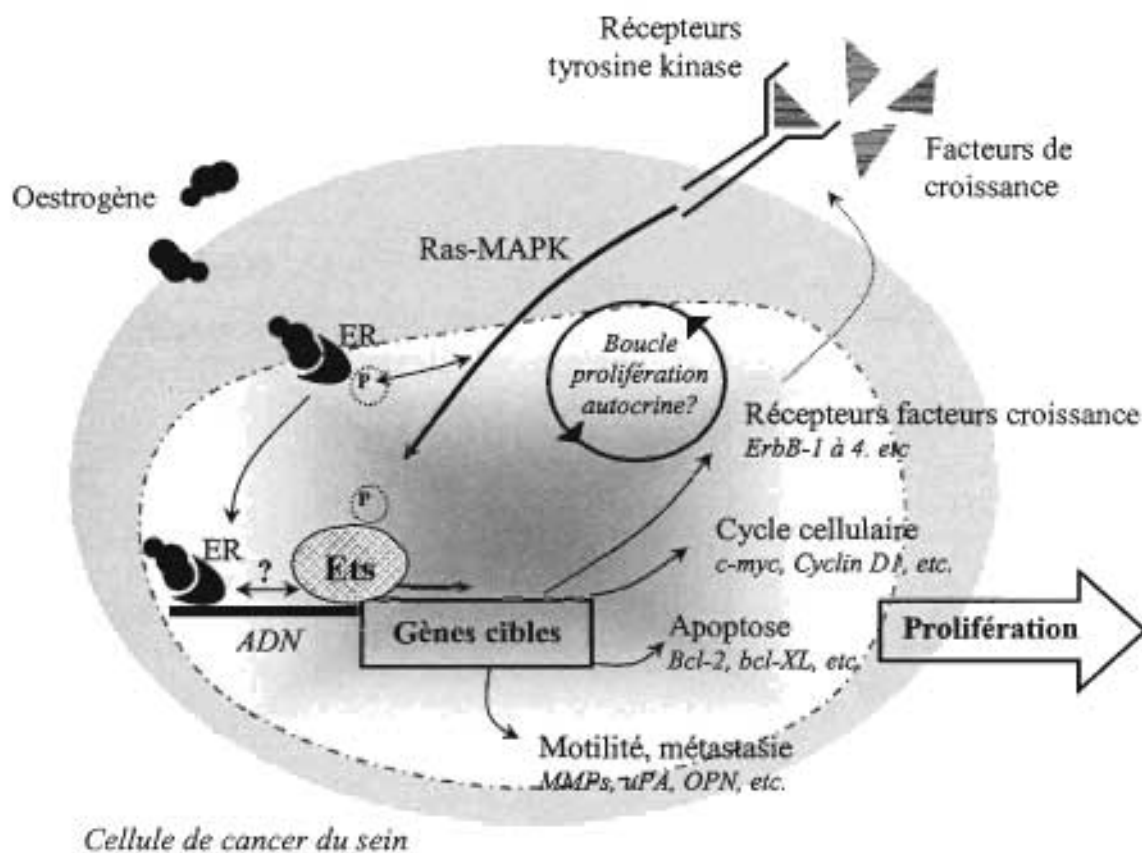
LMA, leucémie myéloïde aiguë; NSCLC, Nonsmall cell lung carcinoma;

**Tableau 3 Expression aberrante de certains facteurs de transcription Ets dans les cancers humains**

En cancer du sein, la surexpression des sous-familles PEA3 (ER81, PEA3 et ERM) et Ets a été rapportée à partir de modèles murins [103]. On sait par ailleurs que les facteurs Ets-1 et Ets-2, une fois phosphorylés par la voie Ras-MAPK, module l'expression d'oncogènes connus du cancer du sein, comme c-myc et cyclin D1 [104]. L'expression de Ets-1 au niveau du stroma et de l'épithélium du cancer du sein serait significativement associée à un plus haut taux de récurrences et à un moins bon pronostic [105]. Des boucles de prolifération autocrine, via les récepteurs tyrosine kinase, pourraient être fonctionnelles grâce aux Ets (*Figure 3*). En effet, la phosphorylation des facteurs Ets-1, PEA3/E1AF et Ets-1 par les voies Ras-MAPK leur permet à leur tour d'agir comme promoteur du gène HER-2/*neu* [106, 107]. Outre la prolifération cellulaire, plusieurs domaines de liaison à l'ADN des facteurs Ets et AP1 (Jun/fos), nommés « Ras responsive element », sont adjacents aux gènes impliqués dans l'invasion et la métastase, tels les métalloprotéinases, l'uPA, et l'ostéopontine [100].

#### *Prostate-derived Ets transcription factor*

PDEF a été initialement identifié dans l'épithélium prostatique en 2000 [108]. Tout comme les Ets, son expression semble spécifique aux épithélia [97]. Le domaine Ets de PDEF présente une homologie moyenne d'environ 50% avec les autres facteurs Ets [108]. Contrairement à la plupart des Ets, PDEF se lie préférentiellement aux séquences d'ADN GGAT plutôt que GGAA [109]. La protéine PDEF contient 335 acides aminés (a.a.) et comprend un domaine de liaison protéine:protéine SAM-pointed, ainsi que deux motifs riches en proline, glutamine, sérine et/ou thréonine (PEST motif) qu'on retrouve dans les protéines de courte demi-vie [108]. Un domaine optimal de phosphorylation par MAPK, PX(S/T)P, a aussi été proposé (a.a. 48-51).



**Figure 3** Modèle théorique de participation des facteurs de transcription Ets à la progression du cancer du sein

**Légende :** Les facteurs de transcription Ets transcrivent des gènes cibles à partir de l'ADN dans le noyau cellulaire. Ces gènes cibles peuvent être impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la motilité cellulaire. L'état d'activation (P, phosphorylation) des facteurs Ets dépend de cascades intracellulaires en amont, telles Ras-MAPK, qui elles-mêmes peuvent répondre à des stimuli de surface cellulaire. L'interaction entre les facteurs de transcription Ets et les récepteurs oestrogènes (ER), est peu documentée. Les interactions entre Ras-MAPK et ER sont connues et abordées dans la discussion de ce mémoire.

Le fait que PDEF soit plus fréquemment retrouvé dans les banques d'ADNc de cancers du sein que dans le cancer de la prostate a réorienté la recherche sur PDEF [110]. L'expression de PDEF a toutefois été documentée dans un nombre nettement insuffisant d'échantillons cliniques de cancers du sein, dont les caractéristiques clinico-pathologiques n'étaient pas rapportées adéquatement [110-112]. La détection de PDEF dans les métastases ganglionnaires suggérait toutefois une association avec des cancers relativement avancés [113]. D'autre part, le niveau d'expression de PDEF dans les tissus sains, évalué par Northern blot, n'a pas été comparé à celui obtenu dans les échantillons cliniques de cancer du sein [111]. Au niveau cellulaire, la surexpression de PDEF a produit des effets pro- [114] et anti-métastatiques [111, 112, 115], selon les lignées cellulaires testées, ne permettant pas de trancher sur un rôle mécanistique attendu pour PDEF.

Les données rapportées dans la littérature récente ne permettent donc pas de préciser si l'expression de PDEF serait associée à un phénotype de cancer du sein d'intérêt clinique, ni de valider si PDEF serait un bon AT. C'est dans cette perspective que s'inscrit notre travail.

#### 1.4 Objectifs du projet de maîtrise

Considérant le manque d'efficacité des traitements des cancers du sein métastatiques et la difficulté de prévenir les récurrences, le développement d'approches immunothérapeutiques prometteuses, le manque d'AT identifiés en cancer du sein, puis considérant les données préliminaires connues du gène PDEF, nous avons posé l'hypothèse que PDEF pourrait être un AT candidat du cancer du sein. Pour valider cette hypothèse, trois objectifs généraux ont été fixés d'après la définition d'un AT idéal (Section 1.2.2) :

- 1) Établir le profil d'expression de PDEF dans les échantillons cliniques de cancers du sein. À la lumière des connaissances cliniques, pathologiques et moléculaires associées au pronostic des cancers du sein, déterminer si PDEF est exprimé dans un sous-groupe d'intérêt clinique.
- 2) Comparer les niveaux d'expression de PDEF dans les échantillons cliniques à ceux des tissus normaux.
- 3) Déterminer si certains peptides de PDEF, restreints pour HLA-A2\*0201, présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, sont potentiellement immunogéniques.



## SECTION 2. MANUSCRIT

**PDEF overexpression is associated with nodal metastasis and hormone receptor positivity in invasive breast cancer**

MS No. 07-460, version 2, accepté pour publication par Neoplasia, 10/08/2007

Neoplasia Press, Divya Khanna, Production Editor  
 University of Michigan Medical Center  
 109 Zina Pitcher Place, BSRB - A628 / Ann Arbor, MI 48109-2200

Simon Turcotte<sup>1,2</sup>, Marie-Andrée Forget<sup>1</sup>, Diane Beauseigle<sup>1</sup>, Edgar Nassif<sup>2-3</sup>  
 and Réjean Lapointe<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'immuno-oncologie, Institut du cancer de Montréal, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM - Hôpital Notre-Dame), Montréal, Québec, Canada.

<sup>2</sup> Département de chirurgie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>3</sup> Département de chirurgie oncologique, CHUM-Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada.

\* Corresponding author: Réjean Lapointe, Centre de recherche du CHUM - Hôpital Notre-Dame, Pavillon J.A. DeSève, Room Y-5605, 2099 rue Alexandre DeSève, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1. Tel: [information retirée / information withdrawn]

[redacted], Fax: [information retirée / information withdrawn] [information retirée / information withdrawn]

Running title: PDEF in invasive breast cancer

Key words: Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF); Dikkopf-1 (DKK1); Breast cancer; Expression profile; Tumor biomarkers

*S. Turcotte est responsable de la totalité de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. Les co-auteurs ont apporté une contribution critique. R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.*

**Abstract**

Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) has recently been associated with invasive breast cancer, but no expression profile has been defined in clinical specimens.

We undertook a comprehensive PDEF transcriptional expression study of 86 breast cancer clinical specimens, several cell lines and normal tissues. PDEF expression profile was analyzed according to standard clinicopathological parameters, and compared with the expression of hormonal receptors, HER-2/*neu*, and the new tumor biomarker Dikkopf-1 (DKK1) expressions.

Wide ranging PDEF overexpression was observed in 74% of tested tumors, at higher levels than the average expression found in normal breasts. High PDEF expression was associated with hormone receptor positivity ( $p < 0.001$ ), moderate to good differentiation (less than grade III,  $p = 0.01$ ), and dissemination to axillary lymph nodes ( $p = 0.002$ ). PDEF was an independent risk factor for nodal involvement (multivariate analysis, odds ratio 1.250,  $p = 0.002$ ). It was expressed in a different subgroup than DKK1 expressing tumors ( $p < 0.001$ ).

Our data imply that PDEF mRNA expression could be useful in breast cancer molecular staging. Further insights into PDEF functions at the protein level, and possible links with hormone receptors biology, bear great potential for new therapeutic avenues.

**Abbreviations used**

DKK1, Dikkopf-1

ER, estrogen receptor

PDEF, Prostate-derived Ets transcription factor. Alias: Sam-pointed domain Ets transcription factor (SPDEF), prostate-specific Ets (PSE)

ROC, receiver-operator curves

## Introduction

Genome-wide expression profiles have provided a genotypic ground that supports the main invasive breast cancer phenotypes, namely, the estrogen receptor (ER)-positive luminal epithelial type, the ER-negative basal epithelial type, and ER-negative breast carcinoma overexpressing the HER-2/*neu* receptor [25]. ER-positive tumors form the largest group of breast cancers, but encompass heterogeneous tumors of variable aggressiveness [24, 26, 116]. ER-positive tumor-specific genes, which promote or prevent early dissemination or resistance to anti-estrogenic therapies, remain to be identified, included as molecular staging tools, and used as new therapeutic targets to personalize breast cancer treatment and improve outcomes.

Epithelial-specific Ets transcription factors could potentially be exploited in this regard [97, 102]. Several Ets have been linked mainly to ER-negativity and HER-2/*neu* breast cancer progression [106, 117-119]. Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF), one of the last Ets identified, was the first to be characterized in hormone-sensitive prostate cancer as a promoter of the protease prostate-specific antigen (PSA), in cooperation with androgen receptor and other transcription factors [108, 120].

Bioinformatic tools and various gene expression quantification methods subsequently documented PDEF mRNA overexpression in invasive breast cancer [110], in atypical ductal hyperplasias and in carcinomas *in situ* [114], when compared to normal breasts. PDEF mRNA has also been detected in micro-metastatic axillary lymph nodes [113]. Despite high mRNA expression, immunohistochemical data suggest that PDEF protein expression could be lost in prostate and breast carcinomas [111, 121]. PDEF silencing and overexpression assays in breast and prostate metastatic cancers cell lines resulted in anti-metastatic effects [112, 115, 122], but pro-metastatic effects has also been documented in other metastatic- and benign disease-derived breast cell lines [114].

Up to now, however, the PDEF expression profile has not been described in clinical breast cancer specimens, in order to orient future work at the protein level. Here, we report a comprehensive PDEF transcriptional expression study of 86 breast cancer

clinical specimens, several cell lines and normal tissues. PDEF expression profile was analyzed according to standard clinicopathological parameters, compared with hormonal receptor and HER-2/*neu* status, and to the expression of the new tumor biomarker Dickkopf-1 (DKK1). We observed that PDEF expression is strongly associated with the ER-positive breast cancer phenotype, and that PDEF mRNA overexpression in primary tumors could also be an independent risk factor for cancer dissemination to lymph nodes.

## Materials and methods

**Patient specimens and cell lines.** Breast cancer tissues of consecutive patients who had provided written consent to contribute to the CHUM-FRSQ Tumor Bank (Montréal, Qc, Canada) between September 2003 and February 2006 were selected by the pathologist after surgical resection of tumors 1.5 cm or greater in diameter. The recruitment protocol and management of clinical specimens and information were previously approved by institutional authorities. Fresh tissues were stored at 4°C in RNAlater™ (Sigma, St.-Louis, MO) for RNA stabilization. All patients underwent sentinel node dissection and, when positive for nodal metastasis, complete axillary lymph node dissection. Cell lines used for the first detection of PDEF at the mRNA and protein levels (breast cancer MCF7, MDA-MB-231, BT-20, HCC-1428, HCC-2218, renal embryonic 293T, and melanoma SK23) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in RPMI 1640 (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin (both from Wisent), 2 mM L-glutamine, 10 µg/ml gentamicin (both from Invitrogen, Grand Island, NY, USA). HCC breast cancer lines also required 10 mM HEPES solution plus 1 mM sodium pyruvate (both from Invitrogen). Mononuclear cells were obtained by patient blood centrifugation on lymphocyte separation medium (Cellgro, Herndon, VA, USA) and culture in complete AIM-V medium (Invitrogen), as described previously [123].

**RNA extraction and RT-PCR.** Cancer specimens were homogenized with Medimachine™ (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was extracted with Qiazol reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), followed by a cleanup and concentration procedure, using the RNeasy™ Mini or Micro Kit (QIAGEN) and stored at -80°C. Five out of 91 clinical specimens were rejected because of poor quality of the extracted mRNA ( $OD_{260}/OD_{280}$  absorption ratio below 1.6) or a  $\beta$ -actin expression level detected beyond the last dilution of the standard curve when tested in real-time PCR (see below). A

panel of pooled mRNAs from 19 normal tissues and 6 peritumoral normal breast mRNAs were also analyzed (both from Clontech, Mountain View, CA, USA).

We synthesized cDNA from 1  $\mu$ g mRNA with the Omniscript Reverse Transcriptase (RT) Kit (QIAGEN), using oligo-dt (Invitrogen) at 42°C for 1 hour. Intron-spanning PCR primer pairs were designed for PDEF (5' primer GACATCGAGACGGCCTGCAAGCTG; 3' primer ACATGGCGCACAGCTCCTTG; amplicon 150 bp) and for  $\beta$ -actin, exploited as a housekeeping gene (5' primer GGAAGGCTGGAAGAGTGCC; 3' primer GTGATGGTGGGC ATGGGT C; amplicon 300 bp) (Invitrogen). PCR was performed with the Quantitect™ SYBR Green PCR kit (QIAGEN). Optimal annealing temperatures for both PDEF and  $\beta$ -actin were determined by gradient (51 to 65°C). Real-time quantitative RT-PCR was undertaken with 0.4  $\mu$ M of each PDEF primer or 0.8  $\mu$ M of each  $\beta$ -actin primer, 6.25  $\mu$ l of 2X SYBR Green™ mix (providing 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2.5  $\mu$ l of cDNA (1:25 dilution), and water in a Rotorgene 3000 thermal cycler (Corbett Life Science, Sydney, Australia). The optimized cycling conditions were 10 min at 95°C for initial polymerase activation, then 32 cycles of 40 sec at 94°C, 40 sec at 56°C, 50 sec at 72°C, and a final melting curve from 72 to 95°C. Fluorescence was measured at the end of each extension step. The gain was adjusted automatically on the first tube at the end of the first cycle (channel FAM/Sybr, source 470 nm, detector 510 nm, readings between 2 FI and 5 FI). The absence of primer dimers and the specificity of the PCR products were documented by melting curve analysis and electrophoresis migration in 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

**PDEF quantification.** The relative PDEF expression ratio over  $\beta$ -actin was reported in relation to MCF7 cell line expression established at a value of 1 [124]. The equation takes into account the PCR efficiencies (E) of both genes and the difference ( $\Delta$ ) between the moment at which the fluorescence of a given sample versus MCF7 crosses the threshold (Ct). The equation is as follows:

$$\text{Ratio PDEF}/\beta\text{-actin} = (E_{\text{PDEF}})^{\Delta C_t (\text{MCF7} - \text{sample}) \text{ for PDEF}} / (E_{\beta\text{-actin}})^{\Delta C_t (\text{MCF7} - \text{sample}) \text{ for } \beta\text{-actin}}$$

Standard curves were generated every 2 runs with serial dilutions of a pool of cDNA taken from the above-mentioned breast cancer cell lines. The curves allowed the software from Corbett to calculate the lowest thresholds of the loglinear amplification phase above the fluorescence background and the efficiencies of PCRs derived from the high linearity slopes (Pearson correlation coefficient  $r > 0.99$ ). Mean thresholds and efficiencies were used to compare the expression of all samples. Ct obtained at or after the last detectable point of the dilution curves (1:3,125 for PDEF and 1:15,625 for  $\beta$ -actin) was considered negative. All samples were tested in duplicate in at least 2 independent runs, while MCF7 and the controls (MCF7 without RT, water or lymphocytes) were systematically included in every run. Intra- and inter-assay Ct variations, calculated with the Relative Expression Software Tool, are represented by error bars [125].

**DKK1 expression measurements and quantification.** Real-time RT-PCR with intron-spanning DKK1 primers was performed in a LightCycler™ (Roche, Mannheim, Germany) and revealed with SYBR Green™ (QIAGEN) as described previously [96]. cDNA was synthesized as described for PDEF, from the same RNA extracts, tested at the same time period, and the amplified material was submitted to the same specificity validation as PDEF.

**Measurement of PDEF protein expression.** For Western blotting, protein extracts were prepared from the above-mentioned cell lines for 20 min in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and 2 mM EDTA) containing protease inhibitors (1 mM PMSF, 2  $\mu\text{M}$  pepstatin A, 2  $\mu\text{M}$  leupeptin, all from Sigma). Protein concentration was measured by Lowry assay with a DC Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For recombinant PDEF, the coding sequence was cloned in pQE-30 (QIAGEN), and the recombinant protein was produced in *E. coli* DH5-a. Cell extracts (10  $\mu\text{g}$ /well), resolved by 12% SDS-PAGE,

were transferred to PVDF membranes (Immun-Blot™, Bio-Rad). The membranes were subjected to 1-hour incubation with rabbit affinity purified polyclonal anti-PDEF antibody (1:400), kindly provided by Dr. Dennis K. Watson (Hollings Cancer Center, Charleston, SC, USA) [111], or mouse actin-specific antibody (1:4,000; Chemicon, Temecula, CA, USA). The membranes were then washed, and proteins revealed after 1-hour incubation with secondary peroxidase-conjugated antibodies (1:5,000 goat anti-rabbit from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:40,000 goat anti-mouse antibody from Chemicon) were detected with ECL Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Chemifluorescence was quantified with an Omega 12ic imaging system (Ultralum, Claremont, CA, USA).

**Statistical analysis.** Associations between PDEF continuous expression and categorical clinicopathological parameters were evaluated by the independent sample *t* test or the one-way ANOVA test (if more than 2 categories, with previous Levine test to ensure the homogeneity of variance). PDEF versus DKK1 proportions clustered by clinicopathological factors, was compared by the Pearson Chi-Square test or Fisher's Exact test for small samples. These tests were done with SPSS 13.0 software for Windows (LEAD Technologies, Chicago, IL, USA), with the generation of receiver-operator curves (ROC) to evaluate the sensitivity of PDEF expression for the prediction of clinicopathological factors. Univariate and multivariate logistic regression was used to compare the strength of associations between PDEF continuous expression and metastatic lymph node involvement. Logistic regression analysis was performed with software R, version 2.3.1, with the deviance test for multivariate analysis (The R project for statistical computing [<http://www.r-project.org>]). All tests were 2-sided, and P values <0.05 were regarded as statistically significant.



## Results

**PDEF mRNA and protein expression in breast cancer cell lines.** PDEF expression at the mRNA and protein levels was first evaluated in 4 breast cancer cell lines (Figure 1<sup>m</sup>). The ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cell line expressed the lowest PDEF level, 5 times lower than other ER-positive lines. As reported previously, protein detection did not always follow mRNA levels [111, 121]. For further PDEF mRNA expression analysis of clinical specimens, the MCF7 expression level was chosen as a reference, since it corresponded to the median PDEF/ $\beta$ -actin expression level in breast cancer cell lines and is widely available.

**PDEF mRNA is weakly or not detected in vital organs.** PDEF expression was previously reported by different quantification methods in some high epithelial content tissues, namely, the prostate, salivary glands, colon and normal breast [108, 110, 111]. We re-assessed PDEF expression in normal tissues to compare its magnitude with PDEF expression in breast cancer by a reproducible method (Figure 2<sup>m</sup>). Besides weak expression in the lungs and colon, PDEF was not detected in other vital organs, such as the heart, brain and kidneys. Mean PDEF expression in 6 peritumoral breast tissues was  $1.04 \pm 0.68$ , a level similar to MCF7. PDEF was absent from lymphocytes, which often infiltrate solid tumors. Altogether, the absence of PDEF expression in most normal tissues and vital organs represents an essential prerequisite for the validation of future tumor biomarker or antigen.

**Measurement of PDEF in breast cancer clinical specimens.** PDEF expression in breast cancer cell lines, which are free of normal epithelium, combined with a similar level of expression in peritumoral normal breasts, called for a comprehensive PDEF transcriptional analysis of breast cancer clinical specimens. We were able to extract sufficient RNA from 86 out of 91 consecutive tumors. Mean patient age at diagnosis was 64.5 years, and the majority presented with moderately-differentiated, sporadic, invasive ductal carcinomas. Among the 86 tumors, 64 (74.4%) were found to express PDEF at a level at least equal to the established MCF7 breast cancer cell line, and

higher than the normal breast average expression level (Figure 3<sup>m</sup>A). PDEF expression ranged from null to 32 times higher than MCF7. Mean PDEF expression in all tumors was  $3.76 \pm 4.46$ , with a median of 2.80.

**Cluster analysis of PDEF by clinicopathological parameters.** Table 1<sup>m</sup> summarizes the clinicopathological parameters of patients and their tumors as well as the significance of the different average PDEF expression cluster levels. Overall, these results provide an association between PDEF expression and sporadic epithelial ER-positive breast cancers, which are better differentiated (histopathological grades I and II) than ER-negative tumors (Figure 3<sup>m</sup>B). At the time of diagnosis, breast cancer can be regionally disseminated to the axillary lymph nodes. PDEF overexpression in the primary tumor was associated with these more advanced node positive tumors (Figure 3B). No association was found with patient age, tumor size, ductal or lobular histological type. The limited number of recurrent tumors and tumors overexpressing HER-2/*neu* did not yield statistical significance.

**PDEF expression is strongly associated with hormone receptor status.** We observed that 7 patients who presented an ER-positive primary tumor and who had taken a 5-year course of anti-estrogen therapy (tamoxifen) to prevent tumor recurrence nevertheless relapsed with ER-positive tumors co-expressing PDEF. The mean PDEF expression in these tumors was 8.1, but the sample size was insufficient to reach statistical significance (data not shown). Among all tumors expressing PDEF, only 10 did not express ER, further reinforcing a close link between ER and PDEF. We then generated a ROC analysis to appreciate the sensitivity and specificity at which PDEF expression could predict an association with hormone receptor positivity (Figure 3C). As expected from the 5 times higher mean PDEF expression in hormone receptor-positive tumors (Figure 3<sup>m</sup>B), the ROC analysis allowed us to predict hormone receptor positivity with 98.3% sensitivity (58/59) and 76.9% specificity (20/26), when PDEF was at or above the MCF7 level. These findings all suggest a strong association between PDEF and the hormone-receptor positive phenotype of breast cancer.

**PDEF overexpression is an independent risk factor for cancer dissemination to axillary lymph nodes.** The ROC generated for the prediction of nodal involvement was less discriminatory than for hormone receptors (Figure 3<sup>m</sup>C). We, however, compared the strength of this association to standard pathological characteristics, since regional dissemination of cancer to lymph nodes is the strongest predictor of recurrence and death from breast cancer. Univariate analysis revealed that PDEF expression was a better predictor of nodal involvement than the degree of differentiation, tumor size and HER-2/*neu* status (Table 2<sup>m</sup>). Continuous PDEF expression remained the only significant independent risk factor in multivariate logistic regression analysis. In this model, sensitivity and specificity were 87.8% (29/33) and 38.8% (14/36), respectively. The associated positive predictive value was 56.9% (29/51), and the negative predictive value, 77.8% (14/18). The odds of presenting nodal metastasis at the time of surgical management were hence increased by 25% for each 1-point elevation of PDEF expression (odds ratio 1.250, 95% confidence interval 1.004-1.540,  $p = 0.002$ ). PDEF expression in the primary tumor thus appeared to be of interest as a molecular staging tool.

**PDEF and DKK1 expressions delineated different subgroups of aggressive breast cancers.** The secreted protein DKK1, involved in the Wnt/ $\beta$ -catenin canonic pathway, is emerging as a biomarker of shorter cancer survival [126]. We recently reported that DKK1 was preferentially expressed, at the transcriptional level, in the aggressive subgroup of ER-negative invasive breast cancers [96]. Since it was recently documented that PDEF could modulate the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [122], we wanted to compare the PDEF and DKK1 expression profiles. PDEF expression was effectively lower in DKK1-expressing tumors ( $1.7 \pm 1.4$  versus  $5.9 \pm 3.2$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 4<sup>m</sup>), and DKK1 was not detected among high PDEF expressing tumors. It was confirmed that PDEF was expressed in a different subgroup of tumors than DKK1. PDEF-expressing tumors were better differentiated (lower than grade III,  $p = 0.01$ ); a higher proportion expressed ER (93% vs 43%,  $p = 0.001$ ) and were disseminated to axillary lymph nodes (66% vs 38%,  $p = 0.01$ ). In summary, PDEF and DKK1 could delineate distinct aggressive subgroups of invasive breast cancers. The prognostic significance of

DKK1 and PDEF in terms of disease-free survival and overall survival remains to be evaluated.

## Discussion

This is the first study to assess the expression profile of PDEF, measured as a continuous variable, by a highly reproducible quantification method, in a substantial number of clinical specimens, characterized for classic clinicopathological parameters. The first main finding was the strong association between PDEF and the hormone receptor-positive breast cancer phenotype. The second was that high PDEF mRNA expression in the primary tumor was associated with a higher risk of regional metastasis to the lymph nodes, which remains the most important prognostic factor for survival at the time of breast cancer diagnosis.

High PDEF mRNA expression needs to be interpreted in relation to low PDEF protein expression found in prostate and breast carcinomas, when compared to normal tissues [111, 112, 121]. Specifically for breast cancer, immunohistochemical nuclear staining of PDEF was shown to be higher in the peritumoral normal breast epithelium in comparison to carcinoma cells of all differentiation grades, among 7 and 14 clinical samples [111, 112]. These authors noted the near absence of PDEF in the less differentiated grade III tumors. PDEF protein expression was unfortunately not compared with respective mRNA expression or ER status in the clinical samples tested, which limits comparison with our study.

Several observations can, however, be made. We have described significantly low PDEF mRNA expression in grade III tumors when compared to grades I and II (Figure 3<sup>m</sup>B), which appears consistent with a PDEF downregulation and low protein detection in grade III tumors. This is reconcilable with a scheme of epithelial to mesenchymal transition to neoplasia, in which PDEF expression could be lost during cancer progression. However, we cannot exclude that the majority of the few clinical specimens stained for PDEF were ER-negative in the studies cited. Low PDEF protein detection could also reflect the expected low PDEF transcription level in this ER-negative tumor phenotype, as we have observed at the mRNA level.

Nevertheless, low PDEF mRNA expression in normal breasts still translates into high protein nuclear detection [111]. Furthermore, low PDEF mRNA expression in breast cancer cell lines can be associated with sizeable protein expression (see MDA-MB-231, Figure 1<sup>m</sup>), and high PDEF mRNA expression, with barely detectable protein (see HCC-1428, Figure 1<sup>m</sup>). If PDEF is not mutated in cancer cells, it suggests the occurrence of post-transcriptional mechanisms, such as protein cleavage, homo- or heterodimerization, as reported for other Ets factor [102], fast degradation due to 2 PEST motifs contained in PDEF [108], or cytoplasmic instead of nuclear pooling [112]. If PDEF would qualify as a therapeutic target, it would further be important to investigate its protein expression in low PDEF mRNA normal tissues, such as the lungs and colon (Figure 2<sup>m</sup>).

The link between PDEF and cell motility has been the subject of recent publications. In clinical samples, we observed an increased risk of nodal metastasis when PDEF was highly transcript in the primary tumor (Figure 3<sup>m</sup>B and Table 2<sup>m</sup>). Other groups have documented PDEF mRNA overexpression in breast cancer micro- and macrometastasis to lymph nodes [113, 127]. These data suggest that PDEF can be transcribed in invasive breast cancer, and that PDEF could have a role in molecular staging, provided that an impact on patient survival would be further demonstrated prospectively, and have an impact on clinical decision-making. Considering the heterogeneity of breast cancers presenting lymph node metastasis, it is too speculative to think that the altered expression of one gene alone could accurately predict nodal involvement from a primary tumor sample. We believe that the potential role of PDEF in molecular staging lies in multi-gene predictive models [24, 128].

The association between PDEF mRNA overexpression and nodal metastasis has to be discussed in light of the recent work done on cell migration. Most studies have concluded that PDEF was anti-metastatic [111, 112, 115, 122]. In short, PDEF overexpression in transfected cell lines derived from approximately 8 breast or prostate cancer metastasis resulted in decreased cell migration, loss of pseudopodes, spheroid-morphological changes, increased proportion of cells in the G0 phase of the cell cycle.

Opposite effects were observed in PDEF knockdown cells (siRNA). Some underlying genetic mechanisms were also proposed to support the decrease in cell invasiveness, conditioned by PDEF, namely, the reduced uPA and increased Maspin [111], Survivin downregulation [112], and interaction with the TGF- $\beta$  pathway [122]. In contrast, PDEF overexpression yielded pro-metastatic effects in transfected HMEC normal breast cells, the MCF10A benign-fibrocystic disease-derived-breast cell line, in 4 pleural metastasis-derived breast cancer cell lines, in 1 melanoma and in 1 colon cancer cell line [114]. Interestingly, co-expression of PDEF and activated receptor tyrosine kinase Her-2/*neu*, or colony-stimulating factor receptor (CSF-1R) synergistically enhanced MCF10A metastatic attributes. How can the apparent bi-modal, anti- and pro-metastatic effects of PDEF can be explained?

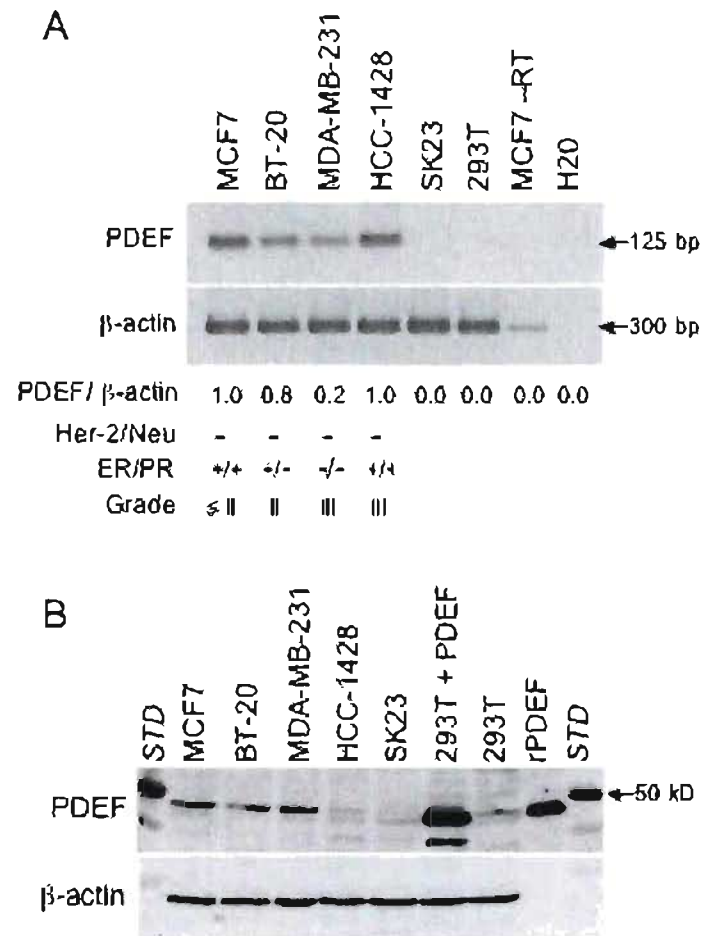
Three aspects may be considered in this regard. First, the loss of PDEF protein expression, combined with high PDEF mRNA expression, could be a stronger marker of pro-metastatic characteristics in advanced breast cancers. Secondly, PDEF overexpression in lower grade tumor, as well as studies with cell lines, reveal that PDEF may participate in the initiation or progression of early breast cancer. In fact, most anti-metastatic results have been documented in MDA-MB-231 mesenchymal-like, ER- and HER2/*neu*-negative pleural metastasis-derived breast cancer cell lines [111, 115], and in the PC-3 androgen-independent prostate cancer bone metastasis-derived cell line [122]. On the other hand, convincing pro-metastatic effects were noted in the benign disease breast cancer cell line MCF10A [114]. Finally, PDEF may function as a transcription activator or repressor, contingent on the cellular context, particularly through cooperation with hormone receptors [108] and the (ERK)/MAPK signaling pathway.

In conclusion, the PDEF transcriptional expression profile in clinical samples suggests potential uses in molecular staging, possibly for the heterogeneous subgroup of ER-positive tumors, and for early lymph node metastasis diagnostic purposes. Further findings on PDEF protein biology are needed to conclude if PDEF could represent an appropriate therapeutic target.

**Acknowledgments**

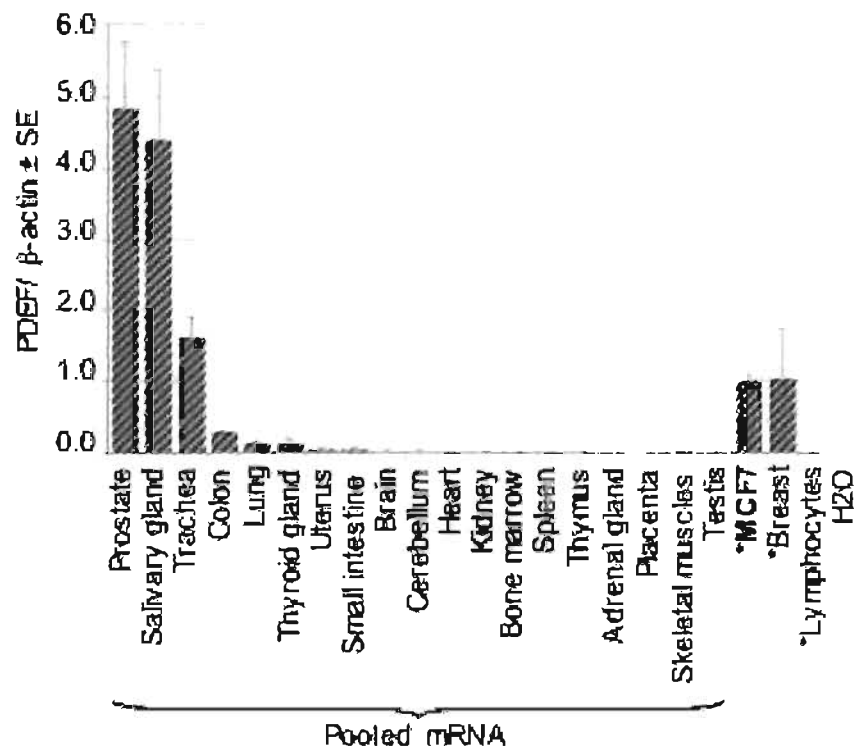
RL is the recipient of a Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) scholarship. ST and MAF are recipients of studentships from the Canderel Fund of the Institut du Cancer de Montréal. MAF is recipient of a FRSQ Ph.D. studentship. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the FRSQ Cancer Network, and La Fondation du CHUM. We thank Robert Boileau (Research Centre, CHUM) and Ali Filali (Anne-Marie Mes-Masson's laboratory, Research Centre, CHUM) for statistical assistance, Urszula Kzemien for the management of CHUM-FRSQ Tumor Bank, all contributing surgeons (Hôpital Notre-Dame and Hôtel-Dieu, CHUM), Jean-Simon Diallo (Anne-Marie Mes-Masson's laboratory, Research Centre, CHUM) for PCR optimization, and Ovid Da Silva (Research Support Office, Research centre, CHUM) for text editing.





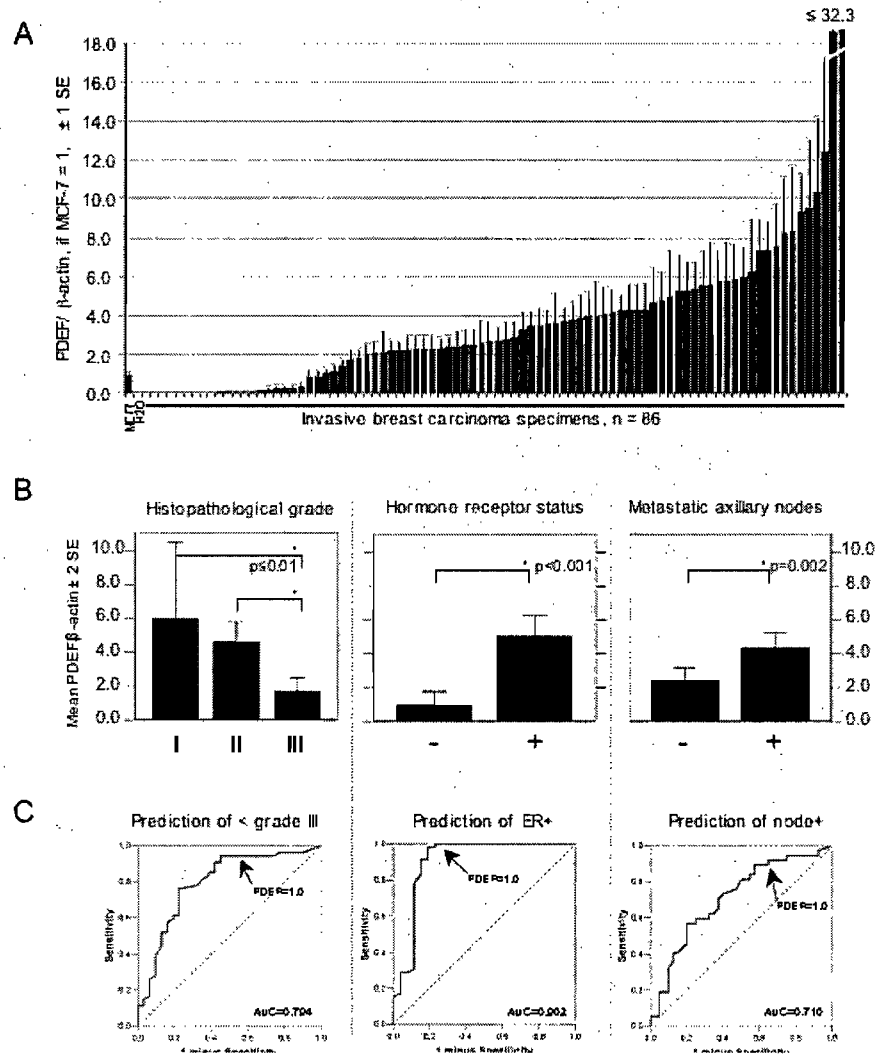
**Figure 1<sup>m</sup>** PDEF mRNA and protein expression in cancer cell lines.

**A.** Migration of PDEF amplicon obtained in cancer cell lines by real time RT-PCR, with relative quantification (PDEF/ $\beta$ -actin, if MCF7 = 1.0). Four cell lines derived from metastatic breast cancer (MCF7, BT-20, MDA-MB-231, and HCC-1428) figure with SK23 melanoma, and 293T renal embryonic cells used as negative controls. **B.** PDEF expression at the protein level by Western blot analysis. All results are representative of at least 3 independent experiments. ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; -RT, without reverse transcription; rPDEF, recombinant PDEF; SK23293T + PDEF, 293T cells transfected with PDEF.



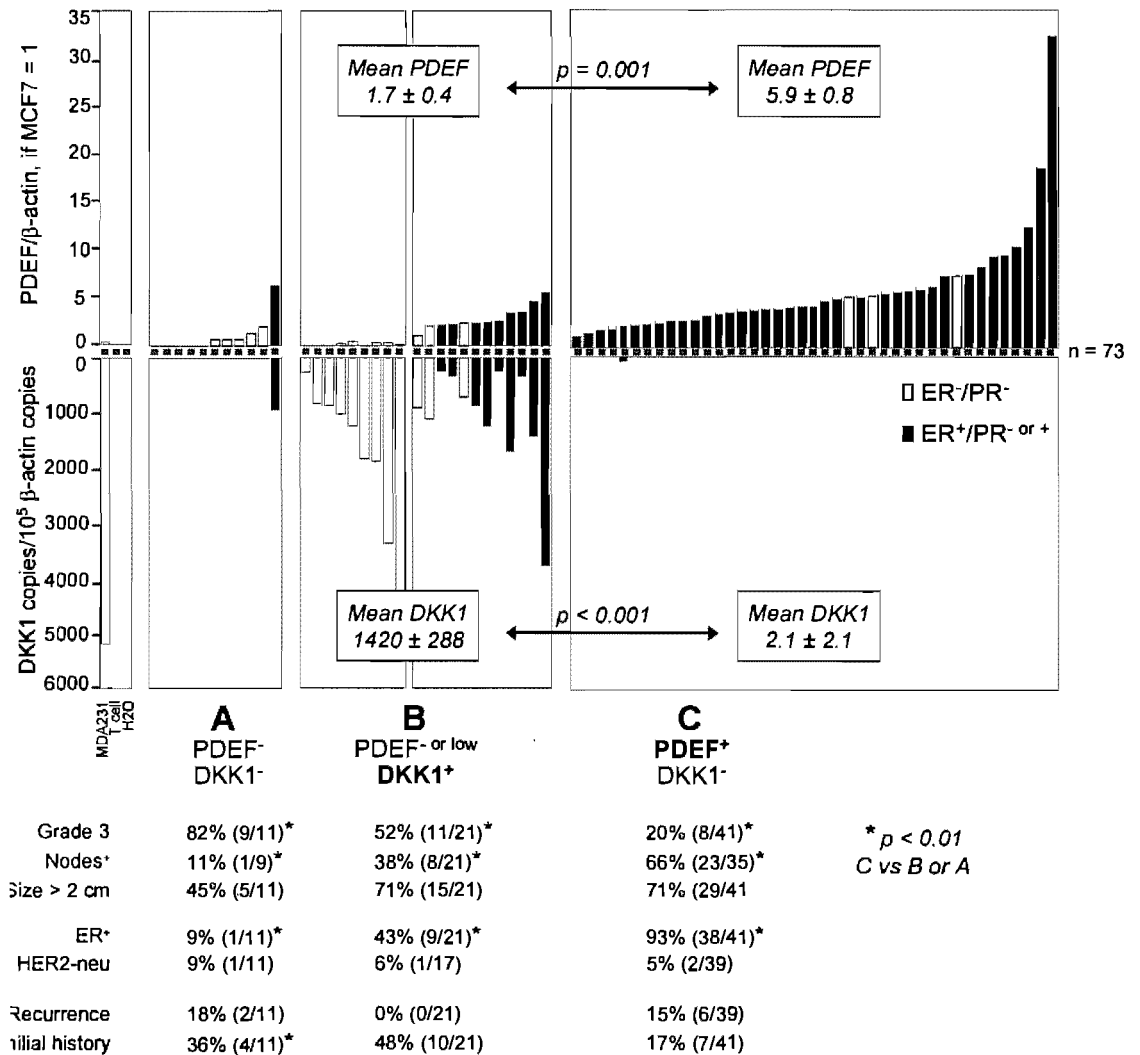
**Figure 2<sup>m</sup>** PDEF expression in normal tissues.

PDEF mRNA expression of a panel of 19 mRNA pools of normal tissues. \*Average level of 6 normal peri-tumoral breast tissues taken from patients operated on for breast cancer. Controls (Ctl) include the MCF7 breast cancer cell line and lymphocytes taken from the blood of breast cancer patients who contributed to the CHUM-FRSQ tumor bank. The error bars represent the intra- and inter-assay Ct variations, calculated with the Relative Expression Software Tool, except for the normal breast, where it represents the standard deviation of the 6 samples tested.



**Figure 3<sup>m</sup> PDEF expression in invasive breast carcinoma.**

**A.** PDEF expression in 86 tested clinical samples. Sixty-four tumors were found to express PDEF at a level at least equal to the MCF7 breast cancer cell line (above the dotted line). **B.** Higher PDEF expression was associated with moderately- to well-differentiated (grades I and II) tumors, with hormone receptor positivity (estrogen and/or progesterone), and with metastatic nodal involvement at the time of surgery. The same scale is used for the 3 graphs. **C.** Receiver-operator curves (ROC) allowed determination of the sensitivity and specificity at which the PDEF expression level was positively associated with the 3 clinicopathological factors illustrated in B. The MCF7 expression level (PDEF=1) is indicated by arrows. AUC, area under the curve; SE, standard error.



**Figure 4<sup>m</sup>** PDEF and DKK1 differential expression patterns.

PDEF (upper charts) and DKK1 (lower charts) transcriptional expression are presented in 3 groups. Group A are less differentiated, hormone receptor-negative tumors. DKK1 is overexpressed in Group B, with concomitant null or weak PDEF expression. Group C corresponds to tumors in which PDEF is overexpressed. In comparison with Groups A and B, Group C tumors more frequently involve axillary lymph nodes (Nodes<sup>+</sup>), although better differentiated (less than grade 3) and hormone receptor-positive. Legends: ER, estrogen receptor; MDA-MB-231 breast cancer cell line (experimental control); PR, progesterone receptor; T cell, T lymphocytes.

**Table 1<sup>m</sup> PDEF expression and clinicopathological factors of 86 invasive breast cancers**

Clinicopathological characteristics	Frequencies <sup>a</sup>		PDEF expression and association with clinicopathological factors		
	N	(%)	mean	95%CI	p-value <sup>b</sup>
<b>Age</b>					
< 50	15	(17.6)	2.6	1.4-3.7	
50 to 70	36	(42.4)	4.1	2.9-5.3	
> 70	34	(40.0)	3.9	1.8-6.0	0.516
<b>Primary or relapse</b>					
Primary	68	(79.1)	3.2	2.5-3.9	
Recurrence	10	(11.6)	7.5	0.2-14.8	
2 <sup>nd</sup> primary, contralateral	8	(9.3)	4.0	1.7-6.2	0.278
<b>Familial history</b>					
No	60	(69.8)	4.4	3.1-5.7	
Yes	26	(30.2)	2.4	1.4-3.4	0,060
<b>Histology</b>					
Ductal	66	(76.7)	3.4	2.6-4.3	
Lobular	13	(15.1)	5.7	0.6-10.7	
Other	7	(8.1)	3.6	0.6-6.7	0.267
<b>Histopathological grade<sup>c</sup></b>					
I (Good)	13	(15.1)	6.0	1.1-10.9	
II (Moderate)	41	(47.7)	4.6	3.5-5.8	
III (Poor)	31	(36.0)	1.7	0.9-2.5	0.003*
<b>Tumor size</b>					
T1 ( $\leq 2$ cm)	33	(38.4)	3.6	1.7-5.6	
T2 (2,1 to 5 cm)	46	(53.5)	4.1	3.0-5.2	
T3 (> 5 cm)	7	(8.1)	2.3	0.1-4.6	0.614
<b>Metastatic axillary nodes<sup>d</sup></b>					
Negative	40	(46.5)	2.4	1.6-3.2	
Positive	37	(43.0)	4.3	3.4-5.3	0.002
<b>Combined staging (AJCC)</b>					
I	20	(23.3)	2.3	1.5-3.2	
IIA	28	(32.6)	2.7	1.7-3.8	
IIB	16	(18.6)	5.8	4.2-7.3	$\leq 0,003$ †
IIIA	8	(9.3)	3.1	0.7-5.5	
IIIC	5	(5.8)	3.4	-0.3-7.1	
<b>Estrogene receptor status<sup>e</sup></b>					
Negative	31	(36.0)	2.0	0.6-3.4	
Positive	54	(62.8)	4.9	3.6-6.1	0,003
<b>Progesterone receptor status<sup>e</sup></b>					
Negative	37	(43.0)	2.0	1.1-2.9	
Positive	48	(55.8)	5.2	3.8-6.7	0,001
<b>HER2-neu overexpression<sup>f</sup></b>					
Negative	73	(84.9)	4.0	2.9-5.2	
Positive	5	(5.8)	2.9	-0.5-6.3	0.596

<sup>a</sup>Data do not always add up to 86 due to missing values; <sup>b</sup>p-value of T-student test for independent samples or one-way ANOVA when there was more than 2 categorical variables; <sup>c</sup>Scarff Bloom and Richardson classification, combined grade; <sup>d</sup>Nodal status is dichotomized since only 11 tumors were associated with 4 or more nodes (N2 and N3); <sup>e</sup>Immunohistochemical classification when doubtful. \*Average PDEF expression of grade III tumors is significantly lower than grade II or I. †Average PDEF expression of stage IIB is higher than stage I or IIB tumors, but not significantly different from stage III tumors. Abbreviation: PDEF, Prostate-derived Ets transcription factor; CI, confidence interval.

**Table 2<sup>m</sup>** Univariate and multivariate analyses of metastatic nodal involvement in the set of clinical samples tested for PDEF expression

Clinicopathological characteristics	Univariate		Multivariate <sup>a</sup>	
	<i>p</i> -value	Odds ratio (95%CI)	<i>p</i> -value	Odds ratio (95%CI)
<b>PDEF expression (continuous)</b>	0.002	1.34 (1.10-1.62)	0.002	1.250 (1.004-1.540)
<b>Differentiation, grade III vs I and II</b>	0.08	0.41 (0.14-1.08)	0.42	0.51 (0.14-1.88)
<b>Tumor size, &gt;2 cm vs ≤2 cm</b>	0.03	3.12 (1.12-8.70)	0.10	2.75 (0.89-8.34)
<b>HER-2/<i>neu</i>, positive vs negative</b>	0.93	1.09 (0.14-8.25)	0.48	2.38 (0.21-27.00)

<sup>a</sup>The multivariate model included 69 tumors, with 8 recurrent tumors for women who had already undergone axillary dissection for the primary tumor, 8 missing values for HER-2/*neu* and 1 missing tumor grade. CI, confidence interval.

## SECTION 3. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

*Cette partie contient des résultats qui n'ont pas été soumis pour publication. Elle est divisée en deux sous-sections. La première (3.1) concerne les résultats préliminaires sur l'immunogénicité de 15 peptides de PDEF, testés à l'aide des lymphocytes de quatre patientes. La deuxième (3.2) jette les bases nécessaires pour caractériser l'expression protéique de PDEF, à partir d'une micro-matrice de tissus et de lignées cellulaires (tissue micro-array). Nous avons jugé pertinent de présenter ces résultats pour l'intérêt méthodologique et parce qu'ils font partie intégrante de la validation de PDEF comme antigène tumoral. Ces résultats sont brièvement mis en contexte; la recension générale de la littérature se trouve dans l'introduction.*

### **3.1 Immunogénicité des peptides de PDEF testés avec les lymphocytes de quatre patientes**

#### 3.1.1 Justification

Certains produits de dégradation des protéines endogènes, nommés peptides, sont présentés à la surface des cellules tumorales par les CMH (Figure 2). La possibilité que des LTc CD8<sup>+</sup> reconnaissent des AT présentés par les CMH-I des cellules cancéreuses est un élément clé de l'immunothérapie [81, 129]. La présence d'un peptide d'un AT à la surface cellulaire peut cependant être plus ou moins abondante et ne garantit pas l'immunogénicité du peptide. Cette dernière doit être évaluée en fonction des différents sous-types de CMH-I, nommés HLA-A, HLA-B et HLA-C, qui sont eux-mêmes polymorphes. Étant donné que l'aide des LTh CD4<sup>+</sup> sensibilisés au même AT importe pour monter une réponse immunitaire efficace et soutenue, l'immunogénicité de peptides présentés par les CMH-II, qui comprend les sous-types HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR, doit aussi être caractérisée.

Nous avons choisi de débiter la caractérisation de peptides de PDEF présentés aux LTc CD8<sup>+</sup> par HLA-A\*0201, qui est retrouvé chez 50 à 60% de la population caucasienne. Des peptides nanomères (9 a.a.) et décimères (10 a.a.), qui ont la plus haute probabilité d'être présentés par cet allèle, ont été sélectionnés à l'aide d'algorithmes bioinformatiques. Une fois synthétisés, nous avons testé l'immunogénicité des peptides dans un système de cultures des lymphocytes de quatre patientes HLA-A\*0201 opérées pour un cancer du sein qui exprimait PDEF.

### 3.1.2 Matériels et méthodes

#### *Sélection bioinformatique de 15 peptides de PDEF restreints pour HLA-A\*0201*

Deux algorithmes, SYFPEITHI et Parker, ont été utilisés pour prédire les peptides nanomères et décimères qui présentent potentiellement les meilleures affinité et stabilité de liaison pour HLA-A\*0201 [130, 131]. Ces outils donnent à chaque peptide un rang, les premières positions représentant une plus grande affinité. L'algorithme PProC a été utilisé pour rejeter les peptides contenant des sites de clivages potentiels [132, 133].

#### *Culture cellulaire – Stimulation des lymphocytes et sensibilisation aux peptides de PDEF*

Les cultures cellulaires et les tests de reconnaissance ont été réalisés avec les lymphocytes de 4 patientes HLA-A\*0201. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de patientes consentantes, atteintes du cancer du sein, ont été obtenues par centrifugation dans un milieu de séparation (Ficoll). Les cellules mononucléées sont conservées dans l'azote liquide à -80 °C à une concentration de 5 à 10 x 10<sup>6</sup> cellules par ml de sérum bovin fœtal (Invitrogen et Wisent) ou de veau (Wisent), additionné de 10% de diméthyle sulfoxyde (Sigma; St-Louis, MO, É-U). Une évaluation de ces cellules par cytométrie de flux nous permet d'identifier les



patientes du phénotype HLA-A\*02 (Anticorps anti-HLA-A2, One Lambda; Canoga Park, CA, É-U). Le niveau d'expression de PDEF au sein des tumeurs réséquées chez ces patientes a été évalué tel que décrit dans le manuscrit (Section 2).

Pour procéder à la sensibilisation des cellules mononuclées de patientes HLA-A\*02 dont la tumeur primaire exprimait PDEF (Figure 4A), les PBMC sont décongelées et mises en culture à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans du milieu complet, qui comprend du AIM-V (Invitrogen; Carlsbad, CA) additionné de 5% de sérum humain AB (inactivé à 55 °C pendant 30 min, Gemini Bio-Products; Calabasas, CA), 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline/streptomycine et 10 µg/ml de gentamicine (tous de Invitrogen). La culture s'effectue dans des plaques de 96 puits à fond plat (Corning; Corning, NY), à 150 000 cellules/200 µl de milieu dans chaque puit, en 16 quintuplicata, qui correspondent aux 15 peptides de PDEF (Figure 5) et à un peptide de l'influenza (FLU-M1:58-66) utilisé comme contrôle positif. Les peptides sont toujours utilisés à une concentration de 1 mM. Pour compenser l'évaporation, 50 µl de milieu complet est ajouté au 5<sup>e</sup> jour.

En parallèle, nous obtenons, par différenciation des PBMC, des lymphocytes B (CD40-B) qui seront utilisés pour restimuler les lymphocytes mis en culture au jour 0 (Figure 4B). Les CD40-B autologues sont obtenus à l'aide d'un système de culture décrit précédemment [134], en présence de 250 ng/ml de CD40L soluble trimérique (Immunex Corporation; Seattle, WA), de 250 U/ml d'IL-4 recombinant humain (Peprotech; Rocky Hill, NJ) et de 0.66 µg/ml de cyclosporine dans du milieu Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Wisent) supplémenté des mêmes agents mentionnés ci-haut pour le milieu complet.

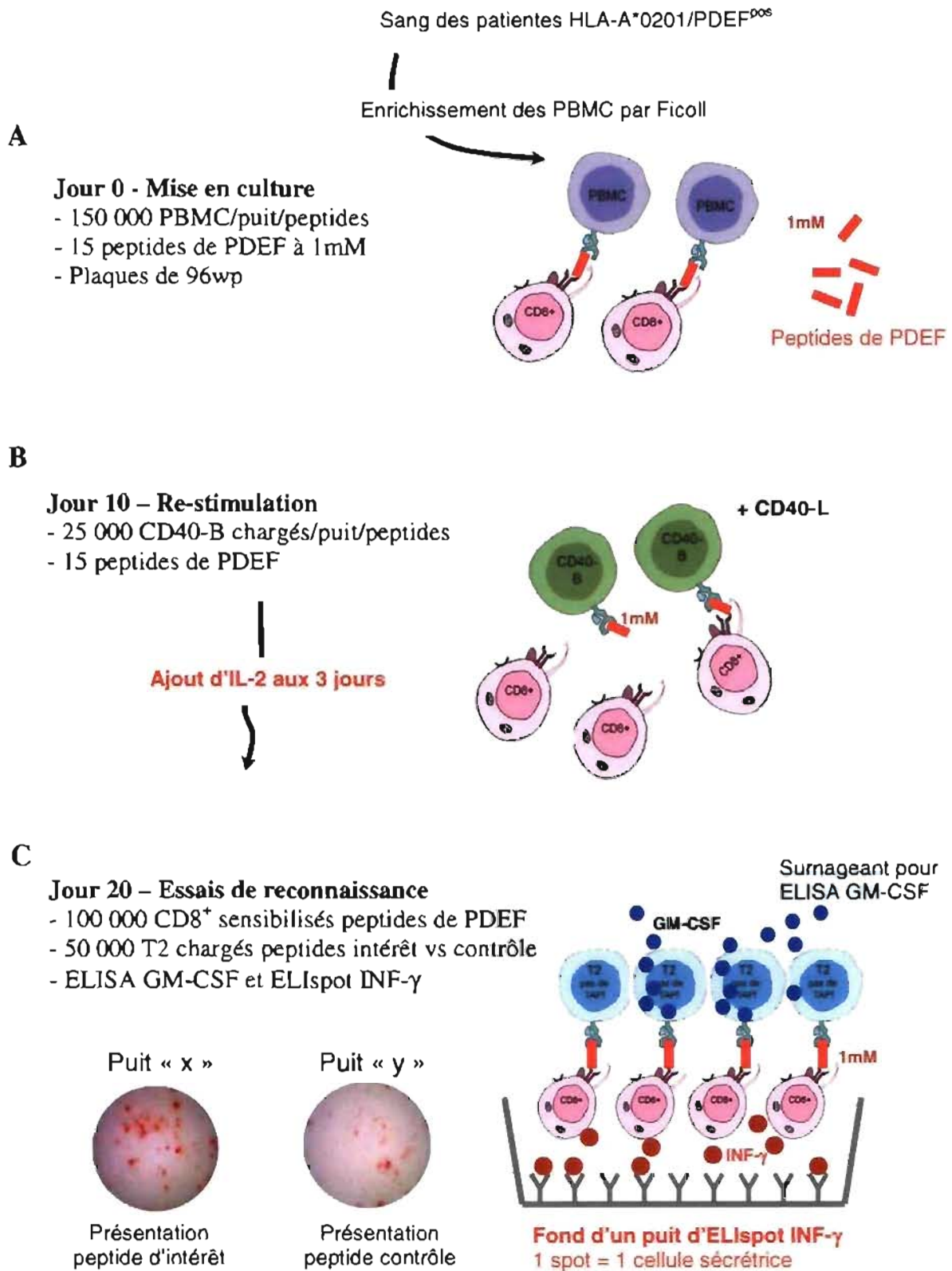
Au 10<sup>e</sup> jour de culture (Figure 4B), les PBMC initialement sensibilisées sont restimulées en étant mises en présence de 25 000 lymphocytes CD40-B qui ont été chargés pendant 3 heures à température de la pièce avec 1 µM des peptides respectifs. Afin de maximiser l'expression des molécules de co-stimulation, 250 ng/ml de CD40L est utilisé. À partir du 12<sup>e</sup> jour de culture, 150 UI/ml d'IL-2 recombinant (Chiron;

Emeryville, CA) est ajouté dans tous les puits aux 3 jours, dans le but de maximiser la croissance des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. L'immunogénicité relative des peptides est évaluée lors d'essais de reconnaissance effectués au 20<sup>ème</sup> jour de culture, environ une semaine après la re-stimulation par les CD40-B chargés de peptides (Figure 4C).

#### *Essais de reconnaissance des peptides de PDEF*

Les lymphocytes cytotoxiques dont la réponse est spécifique à un peptide devrait sécréter une grande quantité de cytokines lorsqu'on leur présente le peptide auquel il a été sensibilisé (Figure 4C). Les peptides d'intérêt ainsi qu'un peptide contrôle sont présentés aux lymphocytes sensibilisés chargés sur des lymphocytes HLA-A\*02 T2, déficients en TAP (ATCC, Manassas, VA). Cette particularité fait en sorte que les lymphocytes T2 sont incapables d'apprêter des protéines exogènes, ce qui rend disponibles les CMH de classe I, qui peuvent être chargés par d'autres peptides dans les modèles expérimentaux. Les T2 sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté (décrit précédemment). La sécrétion d'INF- $\gamma$  est mesurée par enzyme-linked immunospot assay (ELIspot), tandis que le GM-CSF est mesuré par enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) dans le surnageant de l'essai de reconnaissance.

En bref pour l'ELIspot, le fond des puits d'une plaque MultiScreen HTS (Millipore; Bedford, MA) est recouvert d'anti-corps monoclonal anti-INF- $\gamma$  (5  $\mu$ g/ml, Mabtech; Stockolm, Suède) incubé à 4 °C. Le lendemain, le fond de la plaque est bloqué pendant 2 h à 37 °C avec du milieu AIM-V complet. On détermine la quantité nécessaire de T2 (50 000 cellules/puit) qui sont chargés pendant 3 h dans des tubes de 15 ml à température de la pièce avec 1  $\mu$ M de peptides d'intérêt et contrôle. Une quantité suffisante de lymphocytes cibles (50 000 cellules par puit pour peptide intérêt et contrôle) est prélevée des cultures et resuspendue dans du milieu complet à 1 x 10<sup>6</sup> cellules/ml dans une plaque à 96 puits fond rond (Corning), centrifugée 5 min (400g) pour se départir du surnageant de culture. Les cellules cibles sont déposées dans les puits d'anti-INF- $\gamma$  bloqués, puis recouvertes des T2 chargés des peptides d'intérêt et contrôle. La révélation des spots d'INF- $\gamma$  et le dosage du GM-CSF par ELISA du



**Figure 4** Protocole de stimulation lymphocytaire avec les peptides de PDEF et épreuves de reconnaissance

surageant s'effectuent au troisième jour après une incubation d'une demi-journée à 37 °C.

L'ELISpot est révélé avec un anticorps secondaire anti-INF- $\gamma$  biotynilé (filtré à 0.22  $\mu$ m, 2 h d'incubation, 2  $\mu$ g/ml, Mabtech) et d'une solution de Streptavidine-HRP (45 min, 1:1000, Mabtech) après 6 lavages au PBS/0.01% Tween 20 (Sigma). La réaction est provoquée avec le substrat AEC (0,1N acide acétique, 0,1M acétate de sodium et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) puis arrêtée après 5 min par lavage à l'eau distillée. Lorsque la plaque est sèche, les points sont comptés à l'aide du compteur automatisé ImmunoSpot Analyzer Series 3B (Cellular Technology Ltd, Cleveland, OH) et des logiciels Image Acquisition (Version 4.0) et ImmunoSpot (Version 3.2).

L'ELISA pour GM-CSF est effectué dans une plaque 96 puits à fond plat (Nunc, Apogent Technologies; Portsmouth, NH) recouverte d'anticorps primaire anti-GM-CSF (1:2500, Endogen; Woburn, MA). Une courbe standard allant de 1000 pg/ml à 16 pg/ml est faite avec du GM-CSF recombinant (Endogen). Les lavages sont faits au PBS/0.5% Tween 20. L'anticorps secondaire anti-GM-CSF biotynilé (1:350, Endogen) est utilisé pour la révélation avec du Poly-HRP20-streptavidin (1:4000, Research Diagnostic; Flanders, NJ) et du substrat TMB (Neogen; Lexington, KY). La réaction est arrêtée avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

La sécrétion de cytokines est considérée significative si, pour INF- $\gamma$ , au moins 10 points sont comptés suite à la présentation du peptide d'intérêt et que le décompte est deux fois plus grand que pour le peptide contrôle. Pour GM-CSF, la sécrétion doit être supérieure à 50 pg/ml et deux fois plus grande que pour le peptide contrôle. Le contrôle expérimental positif utilisé pour chaque essai était 5000 lymphocytes par puit stimulés avec PMA/ionomycine (50 ng/ml et 250 ng/ml respectivement). Le contrôle négatif consiste en des puits vides. Le niveau de sécrétion de base de cytokine a été évalué dans des puits contenant des lymphocytes cibles, mais sans présentation de peptides.

### 3.1.3 Résultats

#### *Sélection bioinformatique de 15 peptides de PDEF restreints pour HLA-A\*0201*

Les résultats combinés des trois algorithmes nous ont permis de choisir les 15 peptides nanomères et décimères les plus susceptibles de se lier avec grande affinité aux niches peptidiques HLA-A\*0201, et avec le moins de risques de contenir des sites de clivage du protéasome (Figure 5A). Six peptides se chevauchent, dont 5 dans la région amino-terminale de la protéine, qui sont mieux classés par l'algorithme SYFPEITHI que Parker.

Trois peptides appartiennent complètement ou en grande partie au domaine Ets de liaison avec l'ADN (248-332), hautement conservé entre les espèces (Figure 5B). Trois autres peptides se retrouvent dans un domaine de liaison avec d'autres protéines (SAM-Pointed-domain) (142-210), dont 2 sur un motif PEST (161-186), qu'on retrouve dans les protéines de courte demi-vie. L'autre motif PEST (19-53) ne contient pas de peptide.

#### *Immunogénicité des 15 peptides de PDEF testés chez 4 patientes HLA-A\*0201*

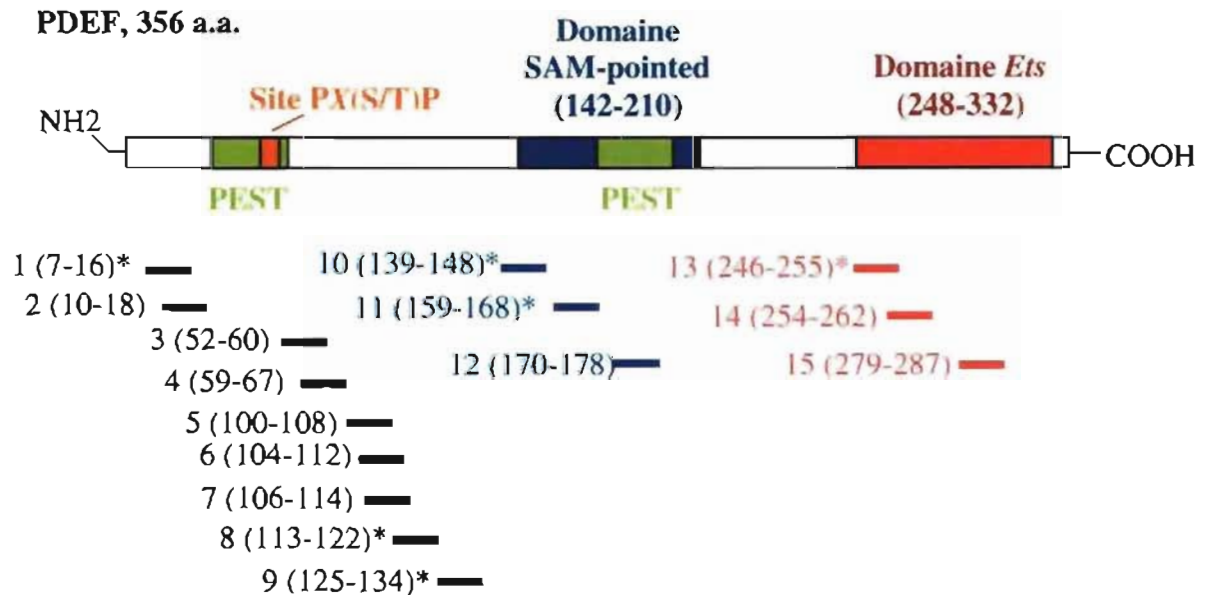
Le Tableau 4 présente les résultats compilés des essais de reconnaissance effectués avec les lymphocytes de 4 patientes HLA-A\*0201 opérées d'un cancer du sein qui exprimait PDEF à différents niveaux. Au total, 25 cultures cellulaires ont été réalisées pour chacun des 15 peptides de PDEF et pour le peptide FLU-M1 58-66. Lorsqu'on a comparé les sécrétions de cytokines par les lymphocytes en réponse à la présentation du peptide avec lequel ils avaient été sensibilisés, à la sécrétion provoquée par la présentation d'un peptide contrôle, certaines lignées sécrétaient significativement plus d'INF- $\gamma$  ou du GM-CSF, et plus rarement les deux cytokines. Ces indices de l'immunogénicité potentielle des peptides sont représentés dans les trois colonnes centrales du Tableau 4.

A

#	Peptides	Séquences	Score Parker	Score SYFPEITHI	Score PAProC
1	7-16*	GLSSVSPSHL	5	4	1 sur 3
2	10-18	SVSPSHLLL	16	12	1 sur 3
3	52-60	EQGLSAFYL	7	- <sup>†</sup>	3 sur 3
4	59-67	YLSYFDMLY	20	élevé <sup>‡</sup>	3 sur 3
5	100-108	APAGSLDLV	33	10	2 sur 3
6	104-112	SLDLVPGGL	25	5	1 sur 3
7	106-114	DLVPGGLTL	18	3	3 sur 3
8	113-122*	TLEEHSLEQV	6	1	3 sur 3
9	125-134*	MVVGEVLKDI	9	21	3 sur 3
10	139-148*	KLLNTADPM	3	22	2 sur 3
11	159-168*	LLWTEHQYRL	1	2	3 sur 3
12	170-178	PMGKAFQEL	30	23	1 sur 3
13	246-255*	GQPIHLWQFL	7	élevé	3 sur 3
14	254-262	FLKELLKP	-	11	1 sur 3
15	279-287	FKIEDSAQV	17	26	3 sur 3

\*Peptides décimers †Non classé par l'algorithme. ‡Décompte exacte non fait, faible affinité selon l'algorithme SYFPEITHI

B



**Figure 5** Sélection de 15 peptides de PDEF restreints pour HLA-A\*0201

**Figure 5 Sélection de 15 peptides de PDEF restreints pour HLA-A\*0201****Légende :**

- A.** Classement des peptides nanomeres et décameres(\*) sélectionnés à partir des algorithmes bioinformatiques (Parker et SYFPEITHI) d'affinité des motifs d'a.a. aux CMH de classe I restreints pour HLA-A\*0201. Les peptides qui pourraient contenir des sites de clivage lors de l'apprêtement de PDEF par le protéasome ont été rejetés selon les probabilités établies par l'algorithme PProC.
- B.** Représentation schématique de la protéine PDEF et de ses régions d'intérêt. Le domaine Ets, de liaison à l'ADN, se trouve très près de la queue carboxy-terminale (COOH) de la protéine. Le domaine SAM pointed est un site de liaison protéine:protéine. Ce dernier contient un motif PEST (a.a. 161-186), riche en proline, glutamate, sérine et/ou thréonine, retrouvé dans les protéines de courte demi-vie. Un autre motif PEST (a.a. 19-53) se trouve plus près de l'extrémité amino-terminale (NH<sub>2</sub>). Ce motif contient aussi un domaine privilégié PX(S/T)P de phosphorylation par les voies MAPK.

Pour donner une appréciation globale de la réponse effectrice des lymphocytes sur présentation des peptides, la dernière colonne du Tableau 4 représente le pourcentage total de lignées positives pour l'une ou l'autre des cytokines. Pour mieux apprécier l'immunogénicité relative des peptides, le Tableau 5 reprend les résultats de la colonne « INF- $\gamma$  et GM-CSF » du Tableau 4, qui sont les critères les plus stricts de l'immunogénicité potentielle des peptides, et les représente en fonction des quatre patientes testées.

À l'analyse, 8 peptides de PDEF (7-16; 104-112; 106-114; 125-134; 139-148; 159-168; 170-178; et 279-287) ont été incapables de monter une réponse immunitaire spécifique, générant peu de lignées positives, sans aucune concordance entre la sécrétion d'INF- $\gamma$  et de GM-CSF. C'est le cas des trois peptides (139-148; 159-168; 170-178) appartenant au domaine SAM de la protéine. Le peptide (139-148) n'a généré aucun résultat positif.

Le peptide 254-262, contenu dans la région Ets de PDEF, a généré au total presque autant de lignées positives (44%) que le peptide du virus influenza FLU-M1 58-66 (48%), utilisé comme contrôle positif (Tableau 4). Notons qu'environ 20% des lignées présentaient une sécrétion significative d'INF- $\gamma$  et de GM-CSF, résultat semblable à ceux obtenus avec FLU-M1 58-66. Les résultats significatifs obtenus avec le peptide PDEF 254-262 sont répartis chez 3 patientes, tandis qu'ils l'étaient chez 2 patientes pour FLU-M1 58-66 (Tableau 5). De manière analogue, quoiqu'un peu moins franche, l'immunogénicité de 2 autres peptides s'est démarquée, soit PDEF 100-108 et 246-255. Ce dernier peptide décamer appartient aussi au domaine Ets. Finalement, 4 autres peptides (10-18; 52-60; 59-67; 113-122) ont généré des résultats intermédiaires.

Aucune association entre le niveau transcriptionnel de PDEF dans les tumeurs primaires des patientes opérées et le nombre de lignées lymphocytaires positives observées aux tests de reconnaissance n'est notée (Tableau 5). Par exemple, 5 peptides de PDEF ont généré des résultats positifs chez la patiente 81, bien que sa tumeur primaire exprimait le moins de PDEF (ARNm PDEF/ $\beta$ -Actine = 2,5).



Peptides	Nombre de lignées positives (25 lignées / peptide)			Total <sup>d</sup> %
	INF- $\gamma$ <sup>a</sup>	GM-CSF <sup>b</sup>	INF- $\gamma$ et GM-CSF <sup>c</sup>	INF- $\gamma$ ou GM-CSF
7-16*	2	1	0	12
10-18	1	3	1	12
52-60	3	1	1	12
59-67	4	2	1	20
100-108	6	2	2	24
104-112	0	1	0	4
106-114	0	4	0	16
113-122*	5	4	1	32
125-134*	3	3	0	24
139-148*	0	0	0	0
159-168*	3	1	0	16
170-178	1	2	0	12
246-255*	3	3	2	16
254-262	5	9	3	44
279-287	5	1	0	24
FLU-M1 58-66†	9	6	3	48

<sup>a</sup> Testées en ELIspot, les lignées sont jugées positives lorsque le décompte des points est 2 fois plus important lors de la présentation du peptide d'intérêt plutôt que du peptide contrôle, au minimum 10 points par puit; <sup>b</sup> Quantité de GM-CSF dosée par ELISA dans le surnageant des puits d'ELIspot, où une lignée est jugée positive si elle sécrète deux fois plus de GM-CSF lors de la présentation du peptide d'intérêt vs du peptide contrôle, au minimum 50 pg/ml par puit; <sup>c</sup> Lignées positives pour INF- $\gamma$  et pour GM-CSF;

<sup>d</sup> nombre absolu de lignées positives, soit pour INF- $\gamma$  ou pour GM-CSF, sur un total de 25 lignées par peptide;

\*Peptides décimers, les autres comprennent 9 acides aminés. Les peptides bleus chevauchent ou appartiennent à la région « Pointed-domain » de PDEF. Les peptides rouges chevauchent ou appartiennent à la région « Ets binding domain ». Les peptides sont restreints pour HLA-A\*0201; † Contrôle positif

**Tableau 4 Lignées lymphocytaires cytotoxiques et spécifiques aux peptides de PDEF**

Peptides	Patientes, Banque CHUM-FRSQ (ARNm PDEF/ $\beta$ -Actin)			
	#23 (18.6) <sup>†</sup>	#81 (2.5)	#114 (3.6)	#119 (7.4)
7-16*	-	-	-	-
10-18	+ <sup>§</sup>	-	-	-
52-60	-	-	-	+
59-67	-	+	-	-
100-108	+	+	-	-
104-112	-	-	-	-
106-114	-	-	-	-
113-122*	-	+	-	-
125-134*	-	-	-	-
139-148*	-	-	-	-
159-168*	-	-	-	-
170-178	-	-	-	-
246-255*	-	+	+	-
254-262	-	+	+	+
279-287	-	-	-	-
FLU-M1 58-66	+	-	-	+

\* Peptides décimers, les autres comprennent 9 acides aminés; † expression relative de PDEF par rapport au gène de référence  $\beta$ -Actine, tel que calculé dans la SECTION 2. MANUSCRIT;  
<sup>§</sup> Sont classées positives les lignées de lymphocytes qui sécrétaient deux fois plus de GM-CSF (ELISA) et d'INF- $\gamma$  (ELISpot) lors de la présentation du peptide d'intérêt comparé au contrôle.

**Tableau 5 Immunogénicité des peptides de PDEF, représentée en fonction des lignées lymphocytaires des quatre patientes HLA-A\*02 testées**

Il ne semble pas y avoir de bonne corrélation entre l'affinité prédite par les algorithmes bioinformatiques (Figure 2A) et l'immunogénicité observée *ex vivo* en culture. Prenons pour exemple le peptide 159-168, qui avait obtenu les meilleurs scores Parker et SYFPEITHI (1<sup>er</sup> rang et 2<sup>ème</sup> rang, respectivement), avec une faible probabilité de contenir un site de clivage (PAProC 3 sur 3), il a généré peu de lignées positives, sans concordance entre les sécrétions d'INF $\gamma$  et de GM-CSF. *A contrario*, le peptide 254-262, qui a généré les meilleurs résultats, n'avait pas pu être classé par l'algorithme Parker, arrivait au 11<sup>e</sup> rang de SYFPEITHI et avait plus de risques de contenir un site de clivage (PAProC 1 sur 3). Ceci confirme la nécessité de tester l'immunogénicité des peptides par approches cellulaires expérimentales.

En conclusion de cette partie, les expériences de stimulation lymphocytaire à l'aide de 15 peptides restreints pour HLA-A\*0201 choisis par approche bio-informatique ont permis d'identifier 3 peptides potentiellement les plus immunogéniques, soit PDEF 254-262, 100-108 et 246-255. Les études subséquentes, qui seront faites à partir des lymphocytes d'autres personnes, devraient toutefois prendre en considération les autres peptides qui ont généré des résultats positifs, étant donné la variabilité interindividuelle causée par les différents HLA-A\*02 et les conditions expérimentales.

## 3.2 Mise au point d'une micro-matrice de tissus cancéreux et de lignées cellulaires en vue de caractériser l'expression protéique de PDEF

### 3.2.1 Justification

L'analyse de la transcription de PDEF dans les cellules cancéreuses nous a permis de préciser dans quel phénotype de cancers du sein ce gène était surexprimé. Sa traduction en protéine représente une étape d'expression subséquente. Du point de vue de l'immunothérapie, la possibilité que des AT soient reconnus par les lymphocytes dépend de la traduction protéique de PDEF en quantité appréciable, puis de sa dégradation en peptides pouvant être acheminés à la surface cellulaire dans les poches peptidiques des CMH.

#### *Expression protéique de PDEF dans les lignées cellulaires de cancer du sein*

La détection de PDEF par Western Blot à partir des lignées de cancer du sein (Figure 1<sup>m</sup>B) nous indique déjà qu'il pourrait y avoir une discordance entre les niveaux de transcription génique et de traduction protéique de PDEF. En effet, on ne détecte pas la protéine dans la lignée HCC-1428, qui exprime pourtant au moins autant d'ARNm que les lignées MCF7 et BT-20. D'autre part, on détecte la protéine dans la lignée MDA-MB-231, qui exprime toutefois 5 fois moins d'ARNm de PDEF que les lignées sus-mentionnées. La spécificité de la bande protéique détectée dans ces expériences a été établie avec la protéine PDEF recombinante (rPDEF), qui avait été séquencée à l'aveugle par un autre laboratoire. Cette apparente discordance entre l'expression protéique et génique de PDEF a par ailleurs déjà été notée par une autre équipe, pour d'autres lignées de cancer du sein (SK-BR3 et MDA-MB-361) [111].

#### *Expression protéique de PDEF dans les échantillons cliniques de cancer du sein*

L'état actuel des connaissances sur l'expression protéique de PDEF dans les tissus de cancer du sein a d'abord été documentée à partir de 7 échantillons cliniques

dont le statut des récepteurs hormonaux n'était pas précisé [111]. Ces auteurs ont noté que le marquage nucléaire semblait prédominer dans l'épithélium de sein normal et dans les tumeurs les mieux différenciées. Pour 3 tumeurs de grade III (pauvrement différenciées), on rapporte un marquage nucléaire de PDEF dans environ 25% des noyaux, tandis qu'il oscillait entre 25 et 75% des noyaux pour 4 tumeurs de grade II (modérément différenciées), et était présent dans tous les noyaux de l'épithélium normal. Un autre groupe a récemment fait des observations semblables à partir de 14 échantillons cliniques de cancer du sein [112].

Les deuxième, troisième et quatrième paragraphes de la discussion de notre manuscrit (Section 2) présentent une analyse de la relation entre l'expression protéique et transcriptionnelle de PDEF. En réponse à cela, nous avons décidé de construire une micro-matrice tissulaire et cellulaire (*tissue microarray*) afin de : 1) mettre au point les conditions immunohistochimiques optimales de détection de la protéine PDEF, 2) comparer simultanément les niveaux d'expression de PDEF dans un nombre suffisant d'échantillons cliniques, de lignées cellulaires de cancer du sein et de tissus normaux, puis, finalement 3) tester si l'absence de détection de PDEF au niveau protéique, dans les tumeurs de grade III, ne s'expliquerait pas mieux par le phénotype et l'absence d'expression de ER, que par le degré de différenciation des tumeurs testées.

### 3.2.2 Matériels et méthodes

#### *Choix des tissus et des contrôles*

La confection de la micro-matrice tissulaire a été réalisée à partir des tumeurs de patientes consentantes, archivées en bloc de paraffine au département de pathologie de l'Hôtel-Dieu du CHUM (Montréal, Québec, Canada). La figure 6 A et B résume la disposition des tissus d'intérêt et des contrôles. En bref, les échantillons tumoraux et les ganglions métastatiques de 3 patientes ont d'abord été sélectionnés, soit : #104 (grade III, PDEF<sup>neg</sup> / ER<sup>neg</sup>), #113 (grade III, PDEF<sup>low</sup> / ER<sup>neg</sup>) et # 127 (grade III,

PDEF<sup>high</sup> / ER<sup>pos</sup>). Les ganglions normaux de la patiente 127, le tissu de sein normal péri-tumoral de la patiente #113, du tissu de réduction mammaire et 6 tissus d'organes normaux ont été ajoutés à la matrice (département de pathologie du CHUM-Notre-Dame). Comme lignées cellulaires, nous avons choisi : MCF7 (PDEF<sup>pos</sup> / ER<sup>+</sup>), MCF7 transfectée avec un plasmide pcDNA3.1 contenant PDEF, inséré après un promoteur, MDA-MB-231 (PDEF<sup>low</sup> / ER<sup>-</sup>) de notre laboratoire et d'un autre laboratoire (données par Peter M. Siegel, Research Institute of the McGill University Health Centre, Cancer and Musculoskeletal Axis), et comme contrôles négatifs les mélanomes SK23 et 1088mel (PDEF<sup>neg</sup> / ER<sup>-</sup>), les cellules embryonnaires de rein 293 et des lymphocytes T2. Ces cellules sont cultivées dans du milieu RPMI supplémenté, décrit précédemment.

#### *Préparation des lignées cellulaires pour la micro-matrice*

Cinq à 10 x 10<sup>6</sup> cellules sont mises en culot dans des tubes coniques de 1,5 ml, dans du paraformaldéhyde. Le culot est homogénéisé dans 50 µl d'Histogel (Richard-Allan Scientific, Calamazoo, MI) à 30°C et refroidi à 4°C pendant 30 min pour qu'il durcisse. Le culot est ensuite récupéré, mis dans une cassette et en circulation pour déshydratation et fixation jusqu'au lendemain matin, selon le protocole standard du département de pathologie de l'hôpital Notre-Dame (CHUM), puis enrobé en bloc de paraffine.

#### *Confection de la micro-matrice de cellules et de tissus*

La micro-matrice a été confectionnée à la plateforme d'histologie du D<sup>r</sup> Louis Gaboury de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC) de l'Université de Montréal, avec l'aide du D<sup>re</sup> Francine Jolicoeur. En bref, des carottes de 1 mm sont prélevées dans les blocs de paraffine des lignées cellulaires et des tissus d'archive de cancer du sein examinés au microscope. Ces carottes sont alignées dans un second bloc de paraffine servant de support, selon le plan établi (Figure 6B). Des

A

#	Description
1	MCF7 (PDEF <sup>POS</sup> / ER <sup>POS</sup> )
2	MCF7 (PDEF <sup>POS</sup> / ER <sup>POS</sup> )
3	MCF7 + pcDNA3.1 PDEF
4	MCF7 + pcDNA3.1 PDEF
5	MDA-231 (PDEF <sup>low</sup> / ER <sup>neg</sup> ) Lapointe
6	MDA-231 (PDEF <sup>low</sup> / ER <sup>neg</sup> ) Lapointe
7	MDA-231 (PDEF <sup>low</sup> / ER <sup>neg</sup> ) Siegel
8	Mélanome SK23
9	Mélanome SK23
10	Rein embryonnaire 293
11	Mélanome 1088mel
12	Lymphocytes T2
13	Tumeur FRSQ #113 (PDEF <sup>low</sup> /ER <sup>neg</sup> )
14	Ganglion FRSQ #113
15	Tumeur FRSQ #104 (PDEF <sup>neg</sup> /ER <sup>neg</sup> )
16	Ganglion FRSQ #104
17	Tumeur FRSQ #127 (PDEF <sup>high</sup> /ER <sup>pos</sup> )
18	Ganglion FRSQ #127
A	Foie
B	Système nerveux central
C	Peau fœtale
D	Placenta
E	Rein
F	Derme fœtal
G	Ganglion normal FRSQ #127
H	Sein normal (réduction)
I	Sein péri-tumoral FRSQ #113

B

Lame type								
<i>Identification de la lame</i>								
A	1	3	5	7	8	10	11	12
B	2	4	6	7	9	10	11	12
C							F	I
D	13	14	15	16	17	18	G	I
E	13	14	15	16	17	18	H	I

C

Anticorps	Concentrations	Protocoles								
		800	803	808	816	817	818	820	821	822
PDEF (Watson)	1 : 50	x	x	x						
	1 : 100	x	x	x						
	1 : 200	x	x	x	x	x	Oui	x	x	x
ER 6F11 (Ventana, Tucson, AZ)	1 : 1		Oui							
ER 1D5 (DakoCytomation, Carpinteria, CA)	1 : 5					Oui				
PDEF (ZYMED, San Francisco, CA)	1 : 10	x	x	x						
ER h151 (Stressgen, Victoria, BC, Canada)	1 : 10	x	x	x						

**Figure 6** Micro-matrice tissulaire et cellulaire, et immunohistochimie

**Figure 6      Micro-matrice tissulaire et cellulaire, et immunohistochimie****Légende :**

- A.** Numérotation et description des lignées cellulaires et des tissus qui ont servi à la confection de la matrice. Au niveau transcriptionnel, la lignée MDA-231 (ER<sup>-</sup>), exprime 5 fois moins de PDEF que la lignée MCF7 (ER<sup>+</sup>). Les autres lignées cellulaires sont des contrôles négatifs, autant pour PDEF que pour le récepteur œstrogène. Les tumeurs # 104 et 113 de la banque CHUM-FRSQ sont ER<sup>-</sup>, aucune transcription de PDEF n'est détectée chez #104 (PDEF<sup>neg</sup>), tandis que #113 l'exprime au même niveau que la lignée MDA-MB-231 (PDEF<sup>low</sup>). La tumeur #127 (PDEF<sup>high</sup>) est ER<sup>+</sup> et exprime 4 fois plus PDEF que la lignée MCF7, soit 20 fois plus que la lignée MDA-MB-231.
- B.** Lame type, schéma de la matrice, disposition des lignées cellulaires et des tissus.
- C.** Protocole de révélation, anticorps testés et résultats obtenus. Un « x » représente une condition testée. Un « oui » signifie qu'un marquage spécifique a été obtenu.

*Abréviation :* ER, récepteur œstrogène alpha



coupes de 3  $\mu\text{m}$  sont faites au microtome à partir du bloc de la matrice, puis déposées sur lames de verre.

### *Immunohistochimie*

Nous avons tenté de révéler deux anticorps pour PDEF. Le premier, produit et donné par Dr Denis K Watson (Hollings Cancer Center, Medical University of South Carolina, Charleston), était immunopurifié, polyclonal, de lapin, et rapporté dans une publication [111]. Le second (Zymed Laboratories, Invitrogen immunodetection, San Francisco, CA) était polyclonal, de lapin. Trois anticorps anti-récepteur de l'œstrogène alpha (ER- $\alpha$ ) ont été testés, soit le ER6F11 (souris, monoclonal; Ventana, Tucson, AZ), le ER1D5 (souris, monoclonal; Dako Cytomation, Carpinteria, CA) et le ERh151 (souris, monoclonal; Stressgen Bioreagents, Victoria, C-B, Canada). La révélation s'est faite avec un système unique d'anticorps secondaire (Discovery XT universal secondary antibody, Ventana).

Tous les essais ont été faits sur un appareil d'immunohistochimie automatisé (Discovery XT staining Module, Ventana). Pour la détection de PDEF, 9 protocoles de révélation ont été tentés (Figure 6C). En résumé, les tissus sont tous déparaffinés de la même manière (EZ prep, Ventana). Aucun prétraitement pour exposer les épitopes n'est utilisé dans le protocole 800, tandis que pour les autres conditions, les lames sont chauffées à 37°C, sauf pour 4 protocoles (816, 817, 818, 822), puis prétraitées pendant 4 ou 8 min (820 et 822) au tampon CC1 (pH 8.0, EDTA; Ventana), ou pendant 4 min au tampon CC2 (pH 6.0, Citrate; Ventana) pour le protocole 808. L'anticorps primaire est incubé aux concentrations spécifiées (Figure 6C) durant 60 min à température de la pièce, 120 min pour le protocole 821, avant l'incubation de 32 min à température de la pièce de l'anticorps secondaire biotinylé. La révélation est faite au DAB (Sigma chemicals, St-Louis, MO) et la coloration de fond à l'hématoxyline de Meyer. Des contrôles sans anticorps primaires ont été faits pour l'anticorps secondaire.

### 3.2.3 Résultats

#### *Validation de la technique, détection du récepteur de l'œstrogène alpha*

Les anticorps ER6F11 et ER1D5 ont généré des résultats positifs en suivant les protocoles 803 et 817, respectivement (Figure 6C, cases « Oui »). Le récepteur de l'œstrogène alpha, surtout nucléaire, est réputé difficile à révéler. Les résultats obtenus avec l'anti ER6F11 (Figure 7, colonne de droite) valident la technique de révélation automatisée et la spécificité de cet anticorps. L'expression de ER est détectée dans les MCF7 (Figure 7A et B, cases de droite), dans la tumeur primaire de la patiente #127 (Figure 7D, case de droite), la métastase ganglionnaire (Figure 7F, case de droite) et le sein normal (Figure 7E, case de droite), tandis qu'il n'y a aucune détection dans la lignée MDA-MB-231 (Figure 7C, case droite) et dans le ganglion normal (Figure 7G, case droite).

#### *Détection de PDEF*

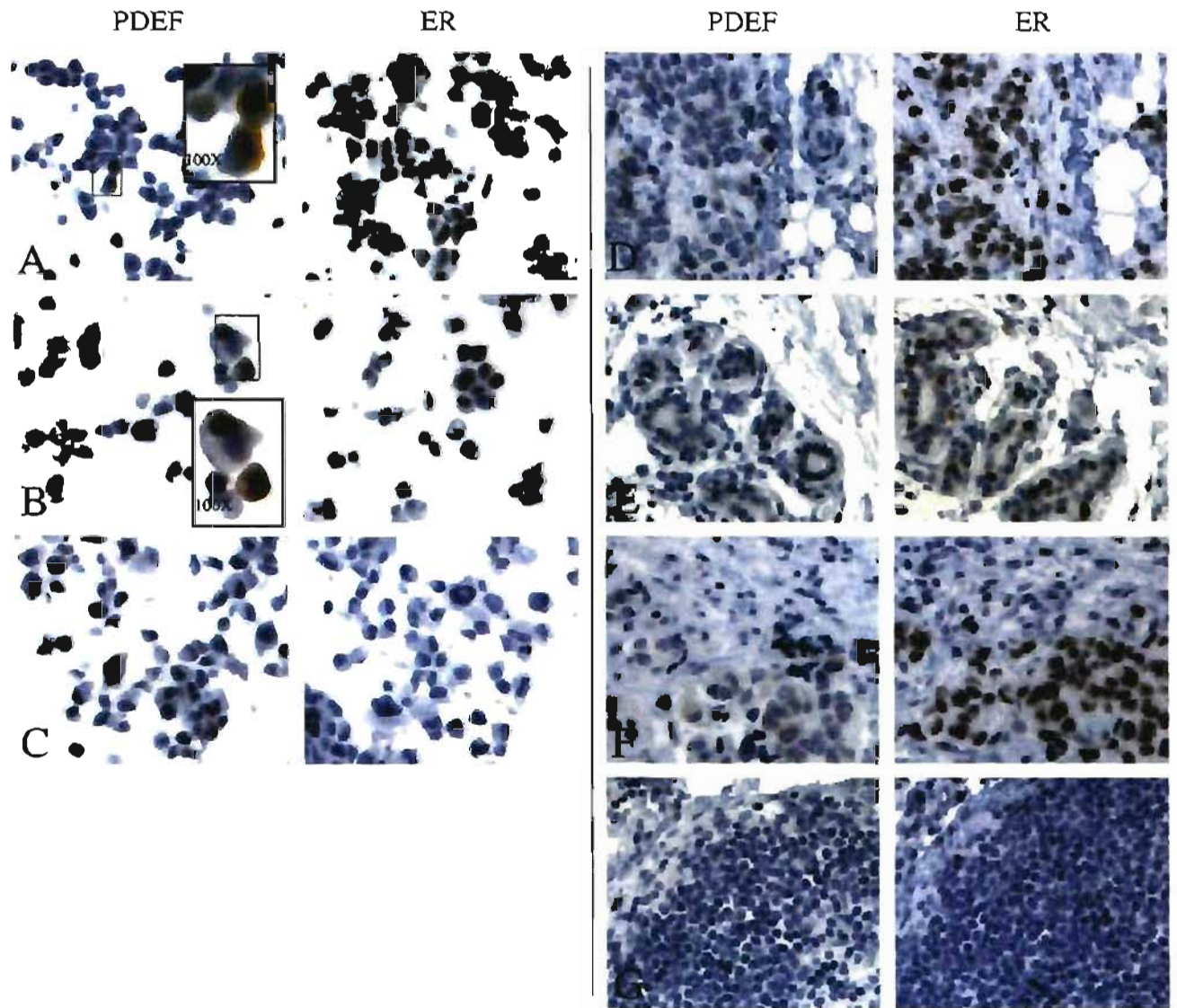
Malgré les 15 conditions différentes testées, nous n'avons pas obtenu de résultats qui pourraient être interprétables à la lumière de ceux publiés par le groupe qui nous a fourni l'anti-PDEF [111]. Contrairement à ce groupe, aucun marquage n'a été détecté dans le tissu de sein normal, que ce soit en péri-tumoral ou à partir du tissu de réduction mammaire (Figure 7E, case de gauche). À la même concentration que celle utilisée par ce groupe (1:200), un certain marquage est obtenu dans la lignée MCF7 et MCF7 transfectée avec PDEF (Figure 7A et B, cases de gauche). Il ne sera pas retrouvé dans la tumeur primaire ni dans le ganglion métastatique de la patiente #127, dont l'expression transcriptionnelle de PDEF est 4 fois plus importante que la lignée MCF7 (Figure 7D et F, cases de gauche).

Nous avons sélectionné 5 autres patientes qui exprimaient jusqu'à 20 fois plus PDEF au niveau transcriptionnel que la lignée MCF7. Les meilleures conditions expérimentales ont été utilisées sur des lames classiques faites à partir des tumeurs

entières, puisque la distribution intra-tumorale de PDEF aurait pu être hétérogène et produire des résultats faux négatifs en micro-matrice. Il n'a pas été possible de détecter PDEF sur les lames entières (résultats non montrés). L'anti-PDEF commercial (Zymed) n'a pas non plus produit de marquage spécifique.

En conclusion de cette partie, nous avons de la difficulté à expliquer pourquoi nous n'avons pas su au moins reproduire les résultats de l'équipe du D<sup>r</sup> Denis K. Watson à partir de l'anticorps qu'il nous avait fourni [111]. Le choix des tissus et des contrôles, l'appareil automatisé d'immunohistochimie performant utilisé pour tester l'anticorps dans 9 conditions différentes, selon trois concentrations différentes, nous poussent à remettre en question la qualité de l'anticorps. Il ne faut cependant pas exclure plusieurs événements post-transcriptionnels qui expliqueraient l'absence de détection de PDEF avec un anticorps donné. Les motifs PEST, retrouvés dans la protéine PDEF, sont décrits dans les protéines à dégradation rapide [108]. Aussi, plusieurs Ets se dimérisent, forment des complexes avec d'autres protéines au cytoplasme ou au noyau, ou sont simplement clivés [102]. Finalement, certains Ets pourraient être mutés dans les cellules transformées.

Même s'il est impossible, pour le moment, de confirmer que l'expression protéique de PDEF suivrait, de manière analogue à l'expression génique, l'expression du récepteur de l'œstrogène alpha, la micro-matrice confectionnée demeure un outil puissant pour tester l'hypothèse avec de nouveaux anticorps, de même que l'expression d'autres protéines. Les éclaircissements à venir sur le destin post-transcriptionnel de PDEF seront importants pour compléter la validation de PDEF comme AT candidat.



**Figure 7** Détection immunohistochimique de PDEF (anti-PDEF, Watson) et ER (anti-ER $\alpha$  6F11, Ventana) dans les lignées cellulaires, les tissus de seins normaux et néoplasiques.

**Figure 7 Détection immunohistochimique de PDEF (anti-PDEF, Watson) et ER (anti-ER $\alpha$  6F11, Ventana) dans les lignées cellulaires, les tissus de seins normaux et néoplasiques.**

**Légende :**

**A, B, C :** Lignées cellulaires de cancer du sein

- A** MCF7 (PDEF<sup>pos</sup> / ER<sup>+</sup>)
- B** MCF7 + PDEF (pcDNA3.1) (PDEF<sup>high</sup> / ER<sup>+</sup>)
- C** MDA-MB-231 (PDEF<sup>low</sup> / ER<sup>+</sup>)

**D, F, G :** Tissus de la patiente #127 (Banque CHUM-FRSQ)

La tumeur primaire de la patiente #127 est un carcinome canalaire infiltrant, stade T2N1, ER<sup>+</sup>PR<sup>+</sup>, grade III. L'expression de PDEF au niveau de l'ARNm est 4 fois supérieure à celle détectée dans la lignée MCF7.

- D** tumeur primaire
- F** ganglion métastatique
- G** ganglion normal

**E :** Sein normal (réduction mammaire)

Toutes les images sont représentatives de l'ensemble de la pastille de la micro-matrice, prises avec l'objectif 40X (sauf encadré 100X) d'un microscope avec système intégré de caméra numérique (Olympus BX51 Research Microscope, Q-Color 5 Imaging System, QCapture software; Center Valley, PA).

*Abréviations :* ER, récepteur œstrogène alpha; MCF7 + PDEF (pcDNA3.1), lignée MCF7 transfectée avec le plasmide linéarisé pcDNA3.1 contenant PDEF inséré à la suite d'un promoteur.

## SECTION 4. DISCUSSION, PERSPECTIVES et CONCLUSIONS

### 4.1 Objectifs poursuivis, sommaire et critique des résultats obtenus

Les récurrences et la progression du cancer du sein aux stades métastatiques demeurent responsables d'un taux de mortalité significatif, en dépit des approches thérapeutiques actuellement disponibles. Les récentes études de vaccination anti-tumorale et de transferts adoptifs de lymphocytes indiquent toutefois que l'immunothérapie pourrait devenir une stratégie thérapeutique complémentaire. L'efficacité et la spécificité de l'immunothérapie dépendent cependant de la reconnaissance des AT par les lymphocytes. Considérant le peu d'AT qui ont été caractérisés pour le cancer du sein, l'objectif général de ce travail était d'évaluer si le facteur de transcription PDEF se qualifiait comme AT candidat.

En résumé, la validation d'un AT demande : 1) que l'expression de la molécule d'intérêt soit abondante dans le cancer d'intérêt et 2) faible ou absente dans les tissus sains; 3) que les peptides dérivés de la protéine de l'AT soit présentés par les CMH à la surface des cellules cancéreuses et reconnus par des lymphocytes cytotoxiques; et 4) que l'antigène d'intérêt soit impliqué dans la transformation oncogénique [38].

À la lumière de ces critères, cette discussion entend évaluer jusqu'où nous sommes parvenus à valider PDEF comme AT candidat dans les cancers invasifs du sein.

#### 4.1.1 Expression de PDEF dans le cancer du sein

Nos données d'expression transcriptionnelles de PDEF, tirées de 86 échantillons cliniques, évaluées par une méthode sensible et reproductible de RT-PCR en temps réel, montrent que PDEF est détectable dans 75% des cancers du sein. Le niveau d'expression détectable dans le tissu cancéreux semble par ailleurs supérieur au niveau d'expression du sein normal (Manuscrit, Figure 2<sup>m</sup>), ce qui a été observé par

d'autres auteurs, à partir de banques informatisées d'ADNc [110] et par RT-PCR [114]. La validité des résultats sur le plan biologique est supportée par la distribution du niveau d'expression dans les tumeurs, qui suit une courbe quasi standard, de même que l'association significative avec certaines caractéristiques clinico-pathologiques du cancer du sein (Manuscrit, Figure 3<sup>m</sup>).

Tel que décrit dans notre manuscrit, l'expression marquée de PDEF, au niveau de l'ARNm, évaluée en fonction des critères clinico-pathologiques classiques du cancer du sein, est fortement associée aux tumeurs ER<sup>+</sup> et/ou PgR<sup>+</sup>, qui sont en général modérément ou bien différenciées (grade I et II). Aussi, la surexpression de PDEF était associée à un plus haut risque de métastases aux ganglions axillaires. Sans reprendre ici la discussion du manuscrit, il convient d'évaluer ici si ces caractéristiques des tumeurs qui expriment PDEF représentent un intérêt clinique.

Il est vrai que les tumeurs mieux différenciées, qui expriment ER, ont un meilleur pronostic que des tumeurs d'emblée hormono-indépendantes (ER<sup>-</sup>), souvent moins bien différenciées, qui ne répondent pas aux thérapies anti-oestrogéniques. Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que 1) la thérapie anti-oestrogénique de première ligne (tamoxifen) n'empêche que 50% des récives à 5 ans des tumeurs ER<sup>+</sup> [135], et 2) la majorité des tumeurs finissent par être résistantes aux thérapies anti-oestrogéniques. Sans égard au statut hormonal, la présence de cellules tumorales au niveau des ganglions axillaires, aussi associée à la surexpression de PDEF, est le critère de moins bon pronostic le plus significatif en cancer du sein [11]. La détection directe de PDEF dans les ganglions axillaires avait d'ailleurs déjà été suggérée comme outil de détection de métastases non visibles en microscopie traditionnelle (micrométastases) [113]. D'ailleurs, tel que supporté par les analyses de micro-matrice d'ADN, la famille de tumeurs qui expriment ER/PgR comprend des cancers dont l'agressivité varie [25]. Des outils d'évaluation de l'expression de plusieurs gènes par RT-PCR sont actuellement évalués en clinique, qui pourraient servir à identifier les tumeurs ER<sup>+</sup> qui présentent un plus haut risque de récives et de dissémination [116, 128].

Le profil d'expression transcriptionnelle de PDEF concerne donc un nombre important de cancers du sein et est associé à des caractéristiques clinico-pathologiques d'intérêt clinique. Ceci positionne PDEF comme AT candidat, mais les données d'expression protéique de PDEF devront être complétées pour tirer formellement cette conclusion, et déterminer à quel type d'AT PDEF correspond (Section 1.2.2 et Tableau 2).

En effet, tel que mentionné dans la discussion du manuscrit, la détection immunohistochimique de PDEF a été rapportée dans un nombre insuffisant d'échantillons cliniques par d'autres auteurs [111, 112]. De plus, malgré l'utilisation d'un anti-PDEF fourni par une de ces équipes de recherche, testé dans un système d'immunohistochimie automatisé suivant 9 conditions différentes, malgré l'utilisation de multiples contrôles et le bon rendement obtenu pour la détection de ER, nous n'avons pas pu reproduire les résultats publiés et obtenir suffisamment de données pour tirer des conclusions sur le profil d'expression génique et protéique comparé de PDEF. Sans reprendre la discussion du manuscrit à ce sujet, il demeure impossible de conclure si la faible expression protéique de PDEF correspond d'avantage au phénotype de tumeurs ER<sup>-</sup>, moins bien différenciées, ou à des changements post-transcriptionnels.

L'impact que le « destin post-transcriptionnel » de PDEF pourrait avoir sur son utilité comme AT est à considérer. En effet, la perte d'expression de PDEF en fonction de la progression du cancer le qualifierait comme un AT de différenciation, de manière analogue au CEA. Ceci pourrait toutefois limiter son utilité dans le traitement des cancers au stade métastatique, bien qu'être pertinent pour prévenir la récurrence dans un contexte de thérapie adjuvante. D'autre part, la dégradation rapide de la protéine, qui pourrait se traduire en abondance de peptides acheminés à la surface cellulaire par les CMH, ou bien une mutation qui produirait des séquences peptidiques uniques, représenterait des caractéristiques intéressantes pour établir PDEF comme AT spécifique à une tumeur, unique ou partagé (Tableau 2).



#### 4.1.2 Expression de PDEF dans les tissus normaux

Des réactions auto-immunes indésirables peuvent survenir lorsqu'un AT, exprimé par des tissus sains en plus de la tumeur, est ciblé en immunothérapie. Ces réactions peuvent être plus ou moins graves, selon l'organe atteint. Nous avons détecté PDEF à des niveaux comparables aux cancers du sein dans les glandes salivaires, la trachée et la prostate. De faibles niveaux ont été notés dans le colon et les poumons (Manuscrit, Figure 2<sup>m</sup>A). Ces résultats corroborent ceux obtenus par d'autres auteurs [110, 111].

Il n'est pas exclu qu'un éventuel traitement prenant pour cible des peptides dérivés de PDEF pourrait occasionner des réactions auto-immunes dans ces organes. Ce fut le cas en immunothérapie pour le mélanome, lorsqu'un certain nombre de patients développèrent une dépigmentation de la peau, appelée vitiligo [79]. Les effets indésirables de l'immunothérapie – tout comme ceux des autres thérapies – doivent être jugés en fonction des effets thérapeutiques bénéfiques obtenus. Pour les patients susmentionnés, atteints de mélanomes métastatiques, résistant à tout autre traitement, l'espérance de vie attendue n'était que de quelques mois. Pour certains, leur survie est passée à près d'un an, malgré l'apparition de vitiligo. Les réactions auto-immunes, comparées à la survie obtenue dans ces cas, sont vites mises en perspectives. Les réactions auto-immunes ont aussi l'avantage de pouvoir être contrôlées avec des corticostéroïdes ou autres immunosuppresseurs.

Le cas de HER-2/*neu* peut aussi être évoqué dans le contexte du cancer du sein, puisqu'il est exprimé par les cellules du myocarde. L'anticorps humanisé trastuzumab (Herceptin®), qui se lie au récepteur de surface HER-2/*neu*, et qui est utilisé dans le traitement adjuvant du cancer du sein, cause 1 à 4 % de défaillance cardiaque *de novo* [136]. On continue à proposer ce traitement aux femmes qui ne présentent pas de problèmes cardiaques de base, puisqu'il est un des seuls agents récents à avoir amélioré la survie des femmes atteintes d'une tumeur qui surexprime HER-2/*neu* [137]. Il

restera à voir si l'immunothérapie ciblant les peptides de HER-2/*neu* produira aussi ces réactions auto-immunes au niveau du cœur.

Considérant que la chirurgie pour le cancer du sein tente de préserver la glande mammaire et que le sein controlatéral demeure, il est important de connaître les niveaux d'expression de PDEF dans le sein normal. Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'ARNm de PDEF est plus faiblement exprimé dans le sein normal que dans le sein cancéreux. L'étude de RT-PCR la plus convaincante a évalué l'expression de PDEF dans des tissus micro-disséqués au laser [114]. Le niveau d'expression de PDEF apparaissait 2 à 10 fois plus grand que dans le sein normal dans les 27 cancers invasifs du sein testés, et dans 75% des 39 carcinomes *in situ*.

On peut donc conclure que l'absence de transcription du gène PDEF, observée dans la majorité des tissus sains testés (14 sur 21, Manuscrit Figure 2<sup>m</sup>), contribue à la validation de PDEF comme AT. Dans ces tissus, l'expression protéique de PDEF serait improbable. Encore une fois néanmoins, l'expression protéique de PDEF dans les tissus sains où le gène est faiblement transcrit, comme dans le poumon et le colon, de même que dans le sein normal, les glandes salivaires et la trachée, devra être documentée. Si PDEF était ciblé dans d'éventuelles immunothérapies, des réactions auto-immunes dans ces organes seraient à surveiller dans les modèles animaux puis les études de phase I.

#### 4.1.3 Immunogénicité de PDEF

Idéalement, un AT devrait présenter plusieurs peptides qui peuvent être acheminés à la surface cellulaire par les molécules du CMH et y être reconnus par les lymphocytes. Les principaux critères qui déterminent le potentiel immunogénique d'un peptide sont l'affinité avec laquelle il s'associe à la molécule du CMH, ainsi que l'avidité avec laquelle il est reconnu par des lymphocytes T spécifiques. Quant à la possibilité qu'une protéine qui réside au noyau – comme les facteurs de transcription

Ets – finisse par être dégradée et acheminée à la surface cellulaire par les CMH où elle sera reconnue par les lymphocytes, les expériences qui portent le facteur de transcription Wilms' tumor gene (WT1) en ont fait la preuve de concept [138]. En cancer du sein, l'AT qui est le mieux caractérisé à ce jour est HER-2/*neu*, avec 7 peptides présentés par HLA-A2, 1 par HLA-A3, puis 2 par HLA-DR11 (classe II) [39].

Les résultats que nous avons obtenus pour 3 peptides de PDEF restreints pour HLA-A\*0201 et présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, qui s'approchaient des résultats observés pour le peptide contrôle de l'influenza (FLU-M1 58-66), suggèrent que l'immunogénicité de certains peptides de PDEF pourrait être établie (Section 3.1.3, Tableau 1). Il reste cependant à reproduire ces résultats et à caractériser le type spécifique de HLA auquel chaque peptide se lie. Les prochains essais pourraient être réalisés à l'aide de PBMC fraîches, obtenues en grande quantité par leucaphérèse, de donneurs sains ou de patientes atteintes du cancer du sein. Plusieurs auteurs ont en effet obtenu de meilleurs résultats d'immunogénicité, évaluée en culture cellulaire, lorsque les PBMC n'étaient pas congelées [134, 139]. Les lymphocytes cytotoxiques spécifiques aux peptides de PDEF devront ensuite être isolés par clonage dilutionnel et protocole de réplique rapide, de manière à pouvoir ensuite tester leur capacité de reconnaissance des lignées cellulaires de cancer qui expriment PDEF et leur capacité de lyse. Des essais d'affinités des peptides, évalués par cytométrie de flux, pourraient aussi être faits pour aider à discerner les peptides les plus susceptibles d'être immunogéniques. Finalement, en plus de valider d'autres peptides présentés par classe I aux LTc CD8<sup>+</sup>, la caractérisation de peptides plus longs, présentés par les CMH de classe II aux LTh CD4<sup>+</sup>, sera importante, vue la nécessité de la collaboration entre LTc et LTh pour maximiser la cytotoxicité au site de la tumeur [34].

Ces premiers résultats concernant l'immunogénicité de peptides de PDEF présentés par classe I via les HLA-A\*02 sont encourageants. Ils devront toutefois être suivis d'une validation formelle, qui dépendra aussi des résultats à venir concernant l'expression protéique de PDEF.

#### 4.1.4 Implication de PDEF dans la transformation oncogénique

Une immunothérapie qui viserait un AT impliqué dans la transformation oncogénique pourrait être plus efficace ou spécifique à une tumeur. Ce projet de maîtrise n'abordait toutefois pas les possibles mécanismes d'action PDEF dans l'initiation ou la progression du cancer du sein. Les travaux d'autres groupes, tels que mentionnés dans l'introduction du mémoire et dans la discussion du manuscrit, ont investigué le lien entre PDEF et la motilité cellulaire. La transfection de PDEF dans différents types de lignées cellulaires de cancers du sein et de la prostate a produit des résultats aux apparences contradictoires, avec des effets anti-métastatiques [111, 112, 115, 122] et pro-métastatiques [114]. Comment interpréter ces résultats à la lumière du profil d'expression que nous avons documenté ?

De manière générale, il semble intéressant de noter que les effets anti-métastatiques de PDEF ont surtout été documentés à partir de lignées cellulaires très agressives de cancers du sein et de la prostate, dérivées de cellules métastatiques, en grande majorité hormono-indépendantes [111, 112, 115, 122]. À l'opposé, les résultats les plus convaincants selon quoi PDEF pourrait jouer un rôle dans la motilité cellulaire proviennent de cellules dérivées d'une pathologie bénigne du sein, appelée changements fibro-kystiques (lignée MCF10A) [114]. La surexpression de PDEF dans la seule lignée de cancer du sein qui exprime ER, la lignée MCF7, a pour sa part provoquée des effets contradictoires, anti- [112] et pro-metastatiques [114], sans qu'il n'y ait de contrôle formel de la stimulation hormonale dans les milieux de culture. Que conclure quant au rôle de PDEF dans l'oncogénèse et la progression tumorale ?

Si on considère les associations que nous rapportons entre la surexpression de PDEF et le phénotype de tumeur ER<sup>+</sup>, assez bien différenciée, de même que le risque accru de métastases aux ganglions axillaires, les résultats obtenus dans les modèles cellulaires pourraient suggérer une action bimodale de PDEF, fortement liée au contexte cellulaire. En particulier, l'existence d'une synergie entre la biologie des récepteurs hormonaux et PDEF dans les tumeurs bien différenciées serait à étudier. En

effet, le premier auteur qui a décrit l'existence de PDEF observait aussi une transactivation de PDEF au site de liaison à l'ADN du récepteur androgène, au site promoteur de la protéase à sérine Prostate-specific antigen (PSA). Le développement synergique d'un phénotype invasif a aussi été documenté dans les MDA10A lorsque PDEF était co-exprimé avec HER-2/*neu* ou le récepteur tyrosine kinase Colony-stimulating factor receptor (CSF-1R) [114]. La phosphorylation d'un locus de PDEF, par activation des voies MAPK, a été proposée comme mécanisme sous-jacent. Il est intéressant de noter à cet égard que la surexpression des récepteurs tyrosine kinase *erbB3* et *erbB4*, qui activent les voies ras-MAPK, est associée à un phénotype de cancer du sein analogue à celui de PDEF, soit les tumeurs ER<sup>+</sup>, de grade I et II. De surcroît, une association significative a été documentée entre *erbB4* et l'atteinte des ganglions axillaires [140].

En contrepartie, la perte d'expression de PDEF, au niveau génique ou protéique, observée dans les tumeurs hormono-indépendantes, les moins bien différenciées, pourrait représenter un mécanisme d'adaptation subséquent des cellules tumorales, qui présenteraient d'autres gènes-clés impliqués dans la progression tumorale, qui peuvent être inhibés par la réactivation de PDEF. C'est ainsi que pourraient être interprétés les résultats obtenus à partir de la lignée MDA-MB-231 [111, 115].

En bref, PDEF semble impliqué dans les mécanismes oncogéniques des tumeurs du sein, ce qui contribue à sa qualification comme AT candidat. Il n'est toutefois pas possible, à ce stade, de déterminer si son implication dans la métastase dépend du degré de différenciation, du phénotype ou du contexte des cellules transformées.

## 4.2 Perspectives et conclusions

### 4.2.1 PDEF pourrait-il être un marqueur tumoral d'intérêt clinique ?

Un consensus autour de certains critères a été obtenu pour juger de l'utilité clinique d'un marqueur tumoral. Ce marqueur doit 1) avoir démontré de manière reproductible une utilité clinique dans des études prospectives, ayant comme impact de modifier le processus décisionnel du traitement d'un cancer, par une meilleure appréciation du risque de développer un cancer, un dépistage plus précoce des cancers asymptomatiques, une meilleure appréciation de la survie et de la réponse aux chimiothérapies disponibles; 2) être établi comme facteur de risque indépendant d'autres facteurs clinico-pathologiques dans des modèles statistiques multivariés; 3) apporter une information que d'autres paramètres plus faciles à mesurer ne peuvent fournir; et 4) pouvoir être mesuré de manière reproductible par différents laboratoires [141, 142].

On peut diviser les marqueurs tumoraux en deux grandes catégories, soit : a) les marqueurs sécrétés dans le sérum et b) les marqueurs tissulaires. En cancer du sein, les marqueurs tumoraux mesurés dans le sérum qui sont les mieux étudiés sont : les glucoprotéines de MUC-1 (CA15-3 et CA27.29), le CEA, et la portion clivée, circulante du domaine extracellulaire de Her-2/*neu*. Or, contrairement au PSA du cancer de la prostate, leur utilité n'a pas été établie en Amérique du nord pour le dépistage précoce du cancer asymptomatique du sein, pour le *staging* initial des tumeurs, ou pour la détection précoce des récurrences de cancer du sein, selon les plus récentes lignes directrices [143, 144]. Plusieurs raisons expliquent cette situation, notamment les niveaux insuffisants de sensibilité et de spécificité de ces marqueurs, ainsi que l'absence d'évidence qu'on améliore la survie des patientes en dosant ces marqueurs. Le suivi des niveaux sériques de CA15-3, CA27.29 et du CEA n'est pour l'instant jugé utile que pour évaluer la réponse du cancer du sein métastatique aux chimiothérapies (Tableau 6) [142].

Du côté des marqueurs tissulaires, les récepteurs ER, PgR et HER-2/*neu* ont une utilité pronostique, mais sont surtout utilisés comme facteur prédictif de réponse à l'hormonothérapie et au trastuzumab (anti-HER-2/*neu*) (Tableau 6). La valeur pronostique de l'urokinase plasminogen activator (uPA) et de son inhibiteur (PAI-1) a été démontrée avec le plus d'évidences cliniques, d'après un essai clinique randomisé et les données regroupées de plusieurs bases de données européennes, qui concernent environ 8000 femmes [145, 146]. Un faible niveau d'expression, chez les patientes dont la tumeur n'a pas atteint les ganglions axillaires, signifierait un faible risque de récurrence et faciliterait la décision de ne pas entreprendre de chimiothérapie. La mesure de l'expression d'uPA combinée au PAI-I ne fait pourtant pas partie des algorithmes thérapeutiques à l'heure actuelle.

### *Modèles multigéniques*

L'hétérogénéité des tumeurs, de même que la multitude de gènes dont l'expression est altérée dans les cellules transformées, pourraient expliquer l'utilité limitée des mesures des niveaux d'expression de gènes isolés. Deux outils multigéniques de prédiction pronostique des cancers du sein feront prochainement l'objet d'études cliniques prospectives, à savoir : i) l'étude américaine Trial Assigning Individualized Options for Treatment (TAILORx) [147] avec l'outil appelé Oncotype DX (Genomic Health Inc, Redwood City, CA, USA) et ii) l'étude européenne Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy (MINDACT Trial) [148], qui utilise la « Signature d'Amsterdam », sur micropuces d'ARNm, et est commercialisée sous le nom MammaPrint (Agendia, Amsterdam, Hollande). L'essai Oncotype DX est basé sur l'évaluation par RT-PCR de l'expression de 16 gènes impliqués dans la progression du cancer et 5 gènes de référence, et peut être effectué sur des tumeurs fixées dans des blocs de paraffine, telles qu'archivées dans la plupart des hôpitaux. Le MammaPrint, quant à lui, est une micro-puce à ARN qui évalue l'expression des 70 gènes de la signature d'Amsterdam, et requiert que l'extraction d'ARNm soit faite à partir des tissus frais ou cryopréservés. L'utilisation du

Mammaprint à grande échelle suppose donc une logistique plus lourde, surtout dans le contexte d'une étude multicentrique.

Les valeurs pronostiques et prédictives d'Oncotype DX [23, 116] et de la signature d'Amsterdam [28] ont déjà été validées dans plusieurs contextes et banques de cancers précoces du sein, qui exprimaient des récepteurs hormonaux et qui ne présentaient pas de dissémination régionale aux ganglions axillaires. L'objectif général des premiers essais cliniques prospectifs est de déterminer si ces outils multigéniques permettront d'identifier des sous-groupes de tumeurs plus agressives, pour lesquels des traitements adjuvants amélioreront la survie des femmes atteintes de ces cancers, et plus particulièrement pour éviter de soumettre inutilement un nombre significatif de femmes aux chimiothérapies. Avant d'appliquer largement ces méthodes de *staging* moléculaire, les bénéfices cliniques prouvés devront justifier le coût de leur usage.

... *et PDEF ?*

Pour établir si PDEF pourrait être un marqueur tissulaire d'intérêt pronostic, il faudrait évaluer s'il est associé à un plus haut taux de récurrences ou de décès. Cette analyse devrait d'abord être faite à partir des tissus de cancer d'une cohorte historique de patientes, avec un nombre d'échantillons déterminé au préalable pour obtenir une puissance statistique satisfaisante. Cette cohorte devrait contenir des tumeurs de tous les stades cliniques. Si une évaluation est faite dans quelques années à partir de la jeune cohorte de 86 patientes de la banque CHUM-FRSQ testées pour PDEF, rapportée dans notre manuscrit, il faudra tenir compte d'un certain biais de sélection de tumeurs primaires ayant souvent dépassé le stade précoce, puisque seules les tumeurs de plus de 1.5 à 2 cm sont éligibles pour cette banque.



Summary of American Society of Clinical Oncology guidelines for use of tumor markers in breast cancer

	Marker	Assess in adjuvant setting	Assess in metastatic setting	Prognostic factor	Predictive factor	Use for monitoring only	
						NED	Met
Tissue-based	ER	Yes	Yes	Weak	Strong <sup>a</sup>	N/A	N/A
	PgR	Yes	Yes	Weak	Strong <sup>a</sup>	N/A	N/A
	Her-2/neu	Yes	Yes	Weak	Strong <sup>b</sup>	N/A	N/A
Circulating	CA 15-3	No	Yes	No	No	No	Yes
	CA 27.29	No	Yes	No	No	No	Yes
	CEA	No	Yes	No	No	No	Yes
	Her-2 ECD	No	No	No	No	No	No

<sup>a</sup>For benefit from endocrine treatment.

<sup>b</sup>For benefit from trastuzumab therapy.

Abbreviations: CA, cancer antigen; CEA, carcinoembryonic antigen; ECD, circulating extracellular domain; ER, estrogen receptor; NED, no evidence of disease; Met: metastatic; N/A: not applicable; PgR, progesterone receptor.

Tableau tiré de [142]

**Tableau 6 Lignes directrices résumées de l'*American Society of Clinical Oncology* pour l'utilisation des marqueurs tumoraux du cancer du sein**

L'expression de PDEF seul, comme la plupart des autres gènes, risque cependant de ne pas atteindre un niveau de signification statistique ou clinique requis pour modifier les algorithmes cliniques établis. Le mieux serait d'évaluer sa pertinence pour aider la prise de décision clinique dans des situations précises, par exemple : i) lorsqu'une micro-métastase est détectée dans le premier ganglion axillaire de drainage lymphatique (ganglion sentinelle), quels sont les risques de trouver d'autres métastases dans d'autres ganglions axillaires et la nécessité de pratiquer une dissection axillaire complète, reconnue comme la procédure la plus morbide dans la chirurgie du cancer du sein ? Et ii) comment se compare la valeur prédictive de l'évaluation de PDEF seul aux outils multigéniques tels Oncotype DX ou les modèles informatiques comme ADJUVANT [14] pour l'identification des cancers précoces du sein, récepteurs hormonaux positifs, les plus à risque de récives ? PDEF pourrait aussi possiblement gagner à être intégré dans des modèles multigéniques de prédiction de l'atteinte aux ganglions axillaires.

#### 4.2.2 PDEF est-il impliqué dans les mécanismes de résistance aux thérapies anti-oestrogéniques ?

Les stratégies anti-oestrogéniques ont fait leurs preuves dans le traitement du cancer du sein, dont environ 70% expriment ER ou PgR. Dès 1896, environ 80 ans avant la découverte du récepteur de l'œstrogène, Beatson documentait déjà que l'ovariectomie bilatérale améliorait le pronostic de certaines femmes atteintes d'un cancer du sein inopérable [149]. De nos jours, les modulateurs sélectifs du récepteur oestrogène (*Selective estrogen receptor modulator, SERM*), dont le tamoxifen, utilisé depuis 25 ans en clinique, et d'autres molécules qui permettent d'éliminer à la source la production d'œstrogène ou la conversion périphérique des stéroïdes en oestrogènes, sont utilisés avec succès dans le traitement du cancer du sein, à tous les stades d'évolution. À titre d'exemple, citons les résultats combinés de 71 essais cliniques randomisés contrôlés, qui représentent environ 80 000 femmes, qui ont démontré que le tamoxifen, en thérapie adjuvante, réduisait de 12% le risque de récives à 15 ans, et

la mortalité de 9% des cancers de stade I et II [150]. Malgré tout, un nombre substantiel de femmes, dont la tumeur exprime ER et/ou PR, ne répondent pas aux thérapies anti-estrogéniques (résistance *de novo*) et les cancers du seins métastatiques finissent tous par progresser en dépit de ces thérapies (résistance acquise) [7].

La forte association entre l'expression PDEF et de ER et PgR, de même que l'expression en moyenne 8 fois plus élevée de PDEF retrouvée dans les tumeurs ER<sup>+</sup> récidivantes de 7 patientes traitées au tamoxifen pendant 5 années (Manuscrit, p.42), nous poussent à explorer si PDEF pourrait être impliqué dans les mécanismes de résistance aux stratégies anti-oestrogéniques. Nous rappelons ici brièvement ce qui est connu de la physiologie des récepteurs oestrogènes et des mécanismes de résistance aux thérapies anti-oestrogéniques, en tentant de cerner à quel niveau PDEF pourrait être impliqué dans ces mécanismes.

#### *Physiologie sommaire de ER*

ER est un récepteur stéroïdien dont l'action de l'isoforme  $\alpha$  est beaucoup mieux connue et documentée en cancer du sein que l'isoforme  $\beta$ . Deux grands schémas d'actions sont proposés pour ER, soit (Figure 8) [151, 152] :

- i) une action génomique, classique, où ER agit comme facteur de transcription, lié à l'estradiol (E2) ou d'autres ligands qui ont entraîné sa phosphorylation, sa dimérisation ou des changements de conformation, le recrutement de protéines co-régulatrices et la liaison du nouveau complexe à l'ADN en amont de gènes impliqués dans la progression du cancer du sein. Ces gènes favorisent notamment la division, la prolifération et la différenciation cellulaires, de même que la synthèse de récepteurs de facteurs de croissance autres que stéroïdiens;

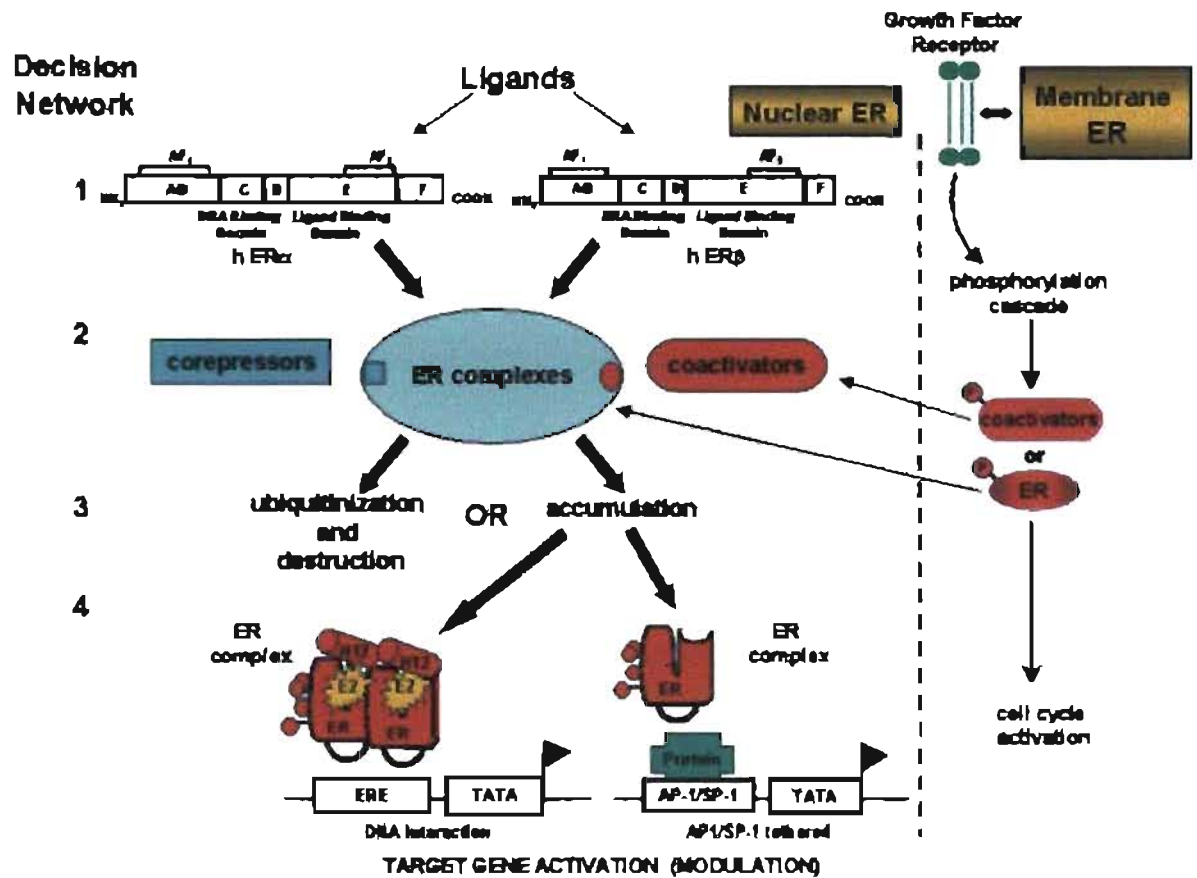


Figure tirée de [151]

## Figure 8 Physiologie des récepteurs de l'œstrogène

**Légende :** Les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur de l'œstrogène (ER) agissent i) comme facteur de transcription au niveau génomique (du côté gauche de la ligne pointillée, *Nuclear ER*) ou ii) au niveau membranaire, en interaction avec les récepteurs de facteurs de croissance (du côté droit de la ligne pointillée, *Membrane ER* et *Growth Factor Receptor*). ER $\alpha$  peut agir comme facteur de transcription de gènes cibles situés à proximité des ERE (*Estrogen Responsive Element*) s'il est phosphorylé en son domaine AF-2 par l'estradiol (E2), ou bien à d'autres sites de liaison avec l'ADN (AP-1 ou SP-1) s'il est phosphorylé par d'autres coactivateurs en son domaine AF-1 et complexé à d'autres protéines.

- ii) une action non-génomique, plus récemment documentée (aussi appelée *membrane-initiated steroid signaling (MISS)*, ou *rapid signaling*), où une forme clivée de ER $\alpha$  se retrouve au niveau de la membrane cellulaire des cellules du cancer du sein et participent à la transactivation d'autres récepteurs membranaires de la famille des RTK, tels HER-2/*neu*, EGFR et le insulin-like growth factor receptor, ainsi qu'à l'activation directe de protéines G. L'activation directe de ces voies de signalisation a des effets positifs sur le cycle cellulaire et les mécanismes impliqués dans la progression tumorale.

#### *Mode d'action des médicaments anti-oestrogéniques*

Le tamoxifène et d'autres SERMs se lient de façon compétitive à ER au site de liaison de E2 (domaine AF2 de ER $\alpha$ ). Sans empêcher la phosphorylation, la dimérisation et l'accumulation de ER au noyau, on pense que le tamoxifène modifie les liaisons subséquentes de ER avec d'autres protéines co-activatrices et co-répressives, ce qui aurait comme effet net d'empêcher ou de modifier la transcription des gènes cibles [153].

L'antagoniste « pur » de ER, nommé fulvestrant (ICI 182,780), recommandé pour le traitement des cancers métastatiques du sein chez des patientes qui ne répondent plus aux autres thérapies anti-hormonales, agirait via les deux domaines de phosphorylation de ER (AF1 et AF2), empêcherait le transport de ER au noyau et sa dimérisation, puis entraînerait sa dégradation [154, 155]. Le fulvestrant pourrait être capable d'inhiber l'action non-génomique, membranaire, de ER, contrairement au tamoxifène et à d'autres SERMs, mais ces interactions restent à être investiguées plus avant [152]. Quant aux inhibiteurs de l'aromatase (AI), une autre catégorie de médicaments anti-oestrogéniques, ils empêchent la conversion des hormones stéroïdiennes en estradiol au niveau des tissus périphériques et du site de la tumeur primaire, créant un environnement tumoral exempt du ligand E2. L'efficacité des AI est établie chez les femmes ménopausées, mais leur effet n'est pas suffisant chez les femmes jeunes, dont les ovaires produisent une trop grande quantité d'oestrogène.

*Contribution possible de PDEF aux mécanismes de résistance aux thérapies anti-oestrogéniques*

La résistance aux thérapies anti-oestrogéniques est actuellement expliquée de manière générale par l'interaction dynamique, bidirectionnelle, entre les voies de prolifération médiées par les récepteurs ER et celles médiées par d'autres récepteurs de facteurs de croissance, notamment les RTK [156]. Les modèles cellulaires ont démontré que la résistance au tamoxifen et au fulvestrant s'accompagnent d'une surexpression des récepteurs HER-2/*neu* et EGFR, de même que d'une suractivation du signalement intracellulaire des voies MAPK [157-161]. À l'inverse, après un traitement prolongé à l'anti-HER-2/*neu* (trastuzumab) et aux cycles habituels de chimiothérapies, une conversion au phénotype ER<sup>+</sup> a été observée chez 3 de 10 patientes atteintes de cancers du sein métastatiques, au départ HER-2/*neu*<sup>+</sup> et ER<sup>-</sup> [162]. Comme le montre la Figure 8, les opportunités d'interactions entre ER et les voies des RTK, sollicitées à partir de la membrane cellulaire, peuvent avoir lieu à plusieurs niveaux et être bidirectionnelles.

En l'absence d'E2, ce qui survient lors du traitement aux IA, ou en présence de SERMs, une activation autonome de ER $\alpha$  peut avoir lieu via son deuxième site de phosphorylation (AF-1). Différentes kinases des voies des MAPK ou de phosphatidylinositol 3-kinase/AKT peuvent phosphoryler le site AF-1 de ER [7, 163]. PDEF, comme plusieurs autres facteurs de transcription Ets, pourrait être un produit final d'activation des voies des MAPK (Introduction, Figure 3); la surexpression de PDEF, dans certaines tumeurs ER<sup>+</sup>, pourraient être le reflet de la suractivation des MAPK dans les tumeurs résistantes aux thérapies hormonales. Ceci pourrait servir de point de départ pour expliquer l'apparente surexpression de PDEF dans le sous-groupe de tumeurs récidivantes, chez des femmes qui avaient été traitées pendant 5 ans au tamoxifen.

Par ailleurs, les niveaux absolus et relatifs de protéines co-activatrices et co-répressives qui forment des complexes avec ER et conditionnent la transcription de gènes cibles, semblent jouer un rôle important dans les mécanismes de résistance. À

cet égard, PDEF, qui est aussi un facteur de transcription, pourrait agir comme co-régulateur en se complexant avec ER, possiblement à l'aide de son domaine de liaison protéique SAM-pointed. PDEF pourrait peut-être aussi se lier directement, grâce à son site Ets de liaison à l'ADN, aux sites de liaison habituels de ER, que ce soit aux Estrogen Responsive Element (ERE) ou au site Activator Protein-1/Sp1 (AP-1/Sp1) (Figure 8).

Ensuite, à l'image des facteurs Ets de la famille PEA3 qui agissent comme promoteurs du gène *HER-2/neu* [106, 107], PDEF pourrait participer à la transcription d'autres RTK, comme *erbB3* et *erbB4*, associés au phénotype ER<sup>+</sup> et à l'envahissement des ganglions axillaires [140], de manière analogue au profil d'expression de PDEF. Il serait donc intéressant de voir si PDEF pourrait jouer un rôle dans des boucles de régulation autocrine impliquant les RTK et leurs ligands (Figure 3).

Plusieurs de ces hypothèses pourraient être testées dans des modèles cellulaires assez simples, à l'aide de lignées cellulaires de cancer du sein. Des transfectants stables de ces lignées, surexprimant PDEF, pourrait être cultivés dans des milieux riches ou déplétés en oestrogène. L'ajout de différents SERMs et d'inhibiteurs spécifiques des voies des MAPK, combiné à des mesures d'apoptose, de prolifération cellulaire et de motilité, pourrait ensuite permettre de comprendre les interactions entre ces différentes voies et leurs effets sur l'agressivité des cellules de cancer du sein. Enfin, des études d'immuno-précipitation pourraient permettre assez rapidement de confirmer si PDEF et ER $\alpha$ , ER $\beta$ , voire PgR, interagissent directement ensemble.

### 4.2.3 Conclusions générales

En conclusion, l'objectif général de ce mémoire était d'évaluer dans quelle mesure PDEF pourrait être un AT d'intérêt pour le cancer invasif du sein. Nos données permettent de conclure que PDEF est en bonne position pour se qualifier comme AT, si on considère 1) son profil d'expression général dans les tissus sains et dans un sous-groupe de cancers invasifs du sein d'intérêt clinique, 2) les résultats préliminaires quant à l'immunogénicité de certains peptides HLA-A\*0201 et 3) son implication possible dans la motilité cellulaire et les processus métastatiques documentés par d'autres groupes de recherche. Ces premiers résultats devraient servir de base pour la validation des séquences les plus immunogéniques de PDEF. Une étude plus approfondie de l'expression protéique de PDEF devra toutefois être conduite avant qu'il ne puisse être mis à contribution pour le développement de stratégies immunothérapeutiques. Finalement, de nouvelles pistes de recherche émergent de ce premier travail de caractérisation de PDEF comme AT. La signification pronostique du niveau d'expression de PDEF comme marqueur tumoral, de même qu'un éventuel lien avec les mécanismes de résistance aux thérapies anti-hormonales, mériteraient d'être investigués.



## BIBLIOGRAPHIE

1. McLaughlin JR, Dryer D, Logan H, Mao Y, L. M, Morrison H, Schacter B, Villeneuve G. (*Agence de santé publique du Canada*) *Société canadienne du cancer/Institut national du cancer du Canada* 2006.
2. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;15:36-47.
3. Gaudette LA, Gao RN, Wysocki M, al. Le point sur la mortalité par cancer du sein. *Rapport sur la santé, 1995* 1997;9:34-41.
4. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998;352:930-942.
5. Cole BF, Gelber RD, Gelber S, Coates AS, Goldhirsch A. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised clinical trials with quality-adjusted survival analysis. *Lancet* 2001;358:277-286.
6. Cooke T, Reeves J, Lanigan A, Stanton P. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Ann Oncol* 2001;12:S23-28.
7. Ali S, Coombes RC. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2002;2:101-112.
8. Petersen OW, Hoyer PE, van Deurs B. Frequency and distribution of estrogen receptor-positive cells in normal, nonlactating human breast tissue. *Cancer Res* 1987;47:5748-5751.
9. Breast. In: Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al., eds. *AJCC Cancer Staging Handbook*. 6th ed. New York: Springer-Verlag; 2002:257-281.
10. American Joint Committee on Cancer - The Collaborative Staging Task Force. [[www.cancerstaging.org](http://www.cancerstaging.org)].
11. Henderson IC, Patek AJ. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:261-288.
12. Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, Baker HW, McGregor FH, Murphy GP. Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer* 1980;45:2917-2924.
13. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005;16:1569-1583.

14. Adjuvant! Online - Decision making tools for health care professionals. [www.adjuvantonline.com].
15. Malone KE, Daling JR, Thompson JD, O'Brien CA, Francisco LV, Ostrander EA. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. *Jama* 1998;279:922-929.
16. Chodosh LA. The reciprocal dance between cancer and development. *N Engl J Med* 2002;347:134-136.
17. Yu Q, Geng Y, Sicinski P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 2001;411:1017-1021.
18. von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000;62:51-62.
19. Czerniak B, Chen R, Tuziak T, *et al.*: Expression of ras oncogene p21 protein in relation to regional spread of human breast carcinomas. *Cancer* 1989;63:2008-2013.
20. Deming SL, Nass SJ, Dickson RB, Trock BJ. C-myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer* 2000;83:1688-1695.
21. Lai H, Ma F, Trapido E, Meng L, Lai S. Spectrum of p53 tumor suppressor gene mutations and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat* 2004;83:57-66.
22. Pharoah PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999;80:1968-1973.
23. Paik S, Shak S, Tang G, *et al.*: A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-2826.
24. Esteva FJ, Sahin AA, Cristofanilli M, *et al.*: Prognostic role of a multigene reverse transcriptase-PCR assay in patients with node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:3315-3319.
25. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al.*: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-752.
26. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, *et al.*: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-10874.

27. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa F, Fukutomi T, Hirohashi S. Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *Am J Surg Pathol* 2000;24:197-202.
28. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, *et al.*: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
29. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, *et al.*: Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671-679.
30. Morales A, Nickel JC, Wilson JW. Dose-response of bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder cancer. *J Urol* 1992;147:1256-1258.
31. Malkowicz SB. Management of superficial bladder cancer, Intravesical chemotherapy, Bacille Calmette-Guérin. In: Saunders, ed. *Walsh: Campbell's Urology, 8th ed.* 8 ed: Elsevier; 2002:2789-2792.
32. Prescott S, James K, Hargreave TB, Chisholm GD, Smyth JF. Intravesical Evans strain BCG therapy: quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall. *J Urol* 1992;147:1636-1642.
33. Thanhauser A, Bohle A, Schneider B, Reiling N, Mattern T, Ernst M, Flad HD, Ulmer AJ. The induction of bacillus-Calmette-Guerin-activated killer cells requires the presence of monocytes and T-helper type-1 cells. *Cancer Immunol Immunother* 1995;40:103-108.
34. Gerloni M, Zanetti M. CD4 T cells in tumor immunity. *Springer Semin Immunopathol* 2005;27:37-48.
35. van der Bruggen P, Van den Eynde BJ. Processing and presentation of tumor antigens and vaccination strategies. *Curr Opin Immunol* 2006;18:98-104.
36. Rosenberg SA. The Development of New Cancer Therapies Based on the Molecular Identification of Cancer Regression Antigens. *Cancer J Sci Am* 1995;1:90.
37. Dolan BP, Gibbs KD, Jr., Ostrand-Rosenberg S. Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2006;177:6018-6024.
38. Romero P, Cerottini JC, Speiser DE. Monitoring tumor antigen specific T-cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:249-255.

39. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:187-207.
40. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991;254:1643-1647.
41. De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol* 1999;19:7327-7335.
42. Jassim A, Ollier W, Payne A, Biro A, Oliver RT, Festenstein H. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur J Immunol* 1989;19:1215-1220.
43. Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, *et al.*: Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int J Cancer* 2006;118:696-703.
44. Boel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 1995;2:167-175.
45. De Backer O, Arden KC, Boretti M, *et al.*: Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* 1999;59:3157-3165.
46. Toso JF, Oei C, Oshidari F, Tartaglia J, Paoletti E, Lyerly HK, Talib S, Weinhold KJ. MAGE-1-specific precursor cytotoxic T-lymphocytes present among tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with breast cancer: characterization and antigen-specific activation. *Cancer Res* 1996;56:16-20.
47. Sugita Y, Wada H, Fujita S, *et al.*: NY-ESO-1 expression and immunogenicity in malignant and benign breast tumors. *Cancer Res* 2004;64:2199-2204.
48. Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, Herlyn M, Parmiani G. Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J Exp Med* 1993;177:989-998.
49. Narayanan K, Jaramillo A, Benschhoff ND, Campbell LG, Fleming TP, Dietz JR, Mohanakumar T. Response of established human breast tumors to vaccination with mammaglobin-A cDNA. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1388-1396.
50. Marshall JL, Gulley JL, Arlen PM, *et al.*: Phase I study of sequential vaccinations with fowlpox-CEA(6D)-TRICOM alone and sequentially with vaccinia-CEA(6D)-TRICOM, with and without granulocyte-macrophage

colony-stimulating factor, in patients with carcinoembryonic antigen-expressing carcinomas. *J Clin Oncol* 2005;23:720-731.

51. Jager D, Karbach J, Pauligk C, *et al.*: Humoral and cellular immune responses against the breast cancer antigen NY-BR-1: definition of two HLA-A2 restricted peptide epitopes. *Cancer Immun* 2005;5:11.
52. Peoples GE, Goedegebuure PS, Smith R, Linehan DC, Yoshino I, Eberlein TJ. Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:432-436.
53. Anderson BW, Kudelka AP, Honda T, Pollack MS, Gershenson DM, Gillogly MA, Murray JL, Ioannides CG. Induction of determinant spreading and of Th1 responses by in vitro stimulation with HER-2 peptides. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:459-468.
54. Murray JL, Gillogly ME, Przepiorka D, *et al.*: Toxicity, immunogenicity, and induction of E75-specific tumor-lytic CTLs by HER-2 peptide E75 (369-377) combined with granulocyte macrophage colony-stimulating factor in HLA-A2+ patients with metastatic breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3407-3418.
55. Disis ML, Schiffman K, Guthrie K, Salazar LG, Knutson KL, Goodell V, dela Rosa C, Cheever MA. Effect of dose on immune response in patients vaccinated with an her-2/neu intracellular domain protein--based vaccine. *J Clin Oncol* 2004;22:1916-1925.
56. Goydos JS, Elder E, Whiteside TL, Finn OJ, Lotze MT. A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. *J Surg Res* 1996;63:298-304.
57. Gilewski T, Adluri S, Ragupathi G, *et al.*: Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21. *Clin Cancer Res* 2000;6:1693-1701.
58. Svane IM, Pedersen AE, Johnsen HE, *et al.*: Vaccination with p53-peptide-pulsed dendritic cells, of patients with advanced breast cancer: report from a phase I study. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:633-641.
59. Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, *et al.*: Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2004;10:828-839.
60. Wagner WM, Ouyang Q, Pawelec G. The abl/bcr gene product as a novel leukemia-specific antigen: peptides spanning the fusion region of abl/bcr can be recognized by both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:89-96.

61. Gjertsen MK, Bjorheim J, Saeterdal I, Myklebust J, Gaudernack G. Cytotoxic CD4+ and CD8+ T lymphocytes, generated by mutant p21-ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumour cells carrying this mutation. *Int J Cancer* 1997;72:784-790.
62. Longenecker BM, Reddish M, Koganty R, MacLean GD. Specificity of the IgG response in mice and human breast cancer patients following immunization against synthetic sialyl-Tn, an epitope with possible functional significance in metastasis. *Adv Exp Med Biol* 1994;353:105-124.
63. Ibrahim NK, Murray JL. Clinical development of the STn-KLH vaccine (Theratope). *Clin Breast Cancer* 2003;3:S139-143.
64. Jaramillo A, Majumder K, Manna PP, Fleming TP, Doherty G, Dipersio JF, Mohanakumar T. Identification of HLA-A3-restricted CD8+ T cell epitopes derived from mammaglobin-A, a tumor-associated antigen of human breast cancer. *Int J Cancer* 2002;102:499-506.
65. Kawashima I, Tsai V, Southwood S, Takesako K, Sette A, Celis E. Identification of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from carcinoembryonic antigen and HER-2/neu by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Res* 1999;59:431-435.
66. Kobayashi H, Omiya R, Ruiz M, *et al.*: Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 2002;8:3219-3225.
67. Salazar LG, Fikes J, Southwood S, Ishioka G, Knutson KL, Gooley TA, Schiffman K, Disis ML. Immunization of cancer patients with HER-2/neu-derived peptides demonstrating high-affinity binding to multiple class II alleles. *Clin Cancer Res* 2003;9:5559-5565.
68. Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, *et al.*: Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 1999;93:4309-4317.
69. Hiltbold EM, Ciborowski P, Finn OJ. Naturally processed class II epitope from the tumor antigen MUC1 primes human CD4+ T cells. *Cancer Res* 1998;58:5066-5070.
70. Umamo Y, Tsunoda T, Tanaka H, Matsuda K, Yamaue H, Tanimura H. Generation of cytotoxic T cell responses to an HLA-A24 restricted epitope peptide derived from wild-type p53. *Br J Cancer* 2001;84:1052-1057.
71. Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1999;10:673-679.

72. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004;10:909-915.
73. Kontani K, Taguchi O, Ozaki Y, *et al.*: Dendritic cell vaccine immunotherapy of cancer targeting MUC1 mucin. *Int J Mol Med* 2003;12:493-502.
74. Simons JW, Sacks N. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic cancer cellular immunotherapy: the GVAX vaccine for prostate cancer. *Urol Oncol* 2006;24:419-424.
75. Jaffee EM, Hruban RH, Biedrzycki B, *et al.*: Novel allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic cancer: a phase I trial of safety and immune activation. *J Clin Oncol* 2001;19:145-156.
76. Butts C, Murray N, Maksymiuk A, *et al.*: Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIB and IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:6674-6681.
77. Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, *et al.*: Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3089-3094.
78. Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, *et al.*: Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 2001;24:363-373.
79. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, *et al.*: Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002;298:850-854.
80. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986;233:1318-1321.
81. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:666-675.
82. Schwartzentruber DJ, Solomon D, Rosenberg SA, Topalian SL. Characterization of lymphocytes infiltrating human breast cancer: specific immune reactivity detected by measuring cytokine secretion. *J Immunother* 1992;12:1-12.
83. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, *et al.*: Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:622-632.

84. Meijer SL, Dols A, Urba WJ, *et al.*: Adoptive cellular therapy with tumor vaccine draining lymph node lymphocytes after vaccination with HLA-B7/beta2-microglobulin gene-modified autologous tumor cells. *J Immunother* 2002;25:359-372.
85. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneeskd* 1909;5 (Part 1):273–290.
86. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004;22:329-360.
87. Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, *et al.*: Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 1997;186:645-653.
88. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001;410:1107-1111.
89. Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 2002;196:129-134.
90. Muller AJ, Scherle PA. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2006;6:613-625.
91. Boon T. Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes: present perspectives for specific immunotherapy. *Int J Cancer* 1993;54:177-180.
92. De Plaen E, Lurquin C, Van Pel A, *et al.*: Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:2274-2278.
93. Kawashima I, Hudson SJ, Tsai V, Southwood S, Takesako K, Appella E, Sette A, Celis E. The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors. *Hum Immunol* 1998;59:1-14.
94. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, *et al.*: Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 1992;255:1261-1263.
95. Pieper R, Christian RE, Gonzales MI, *et al.*: Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med* 1999;189:757-766.
96. Forget MA, Turcotte S, Beauseigle D, Godin-Ethier J, Pelletier S, Martin J, Tanguay S, Lapointe R. The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially



- expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *Br J Cancer* 2007;96:646-653.
97. Feldman RJ, Sementchenko VI, Watson DK. The epithelial-specific Ets factors occupy a unique position in defining epithelial proliferation, differentiation and carcinogenesis. *Anticancer Res* 2002;23:2125-2132.
  98. Sharrocks AD. Complexities in ETS-domain transcription factor function and regulation: lessons from the TCF (ternary complex factor) subfamily. The Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans* 2002;30:1-9.
  99. Li R, Pei H, Watson DK. Regulation of Ets function by protein - protein interactions. *Oncogene* 2000;19:6514-6523.
  100. Yordy JS, Muise-Helmericks RC. Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* 2000;19:6503-6513.
  101. Wasyluk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A. Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 1998;23:213-216.
  102. Oikawa T. ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 2004;95:626-633.
  103. Galang CK, Muller WJ, Foos G, Oshima RG, Hauser CA. Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *J Biol Chem* 2004;279:11281-11292.
  104. Albanese C, Johnson J, Watanabe G, Eklund N, Vu D, Arnold A, Pestell RG. Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* 1995;270:23589-23597.
  105. Span PN, Manders P, Heuvel JJ, Thomas CM, Bosch RR, Beex LV, Sweep CG. Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* 2002;21:8506-8509.
  106. Scott GK, Chang CH, Erny KM, Xu F, Fredericks WJ, Rauscher FJ, Thor AD, Benz CC. Ets regulation of the erbB2 promoter. *Oncogene* 2000;19:6490-6502.
  107. Eckel KL, Tentler JJ, Cappetta GJ, Diamond SE, Gutierrez-Hartmann A. The epithelial-specific ETS transcription factor ESX/ESE-1/Elf-3 modulates breast cancer-associated gene expression. *DNA Cell Biol* 2003;22:79-94.
  108. Oettgen P, Finger E, Sun Z, *et al.*: PDEF, a novel prostate epithelium-specific ets transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression. *J Biol Chem* 2000;275:1216-1225.

109. Wang Y, Feng L, Said M, Balderman S, Fayazi Z, Liu Y, Ghosh D, Gulick AM. Analysis of the 2.0 Å crystal structure of the protein-DNA complex of the human PDEF Ets domain bound to the prostate specific antigen regulatory site. *Biochemistry* 2005;44:7095-7106.
110. Ghadersohi A, Sood AK. Prostate epithelium-derived Ets transcription factor mRNA is overexpressed in human breast tumors and is a candidate breast tumor marker and a breast tumor antigen. *Clin Cancer Res* 2001;7:2731-2738.
111. Feldman RJ, Sementchenko VI, Gayed M, Fraig MM, Watson DK. Pdef expression in human breast cancer is correlated with invasive potential and altered gene expression. *Cancer Res* 2003;63:4626-4631.
112. Ghadersohi A, Pan D, Fayazi Z, Hicks DG, Winston JS, Li F. Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) downregulates survivin expression and inhibits breast cancer cell growth in vitro and xenograft tumor formation in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 2007;102:19-30.
113. Mitas M, Mikhitarian K, Hoover L, Lockett MA, Kelley L, Hill A, Gillanders WE, Cole DJ. Prostate-specific Ets (PSE) factor: a novel marker for detection of metastatic breast cancer in axillary lymph nodes. *Br J Cancer* 2002;86:899-904.
114. Gunawardane RN, Sgroi DC, Wrobel CN, Koh E, Daley GQ, Brugge JS. Novel role for PDEF in epithelial cell migration and invasion. *Cancer Res* 2005;65:11572-11580.
115. Turner DP, Moussa O, Sauane M, Fisher PB, Watson DK. Prostate-derived ETS factor is a mediator of metastatic potential through the inhibition of migration and invasion in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:1618-1625.
116. Paik S, Tang G, Shak S, *et al.*: Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3726-3734.
117. Kurpios NA, Sabolic NA, Sheperd TG, Fidalgo GN, Hassell JA. Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mam Gland Biol Neo* 2003;8:177-190.
118. Man AK, Young LJ, Tynan JA, *et al.*: Ets2-dependent stromal regulation of mouse mammary tumors. *Mol Cell Biol* 2003;23:8614-8625.
119. Behrens P, Rothe M, Wellmann A, Krischler J, Wernert N. The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol* 2001;194:43-50.
120. Fowler M, Borazanci E, McGhee L, Pylant SW, Williams BJ, Glass J, Davis JN, Meyers S. RUNX1 (AML-1) and RUNX2 (AML-3) cooperate with

- prostate-derived Ets factor to activate transcription from the PSA upstream regulatory region. *J Cell Biochem* 2006;97:1-17.
121. Nozawa M, Yomogida K, Kanno N, Nonomura N, Miki T, Okuyama A, Nishimune Y, Nozaki M. Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells. *Cancer Res* 2000;60:1348-1352.
  122. Gu X, Zerbini LF, Otu HH, *et al.*: Reduced PDEF expression increases invasion and expression of mesenchymal genes in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:4219-4226.
  123. Lepage S, Lapointe R. Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments. *Cancer Res* 2006;66:2423-2432.
  124. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
  125. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
  126. Yamabuki T, Takano A, Hayama S, *et al.*: Dikkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2007;67:2517-2525.
  127. Abdul-Rasool S, Kidson SH, Panieri E, Dent D, Pillay K, Hanekom GS. An evaluation of molecular markers for improved detection of breast cancer metastases in sentinel nodes. *J Clin Pathol* 2006;59:289-297.
  128. Perreard L, Fan C, Quackenbush JF, *et al.*: Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res* 2006;8:R23.
  129. Curigliano G, Spitaleri G, Pietri E, *et al.*: Breast cancer vaccines: a clinical reality or fairy tale? *Ann Oncol* 2006;17:750-762.
  130. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999;50:213-219.
  131. Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 1994;152:163-175.

132. Kuttler C, Nussbaum AK, Dick TP, Rammensee HG, Schild H, Haderl KP. An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J Mol Biol* 2000;298:417-429.
133. Nussbaum AK, Kuttler C, Haderl KP, Rammensee HG, Schild H. PAProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics* 2001;53:87-94.
134. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 2003;63:2836-2843.
135. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998;351:1451-1467.
136. Chien KR. Herceptin and the heart--a molecular modifier of cardiac failure. *N Engl J Med* 2006;354:789-790.
137. Romond EH, Perez EA, Bryant J, *et al.*: Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-1684.
138. Oka Y, Udaka K, Tsuboi A, Elisseeva OA, Ogawa H, Aozasa K, Kishimoto T, Sugiyama H. Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J Immunol* 2000;164:1873-1880.
139. Berg M, Barnea E, Admon A, Zavazava N. A novel DNA methyltransferase I-derived peptide eluted from soluble HLA-A\*0201 induces peptide-specific, tumor-directed cytotoxic T cells. *Int J Cancer* 2004;112:426-432.
140. Bièche I, Onody P, Tozlu S, Driouch K, Vidaud M, Lidereau R. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer* 2003;106:758-765.
141. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, *et al.*: Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1456-1466.
142. Henry NL, Hayes DF. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. *Oncologist* 2006;11:541-552.
143. National comprehensive cancer network (NCCN) Clinical practice guidelines in oncology - Breast cancer. V.1.2007. [[www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast.pdf)].

144. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, *et al.*: 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19:1865-1878.
145. Janicke F, Prechtel A, Thomssen C, *et al.*: Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:913-920.
146. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, *et al.*: Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:116-128.
147. National Cancer Institute. The TAILORx Breast Cancer Trial. [<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/depistage/TAILORx>].
148. European Organization for Research and Treatment of Cancer. A prospective, randomised study comparing the 70-gene expression signature with common clinical-pathological criteria in selecting patients for adjuvant chemotherapy in node-negative breast cancer. (EORTC Protocol 10041 – BIG 3-04). [[http://www.breastinternationalgroup.org/downloads/latestnews/18-07-06/MINDACT\\_trial\\_overview.pdf](http://www.breastinternationalgroup.org/downloads/latestnews/18-07-06/MINDACT_trial_overview.pdf)].
149. Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mammary. Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* 1896;2:104-107, 162-167.
150. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687-1717.
151. Jordan VC. Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* 2004;5:207-213.
152. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res* 2004;10:331S-336S.
153. Laios I, Journe F, Laurent G, Nonclercq D, Toillon RA, Seo HS, Leclercq G. Mechanisms governing the accumulation of estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells treated with hydroxytamoxifen and related antiestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;87:207-221.
154. Dauvois S, White R, Parker MG. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 1993;106 ( Pt 4):1377-1388.

155. Laios I, Journe F, Nonclercq D, Vidal DS, Toillon RA, Laurent G, Leclercq G. Role of the proteasome in the regulation of estrogen receptor alpha turnover and function in MCF-7 breast carcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94:347-359.
156. Massarweh S, Schiff R. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocr Relat Cancer* 2006;13 Suppl 1:S15-24.
157. Britton DJ, Hutcheson IR, Knowlden JM, Barrow D, Giles M, McClelland RA, Gee JM, Nicholson RI. Bidirectional cross talk between ERalpha and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Res Treat* 2006;96:131-146.
158. Martin LA, Farmer I, Johnston SR, Ali S, Marshall C, Dowsett M. Enhanced estrogen receptor (ER) alpha, ERBB2, and MAPK signal transduction pathways operate during the adaptation of MCF-7 cells to long term estrogen deprivation. *J Biol Chem* 2003;278:30458-30468.
159. Oh AS, Lorant LA, Holloway JN, Miller DL, Kern FG, El-Ashry D. Hyperactivation of MAPK induces loss of ERalpha expression in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2001;15:1344-1359.
160. Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE, *et al.*: Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* 2003;144:1032-1044.
161. McClelland RA, Barrow D, Madden TA, Dutkowski CM, Pamment J, Knowlden JM, Gee JM, Nicholson RI. Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF7 breast cancer cells after long-term culture in the presence of the pure antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex). *Endocrinology* 2001;142:2776-2788.
162. Munzone E, Curigliano G, Rocca A, Bonizzi G, Renne G, Goldhirsch A, Nole F. Reverting estrogen-receptor-negative phenotype in HER-2-overexpressing advanced breast cancer patients exposed to trastuzumab plus chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2006;8:R4.
163. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 2001;276:9817-9824.