

D.Brault\*, C.Tse\*, J.-P Lotz\*\*, J.Gligorov\*\*

## La p105 (HER-2 soluble ou ECD) a-t-elle une place dans la prise en charge du cancer du sein ?

### RÉSUMÉ

La surexpression de la protéine HER-2 a été identifiée non seulement comme un facteur de mauvais pronostic des cancers du sein mais surtout comme un facteur prédictif de réponse aux traitements par trastuzumab, un anticorps monoclonal recombinant.

L'étude de la partie circulante extramembranaire de HER-2, ECD pour Extra Cellular Domain (ou encore p105), apparaît comme intéressante du fait de sa bonne corrélation avec les techniques classiques de détermination du statut HER-2 et des informations relatives au statut des cellules cancéreuses qu'elle permet d'obtenir sans recourt à un prélèvement du site tumoral.

Par ailleurs, comme tout marqueur sérique, son taux et sa cinétique d'évolution (avec ou sans traitement) pourrait faciliter la mise en place de stratégies thérapeutiques concernant la population de patientes suivies pour un cancer du sein avec surexpression de HER-2. Des résultats préliminaires vont dans ce sens mais méritent d'être validés à plus grande échelle.

### MOTS-CLÉS

Cancer du sein, HER-2, ECD, IHC, FISH, chimiothérapie, oncologie, biologie, trastuzumab.

## Does p105 (soluble HER-2 or ECD) take place in undertaking of breast cancer ?

### SUMMARY

HER-2 overexpression was identified as a bad prognosis factor in breast cancer but overall as a predictive factor of response to trastuzumab based therapy.

Circulating HER-2 extracellular domain study seems interesting due to a good correlation with classic methods assessing tissue HER-2 status.

Circulating HER-2 may provide a surrogate marker to assess HER-2 status, when tissue biopsy is unavailable.

Decrease rate and kinetic undergoing may provide a predictive information on prognosis and response to treatment and thereby help therapeutic strategies about patients with breast cancer overexpressing HER2.

### KEYWORDS

Breast cancer, HER-2, ECD, IHC, FISH, chemotherapy, oncology, biology, trastuzumab.

### I - Introduction

Le gène HER-2 est un proto-oncogène, son amplification ou sa dysrégulation le transforme en oncogène. L'augmentation du nombre de copies du gène augmente la transcription d'ARNm qui génère une surexpression du récepteur à la surface de la cellule. C'est pourquoi on retrouve son produit d'expression impliqué dans un certain nombre de cancers. HER-2 appartient à la famille des

récepteurs à Tyr-kinase répondant aux facteurs de croissance

Un récepteur membranaire est une protéine située à la surface des cellules, pouvant reconnaître spécifiquement un ligand. En se fixant sur le récepteur le ligand est capable de déclencher une action dans la cellule sans entrer dans celle-ci ; ce qui permet de transmettre par l'intermédiaire d'une cascade d'événements intra-cytoplasmique un signal jusqu'au niveau nucléaire : c'est la transduction.

\*Service de Biochimie - Hôpital Tenon, 75970 Paris cedex 20 - E-Mail : didier.brault@tnn.aphp.fr - Tél. : 01 56 01 64 33

E-Mail : c.tse@tnn.aphp.fr - Tél. : 01 56 01 82 14

\*\*Service d'oncologie médicale - Hôpital Tenon, 75970 Paris cedex 20 - E-Mail : jean-pierre.lotz@tnn.aphp.fr - Tél. : 01 56 01 65 88

E-Mail : joseph.gligorov@tnn.aphp.fr - Tél. : 01 56 01 75 46

## La p105 (HER-2 soluble ou ECD) a-t-elle une place dans la prise en charge du cancer du sein ?

Le signal transmis conduit à la stimulation de l'expression de gènes nucléaires, qui pour HER-2, sont impliqués dans la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire et la transformation cellulaire.

### II - Structure et biologie de la protéine HER-2

HER-2 (ou p185<sup>HER-2</sup>) est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 185 kDa normalement exprimée dans l'épithélium de nombreux organes comme les poumons, la vessie, le pancréas, le sein et la prostate. Elle appartient à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance EGFR (HER-1, HER-2, HER-3, HER-4) ayant une activité tyrosine kinase (RTK). HER-2 est une protéine transmembranaire composée de 3 domaines :

- La partie extra-cellulaire : elle comporte deux domaines riches en cystéine impliqués dans la formation de dimères entre les membres de la famille. La partie extra-cellulaire contient aussi notamment l'épitope réagissant avec l'Herceptin® (trastuzumab), un anticorps monoclonal anti HER-2, et l'épitope réagissant avec l'anticorps mis en œuvre dans la technique de dosage de HER-2 par Elisa. Ces sites ne se masquent pas l'un l'autre même lorsqu'ils sont occupés.
- Le domaine transmembranaire est constitué d'une courte séquence polypeptidique hydrophobe incluse dans la membrane plasmique.
- La partie intra-cytoplasmique qui comprend :
  - un ou 2 domaines catalytique Tyr-kinase ;
  - une extrémité C-terminale qui inclut plusieurs sites d'autophosphorylation au niveau des résidus Tyrosine et constitue une région régulatrice de l'activité du récepteur.

A l'état physiologique une partie des récepteurs HER-2 perdent leur partie extra-membranaire par clivage protéolytique (impliquant des métalloprotéases) et libèrent ainsi dans le torrent circulatoire une "protéine tronquée" d'environ 105 kDa, qui se comporte comme un antigène circulant. C'est la protéine tronquée circulante, ou p105.

Dans le cadre de tumeurs HER-2 positives l'amplification d'HER-2 et/ou sa surexpression conduit à une forte augmentation du nombre de récepteurs à la surface de la cellule tumorale, et du fait de la sécrétion par les métastases de métalloprotéases, l'on conçoit que le taux de p105 augmente en proportion.

#### 1. La protéine HER-2 (le récepteur) : fonctionnement biologique de HER-2

la famille des récepteurs aux facteurs de croissance EGFR est impliquée dans le développement et la régulation de la croissance mammaire normale. Il existe 2 types connus de ligands pour cette famille de récepteurs : l'Epidermal Growth Factor (EGF) et les Neurégulines qui stimulent le développement lobulo-alvéolaire de la glande mammaire.

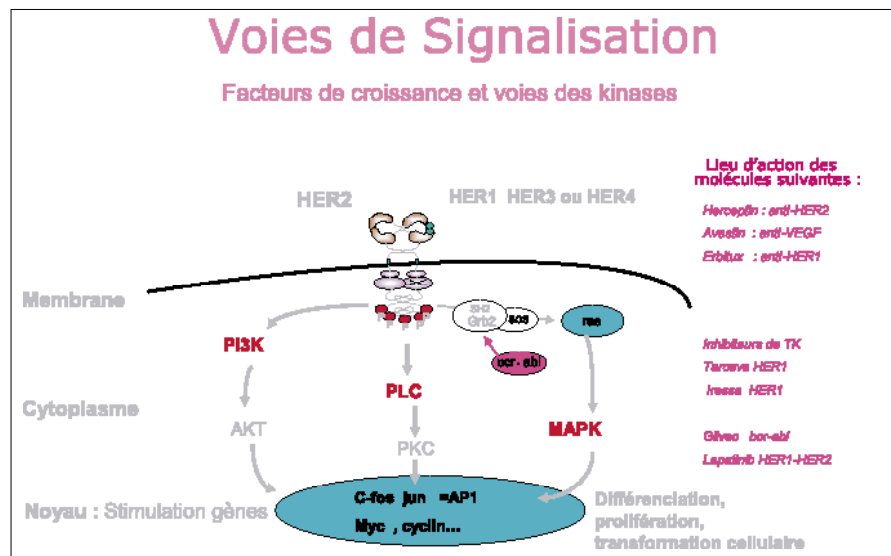


Figure 1  
Les différentes voies de signalisation de HER-2.

Le mécanisme d'activation n'est pas encore complètement élucidé, mais à l'heure actuelle il faut retenir que : la liaison d'un ligand à un récepteur HER ( HER-1, HER-3, HER-4 à l'exclusion de HER-2 dont aucun ligand spécifique n'a été à ce jour identifié) entraîne une modification conformationnelle du récepteur et conduit à "démasquer" les domaines riches en cystéine permettant ainsi la dimérisation avec le domaine riche en Cystéine de HER-2. Cette propriété de dimérisation induisant une transphosphorylation qui active le récepteur, est une condition essentielle à la transmission du signal par ces molécules.

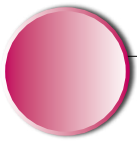
#### 2. Les différentes voies de signalisation

Chacun des dimères précédemment évoqué est à l'origine d'une voie de signalisation cellulaire spécifique, conduisant à la stimulation de l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire et la transformation cellulaire. Il s'agit des voies ras (activant les MAP kinase), phospholipase Cγ (activant la Protéine kinase C), phosphatidylinositol-3'-kinase (activant l'AKT kinase)(voir figure 1). Ces voies sont impliquées dans les mécanismes de la carcinogénèse et constituent la cible de nouvelles thérapéutiques anticancéreuses dont certaines sont aujourd'hui en plein développement clinique.

### III - Détermination du statut HER-2 et dosage de la p105

La détermination de la positivité tumorale de ce statut HER-2 est possible par différentes méthodes :

- **L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)** constitue la technique de référence pour l'étude de l'amplification génique *in situ* sur tissu tumoral. Elle est toutefois coûteuse et sa reproductibilité



inter-site se révèle délicate. La réalisation d'une PCR quantitative en temps réel, après extraction de l'ADN offre une alternative intéressante. Sa réalisation en présence d'un gène de référence et d'un étalon interne en fait une technique facilement standardisable.

• En routine, L'étude de la surexpression de la protéine est évaluée de façon semi-quantitative *in situ* sur tissu tumoral par immunohistochimie (IHC). Une technique de type ELISA classique permet également ce suivi. Le complexe Ag-Ac est révélé par streptavidine/peroxydase/chromogène, sur un *extractum* protéique, standardisée, cette technique s'avère donc reproductible (HER-2/neu ELISA, Oncogene Science-Bayer Diagnostics, marqué CE).

Le taux circulant de HER-2 sérique peut aussi être utilisé pour évaluer le statut HER-2. La détermination est alors réalisée avec la même trousse ELISA que pour la protéine entière, ou par une technique automatisée utilisant le principe de la chimiluminescence directe (HER2/neu Advia-Centaur Bayer Diagnostics) puisque l'épitope reconnu par l'anticorps se trouve sur la partie extra-membranaire. Il n'y a pas de réactions croisées avec les autres membres de la famille EGFR, et surtout il n'y a pas d'interférences avec l'anticorps monoclonal trastuzumab.

Carney *et al* (1) ont repris plusieurs études pour lesquelles les patientes bénéficiaient d'une détermination de la p105 : sur 1923 patientes atteintes de cancer du sein non métastaté le taux moyen de positivité est de 18,5%.

En regroupant 45 études, soit 4622 patientes avec un cancer du sein métastatique le taux de positivité est de 43%. Un résultat superposable aux chiffres de pourcentage de statut HER-2 positif en immunohistochimie, pour ces populations. Sur un échantillon de 97 patientes avec un cancer du sein métastatique, nous avons montré une bonne concordance entre la positivité du taux de p105 (positif si > 15ng/ml) réalisé sur des échantillons sanguins recueillis par ponction veineuse (simple, non invasive, accessible), au moment de la découverte de la métastase et avant l'initiation de la chimiothérapie, et le statut HER-2 déterminé par les techniques "Gold Standard" IHC et FISH sur la tumeur primitive (coefficient de concordance p105 vs IHC,  $k = 0,65$  ; p105 vs FISH  $k=0,70$ )(2).

## IV - HER-2 et cancer du sein.

### 1. HER-2 et la problématique posée aux cliniciens

L'incidence annuelle des nouveaux cas de cancer du sein en France est de l'ordre de 42 000. La prévalence annuelle de patientes prises en charge pour un cancer du sein est de près de 200 000. Parmi les paramètres décisionnels important influant la prise en charge thérapeutique, la connaissance de la positivité des récepteurs hormonaux (oestrogéniques et/ou progestatifs) ainsi que la positivité de HER-2 sont essentielles. La surexpression de HER-2 est historiquement associée à une forme évolutive plus agressive de cancer du sein (augmentation du risque de récurrence, moindre sensibilité au tamoxifène pour les patientes ayant conjointement une surexpression de HER-2 et une positivité des récepteurs hormonaux. Cette surexpression présente chez 20% des cancers a été identifiée comme cible thérapeutique il y a près de 20 ans avec la mise au point d'un traitement spécifique par anticorps monoclonal dirigé contre la partie extramembranaire du récepteur : le trastuzumab (Herceptin®). Les résultats des essais thérapeu-

tiques en situation métastatique et adjuvante ont transformé le pronostic de ces patientes qui sont passées de la population de plus mauvais pronostic en l'absence de traitement spécifique à l'une des populations de meilleur pronostic grâce au traitement par trastuzumab tant en situation métastatique qu'adjuvante.

L'utilisation du trastuzumab pour les patientes présentant un cancer du sein avec une surexpression de HER-2 est donc incontournable. Toutefois l'efficacité de ce médicament est amplifiée lors de son utilisation avec certaines molécules de chimiothérapie du fait d'une synergie démontrée *in vitro* et par ailleurs certaines patientes ayant tout de même une surexpression de HER-2 ne répondent pas à ce traitement.

Plusieurs questions pragmatiques se posent aux cliniciens :

- Le statut HER-2 est-il stable au cours de l'évolution de la maladie ?
- Y a-t-il une prédictivité de réponse aux traitements à base de trastuzumab ?
- Y a-t-il un moyen d'évaluer précocement l'efficacité d'une association thérapeutique comportant du trastuzumab, du fait de la possibilité de moduler ces associations ?

### 2. Stabilité du statut HER-2 au cours de l'évolution

Peu de travaux dans la littérature ont évalué la concordance de la positivité du statut HER-2 entre le site tumoral primitif et le ou les sites métastatiques. Le travail de l'institut Jules Bordet (Gancberg *et al.*) (3) conclut à une concordance de près de 94% témoignant d'une stabilité de l'expression du récepteur HER-2 entre le site tumoral initial et les sites métastatiques.

Toutefois, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse d'une modification du statut HER-2. Beny *et al.*(4) rapportent sur une série de 30 patientes une modification du statut HER-2 avec une acquisition de positivité (par technique IHC) au stade métastatique corrélée à la réponse au traitement par trastuzumab. Meng *et al.* (5) ont récemment décrit, par l'analyse des cellules tumorales circulantes, une amplification génique acquise d'HER-2 au cours de la progression d'un cancer du sein, également corrélée à la réponse au traitement.

En ce qui concerne la place de la p105 dans l'évolution du statut HER-2 au cours de la maladie, Andersen (6) et Molina (7) rapportent des statuts HER-2 négatifs sur la pièce d'exérèse chirurgicale de la tumeur primitive et un sérum positif au stade métastatique.

### 3. Intérêt du taux de base de la p105

Dans une population de patientes traitées par chimiothérapie sans trastuzumab un taux de p105 bas est prédictif d'une meilleure réponse aux anthracyclines (Sandri *et al.*) (8) ou paclitaxel avec gemcitabine (Colomer *et al.*) (9).

En revanche un taux de p105 élevé témoigne d'une meilleure prédictivité de réponse aux traitements à base de trastuzumab (Docetaxel et trastuzumab, Esteva *et al.* (10), ou trastuzumab seul, Lüftner *et al.* (11)).

Dans le domaine des traitements antihormonaux, Lipton *et al.* (12) montrent qu'un taux de p105 élevé se révèle prédictif d'hormonorésistance.

## La p105 (HER-2 soluble ou ECD) a-t-elle une place dans la prise en charge du cancer du sein ?

### 4. Intérêt du suivi du marqueur sérique :

Nous avons montré sur une population restreinte de 33 patientes atteintes de cancer du sein métastatique, recevant un traitement à base de trastuzumab, que le taux de décroissance de p105 à un mois est prédictif d'une réponse au traitement (13).

Récemment, une équipe du Memorial Sloan Kettering à New York, Fornier *et al* (14), retrouve des résultats similaires en ce qui concerne cette fois-ci l'évolution de la p105 à 12 semaines par rapport à l'initiation du traitement.

### V - Place de la p105 dans la prise en charge des cancers du sein

Il existe un taux de p105 détectable chez les sujets sains (< 15ng/mL), dont la signification reste peu précise. En revanche la p105 peut être retrouvée à des taux plus élevés dans le sérum de patients porteurs de différents types de tumeurs solides surexprimant HER-2/neu. Environ 20% des cancers du sein primitifs et plus de 50 % des cancers du sein métastatiques expriment des taux de HER-2 sérique supérieurs aux valeurs usuelles.

Les travaux des différentes équipes ayant évalué la place de la p105 en pratique clinique ont permis de démontrer :

- La corrélation entre le taux de p105 et la positivité du statut HER-2/neu déterminée par les techniques classiques : le dosage sérique peut être proposé comme méthode alternative de l'IHC ou de la FISH, notamment lorsque la tumeur primaire ou le site métastatique ne sont pas accessibles.
- L'intérêt pronostique et prédictif de la p105 dans le suivi des patientes sous traitement : la réponse au traitement n'est pas associée à la concentration en p105, mais au taux de décroissance après un mois de traitement.
- Le suivi des patientes atteintes de cancer du sein afin de dépister une conversion de statut HER-2. Les voies de recherche actuelles sont celles de l'évaluation du suivi de la p105 comme facteur d'évolutivité ou de transformation des tumeurs au cours de l'évolution métastatique.

### VI - Conclusion

Cette présentation met en exergue les deux principaux intérêts du dosage sérique de la p105-HER-2:

- Il constitue un marqueur du statut HER-2 et peut être proposé comme méthode alternative de l'IHC ou de la FISH, notamment lorsque la tumeur primaire ou le site métastatique ne sont pas accessibles, ou comme meilleur reflet du statut HER-2 en situation métastatique.
- Il s'impose comme un facteur prédictif de la réponse au traitement par Herceptin. Cette réponse n'est pas associée à la concentration en p105 avant traitement mais au taux de décroissance de p105 après un mois de traitement. La détermination de ce taux apporte au clinicien une information précoce : un taux de décroissance inférieur à 41% peut l'amener à suspecter une évolution vers la progression, donc arrêter une thérapeutique coûteuse et inefficace, et l'aider à prendre une nouvelle décision thérapeutique bien avant que sa patiente n'évolue vers la progression objectivée par des examens radiologiques.

### BIBLIOGRAPHIE

- (1) CARNEY W, NEUMANN R, LIPTON A et al. Potential clinical utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clin. Chem.*, 2003, 49:10, 1579-1598.
- (2) TSE C, BRAULT D, GLIGOROV J, ANTOINE M, LOTZ JP, CAPEAU J, Evaluation of two quantitative analytical methods for determining HER-2 status in breast cancer patients: real-time polymerase chain reaction for HER-2 gene quantification and enzyme-linked immunosorbent assay of serum HER-2 protein. Comparison with fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry. *Clin. Chem.*, 2005, 51 :7,1093-1101.
- (3) GANCBERG D, DILEO A, CARDOSO et al. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann, Oncol.* 2002, 13(7), 1036-1043.
- (4) BENY et al. Evaluation of HER-2 primary breast cancer and metastatic sites. Summary ASCO2002.
- (5) S.MENG et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *PNAS*, 2004, 101, 25, 9393-9398.
- (6) ANDERSEN TI, PAUS E, NESLAND JM et al. Detection of c-erbB2 related protein in sera from breast cancer patients. *Acta Oncol*, 1995, 34, 499-504
- (7) MOLINA R, JO J, FILELLA X, et al. C-erbB-2 oncoprotein in the sera and tissue of patients with breast cancer. Utility in prognosis. *Anticancer Res*, 1996, 16, 2295-2300
- (8) SANDRI MT, JOHANSSON H, COLLEONI M et al. Serum levels of HER-2 ECD can determine the response rate to low dose oral cyclophosphamide and methotrexate in patients with advanced stage breast carcinoma. *Anticancer Res.*, 2004, 24, 1261-1266.
- (9) COLOMER R, LLOMBART-CUSSAC A, LLUCH A et al. Biweekly paclitaxel plus gemcitabine in advanced breast cancer : phase II trial and predictive value of HER-2 extracellular domain. *Ann. Oncol.*, 2004, 15, 201-206.
- (10) ESTEVA FJ, VALERO V, BOOSER D et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2002, 20,1800-08.
- (11) LÜFTNER D, LÜKE C, POSSINGER K, Serum HER-2/neu management of breast cancer patients, *Clinical Biochemistry*, 2003, 36, 233-240.
- (12) LIPTON A, ALI SM, LEITZEL K et al. Serum HER-2 ant response to the aromatase inhibitor Letrozole versus Tamoxifene. *J. Clin. Oncol.*, 2003, 21,1967-1972.
- (13) C. TSE, D. BRAULT, J. GLIGOROV, M. ANTOINE, JOLLIVET G, ARIEN S, BRINDEL I, CAPEAU J, LOTZ J-P et les co-investigateurs du programme HER. ME.S La concentration sérique en protéine HER-2 circulante (sHER-2) est corrélée au statut HER-2 déterminé par immunohistochimie (IHC) ou par hybridation de fluorescence in situ (FISH) et à la réponse au traitement combinant Herceptin et Taxol (Summary), *Bulletin du Cancer*, 2004, 91, n° 6, 505.
- (14) FORNIER MN, SEIDMAN AD, SCWARTZ MK et al. Serum HER-2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER-2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate. *Ann. Oncol.*, 2005, 16(2), 234-239.