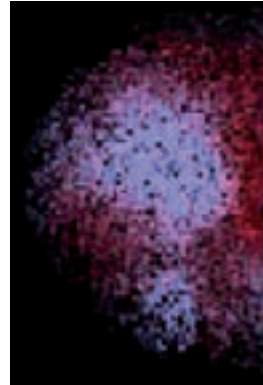


► Les progrès significatifs enregistrés ou attendus dans le diagnostic précoce, la prédiction du pronostic, de la réponse thérapeutique ou de la toxicité, ainsi que l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques devraient permettre l'amélioration de la survie des cancers du sein. L'apparition des technologies d'analyse du protéome, incluant la spectrométrie de masse SELDI-TOF (*surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight*), sont des outils émergents qui peuvent contribuer à atteindre ces objectifs capitaux. ◀

## Profiling protéique SELDI-TOF et cancer du sein

### Applications cliniques potentielles

Anthony Gonçalves, François Bertucci,  
Daniel Birnbaum, Jean-Paul Borg



A. Gonçalves : Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Département de Pharmacologie Moléculaire, Institut Paoli-Calmettes (IPC) et Inserm UMR 599, Marseille, France. Département d'Oncologie Médicale, IPC, Marseille, France. Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, Marseille, France. Département d'Oncologie Médicale, Institut Paoli-Calmettes, 232, boulevard Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France.

F. Bertucci : Département d'Oncologie Médicale, IPC, Marseille, France. Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, Marseille, France. Département d'Oncologie Moléculaire, IPC, Marseille, France.

D. Birnbaum : Département d'Oncologie Moléculaire, IPC, Marseille, France.

J.P. Borg : Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Département de Pharmacologie Moléculaire, Institut Paoli-Calmettes (IPC) et UMR 599 Inserm, Marseille, France.

[goncalvesa@marseille.fnclcc.fr](mailto:goncalvesa@marseille.fnclcc.fr)

Avec près de 42 000 nouveaux cas par an, et environ 11 000 décès annuels, le cancer du sein représente un problème majeur de santé publique en France, comme dans le reste du monde. Bien que des progrès substantiels aient été enregistrés ces dernières années, en relation avec les programmes de dépistage et les traitements post-opératoires dits adjuvants (radiothérapie, chimiothérapie cytotoxique, hormonothérapie, thérapie moléculaire ciblée telle que l'Herceptine® ou trastuzumab), un nombre significatif de patientes évolue encore vers la rechute métastatique, qui demeure incurable à l'heure actuelle.

Parmi les principaux défis à relever pour améliorer la survie des patientes, figure l'amélioration de l'identification précoce des formes sporadiques par le dépistage de masse et des formes héréditaires par l'identification des populations génétiquement à haut risque, pouvant bénéficier des stratégies de surveillance renforcée et/ou de prévention. Une fois le diagnostic posé, il s'agit de déterminer avec plus de précisions le pronostic des patientes (risque élevé ou faible de rechute) et d'identifier les facteurs prédictifs de la réponse aux différentes thérapeutiques disponibles. Il s'agit aussi d'appréhender de façon plus précise les mécanismes moléculaires en cause dans la survenue et la progression de ces cancers afin d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour

de nouvelles approches thérapeutiques, plus spécifiques, plus efficaces et moins toxiques.

### Technologies d'analyse moléculaire à haut débit et grande échelle et spectrométrie de masse SELDI-TOF

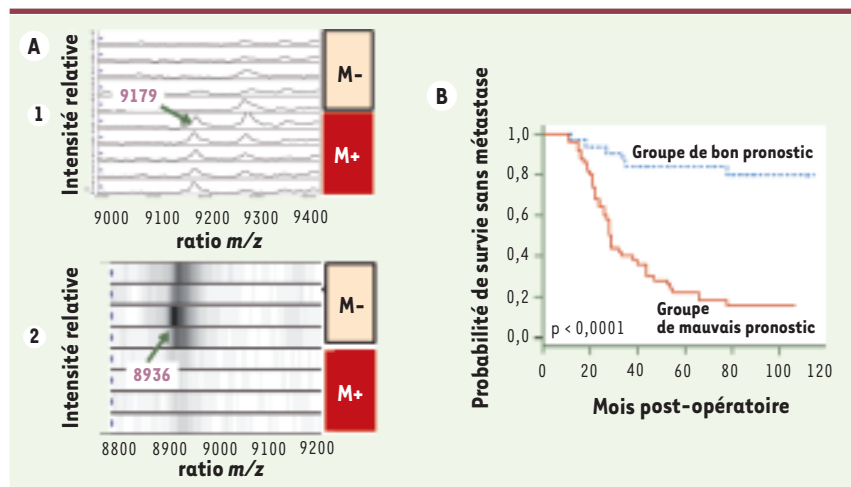
Les cancers du sein sont un groupe hétérogène de maladies dont la complexité moléculaire n'est qu'incomplètement saisie par les outils cliniques ou histologiques conventionnels. Cette maladie est en fait l'association de plusieurs entités moléculaires distinctes, avec des phénotypes et des évolutions cliniques spécifiques [1].

Les nouvelles technologies d'analyse moléculaire à grande échelle - qui étudient plusieurs milliers de molécules simultanément dans un échantillon en une seule expérience - permettent d'aborder la complexité moléculaire des cancers. Parmi ces nouveaux outils d'analyse, qui comprennent notamment l'étude du génome (ADN) et du transcriptome (ARN messenger, ARNm), l'analyse du niveau protéique (protéome) présente un certain nombre d'intérêts majeurs : les niveaux d'ARNm ne corrèlent pas nécessairement avec la quantité de protéines ; un niveau supplémentaire de complexité moléculaire est conféré à l'étage protéique par l'existence de modifications post-traductionnelles qui ne sont pas détectées par les techniques d'analyse du génome ou du transcriptome ; les protéines représentent des cibles thérapeutiques plus accessibles que les acides nucléiques [2]. La détection de profils protéiques d'utilité diagnostique et pronostique dans les sérums et les tumeurs de patients suscite depuis peu un intérêt considérable. Ce champ d'investigation est actuellement dominé par la technologie de spectrométrie de masse SELDI-TOF (*surface enhanced laser desorption/ionization time of flight*). Il s'agit d'une approche particulièrement adaptée aux stratégies de *profiling* protéique à haut débit d'échantillons biologiques complexes, notamment d'échantillons cliniques, en limitant considérablement le nombre d'étapes pré-analytiques [3]. Elle peut concerner des lignées cellulaires ou du matériel tissulaire, mais également des fluides biologiques tels que le sérum, le plasma, les urines ou le liquide céphalo-rachidien. Ces fluides biologiques peuvent être considérés comme des réservoirs biologiques et notamment protéiques, contenant potentiellement

des traces moléculaires informatives provenant des organes qu'ils traversent ou dont ils sont issus. On parle alors de *surrogate tissue* ou tissu de substitution.

Sur le plan méthodologique, l'approche SELDI-TOF comporte plusieurs étapes. La première est une étape de séparation/simplification de l'échantillon fondée essentiellement sur l'utilisation de surfaces à propriétés chromatographiques, les *ProteinChip arrays*, de format miniaturisé, avec lesquelles l'échantillon à analyser est incubé. Cette première étape est suivie de l'analyse en spectrométrie de masse *time of flight* relativement conventionnelle, où les protéines retenues sur les *ProteinChips* vont être caractérisées par leur ratio masse sur charge (ratio  $m/z$ ) qui est fonction de leur temps de vol. La troisième étape est le traitement bioinformatique et biostatistique des données visant à confronter les spectrogrammes obtenus après analyse de chaque échantillon, aux paramètres cliniques ou phénotypiques dont on dispose. Le but est de détecter les biomarqueurs individuels ou les combinaisons de biomarqueurs (profils) qui sont associés à tel ou tel phénotype clinique ou biologique (par exemple, patients cancéreux et patients sains). La dernière étape est l'identification des biomarqueurs d'intérêt à l'aide des technologies de spectrométrie de masse conventionnelle précédemment décrites.

Cette approche méthodologique a suscité beaucoup d'enthousiasme avec la publication en 2002 de résultats spectaculaires illustrant les potentialités diagnostiques du profil protéique sérique pour l'identification de patients atteints de cancer ovarien, y compris de stade précoce [4]. Ces résultats initiaux se sont rapidement associés à d'autres études concernant également le diagnostic des cancers ovariens, mais aussi diverses localisations cancéreuses et notamment les cancers prostatiques, rénaux, mammaires, pancréatiques ou de la sphère ORL. Certaines de ces études ont conduit à l'identification de biomarqueurs diagnostiques potentiels qui restent à valider [5, 6]. Analysées globalement, ces études confirment les potentialités de l'approche méthodologique, mais ont suscité un certain nombre de critiques et de controverses qui persistent encore à l'heure actuelle.



**Figure 1. Identification d'une signature protéique pronostique dans le sérum post-opératoire de patientes atteintes d'un cancer du sein localisé à haut risque par la technologie de spectrométrie de masse SELDI-TOF.** A. (1) Une protéine avec un ratio  $m/z$  de 9179 (spectrogramme) est en quantité augmentée dans le sérum post-opératoire de patientes avec évolution métastatique ultérieure (M+) comparativement aux patientes vivantes sans rechute métastatique à long terme (M-). (2) Une protéine avec un ratio  $m/z$  de 8936 est diminuée chez les patientes M+ comparés aux patientes M- (gel). B. Courbes de survie sans métastase en fonction du groupe pronostique dérivé du profil protéique sérique post-opératoire (Kaplan-Meier) (adapté de [2]).

Ces réserves concernent quatre domaines [7, 8]. Le premier est la reproductibilité des données générées. En effet, si la variabilité intra-essai de la technologie reste acceptable, la variabilité inter-essai et dans le temps semblent plus importantes. Ces aspects sont théoriquement surmontables par l'évolution technologique qui est en cours.

Le second concerne la fenêtre d'analyse protéique sérique. Les biomarqueurs identifiés jusqu'à présent semblent largement dominés par des protéines sériques très abondantes ou relativement abondantes, et notamment des protéines de la réponse inflammatoire de l'hôte, qui font douter de la spécificité des profils décrits. Là encore, l'évolution technologique devrait permettre de mieux fractionner les échantillons et de se débarrasser de façon plus efficace des protéines abondantes, qui limitent l'accès aux protéines spécifiquement tumorales relarguées en quantité limitée dans le sérum notamment aux phases précoces de la maladie. Cependant, il paraît également possible, que certaines protéines relativement abondantes dans le sérum et peu spécifiques, puissent faire l'objet de modifications post-traductionnelles induites de façon spécifique par un processus tumoral donné et donc servir d'outils diagnostiques efficaces.

La troisième réserve est liée au caractère rétrospectif de la plupart des études publiées à l'heure actuelle. Ces études sont susceptibles d'être biaisées par les conditions d'échantillonnage, les modalités de conservation et l'absence de contrôle qualité de nombreux autres paramètres pré-analytiques.

La dernière réserve est le défaut d'expertise dans le traitement biostatistique des données générées, où de très nombreux paramètres sont mesurés dans un nombre relativement faible d'échantillons, faisant émerger un biais d'interprétation connu sous le nom d'*overfitting*.

### SELDI-TOF et cancer du sein

Dans le domaine des cancers du sein, la technologie SELDI a été appliquée aux fluides biologiques que sont le sérum, le plasma mais également à du liquide d'aspiration mamelonnaire et du tissu tumoral, dans le but d'identifier des biomarqueurs d'intérêt diagnostique et/ou pronostique.

Dans le cadre du diagnostic, plusieurs études ont tenté d'identifier des profils protéiques sériques permettant de discriminer sujets sains et patients porteurs de tumeurs du sein bénignes et malignes. Ces études ont retrouvé des profils diagnostiques

avec des sensibilités et des spécificités variant entre 76-93 % et 90-93 %, respectivement [9-11]. Cependant, aucune identification protéique n'était disponible. Une autre étude a également rapporté des résultats encourageants dans une petite population de sujets porteurs d'une mutation du gène de prédisposition au cancer du sein, le gène *BRCA1*. Un profil plasmatique présent chez les patientes développant ultérieurement un cancer du sein a pu être suggéré, par rapport à des sujets porteurs de la mutation qui n'ont pas développé de lésion maligne [12]. Là encore, aucune protéine participant à ce profil n'a été identifiée. Diverses études SELDI ont également été réalisées sur des liquides d'aspiration mamelonnaire ou de lavages canaux, avec l'objectif d'identifier des protéines différenciellement exprimées entre des patientes porteuses ou non de tumeurs du sein. Les résultats quoique relativement prometteurs nécessitent de façon similaire des études additionnelles, incluant des étapes de validation indépendante [13-15].

L'intérêt de l'approche SELDI dans le champ pronostique n'a fait l'objet que de peu d'études à ce jour. Au niveau sérique, nous avons récemment décrit pour la première fois que le profil protéique sérique pouvait porter une information pronostique chez des patientes atteintes d'un cancer du sein localisé avec des facteurs de mauvais pronostic [16]. En utilisant la technologie SELDI-TOF, nous avons rétrospectivement analysé le sérum post-opératoire précoce de 81 patientes présentant un cancer du sein à haut risque avec une indication de chimiothérapie adjuvante. Les sérums collectés après chirurgie et avant initiation de la chimiothérapie adjuvante, ont été fractionnés en combinant billes échangeuses d'anions et rétention sur des *ProteinChips* de différentes spécificités chromatographiques, puis analysés en spectrométrie de masse.

Les protéines différenciellement exprimées en fonction de l'évolution clinique (rechute métastatique ou non) ont été combinées au sein d'un modèle de régression logistique permettant d'engendrer un index protéique de 40 protéines capable de prédire correctement l'évolution métastatique dans 83 % des cas et distinguant deux groupes de patients avec des survies sans rechute métastatique et globale radicalement différentes. Cet index apparaissait en analyse multivariée comme le paramètre pronostique indépendant le plus significativement associé à la probabilité de rechute. L'identification de certaines des protéines constitutives de cet index a été réalisée et celles-ci correspondent essentiellement à des protéines de la réponse de l'hôte, potentiellement impliquées dans des processus biologiques pouvant influencer sur le processus métastatique, tels que la réponse immune ou le processus de néo-angiogenèse.

Très récemment, une autre équipe a utilisé la technologie SELDI à visée pronostique en étudiant les extraits cytosoliques de 60 tumeurs du sein de bon pronostic sans envahissement ganglionnaire [17]. Des protéines tumorales différemment exprimées en fonction de l'évolution vers la rechute ou non ont été mises en évidence, et deux d'entre elles ont été identifiées.

Un autre champ d'application clinique potentiel des approches de *profiling* protéique sérique inclut la prédiction de la réponse thérapeutique aux agents anticancéreux, lorsque ceux-ci sont utilisés en situation métastatique ou de maladie avancée. Au contraire des approches de diagnostic précoce, l'existence d'une large masse tumorale chez ces patients peut rendre la détection d'anomalies moléculaires sériques plus aisée et plus spécifiquement informative. De telles études sont actuellement en cours dans notre institution chez des patientes présentant des cancers du sein métastatiques avancés, recevant un traitement anticancéreux spécifique.

Enfin, un dernier mode d'utilisation potentiel des approches SELDI dans le domaine des cancers du sein inclut les études pharmacodynamiques, visant au *monitoring* des effets biologiques d'une molécule, notamment au niveau des fluides biologiques, afin de prédire les éventuelles toxicités ou activités antitumorales, mais également afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des agents antitumoraux.

## Conclusions

Les approches protéomiques dans les cancers du sein sont encore en phase précoce de développement quant à leur application à de larges cohortes d'échantillons cliniques, mais il ne fait aucun doute qu'elles sont de nature à permettre des progrès immenses dans la prise en charge moderne de ces cancers fréquents.

Les progrès attendus en terme de fractionnement des échantillons comme en termes de sensibilité et de reproductibilité des différentes technologies doivent permettre d'aller vers des outils d'analyses moléculaires simples et rapidement utilisables, générant des biomarqueurs protéiques fiables et validés qui rendront possibles les traitements personnalisés, plus efficaces et moins toxiques, que réclame la médecine du futur. ♦

## SUMMARY

### Proteic profiling SELDI-TOF and breast cancer: clinical potential applications

Significant advances in early diagnosis, prognostic markers, therapeutic response and toxic effect indicators, together with the identification of new potential drug targets, have improved the survival of patients with breast cancer. Proteomic technologies, including SELDI-TOF (surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight) mass spectrometry, are emerging tools that may contribute to better reach these key objectives. ♦

## REMERCIEMENTS

À l'Institut Paoli-Calmettes, l'Inserm, l'Université de la Méditerranée, le Ministère de la Santé et de la Recherche (Cancéropôle ACI2004, ACI2005) et la Ligue Nationale contre le Cancer (label) pour leur soutien.

## RÉFÉRENCES

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000 ; 406 : 747-52.
2. Bertucci F, Birnbaum D, Goncalves A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. *Mol Cell Proteomics* 2006 ; 5 : 1772-86.
3. Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 292 : 587-92.
4. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, *et al.* Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002 ; 359 : 572-7.
5. Kozak KR, Amneus MW, Pusey SM, *et al.* Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 12343-8.
6. Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, *et al.* Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 5882-90.
7. Diamandis EP. Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: drawing attention to potential problems. *J Natl Cancer Inst* 2004 ; 96 : 353-6.
8. Ransohoff DF. Rules of evidence for cancer molecular-marker discovery and validation. *Nat Rev Cancer* 2004 ; 4 : 309-14.
9. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, *et al.* Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002 ; 48 : 1296-304.
10. Vlahou A, Laronga C, Wilson L, *et al.* A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2003 ; 4 : 203-9.
11. Hu Y, Zhang S, Yu J, Liu J, Zheng S. SELDI-TOF-MS: the proteomics and bioinformatics approaches in the diagnosis of breast cancer. *Breast* 2005 ; 14 : 250-5.
12. Becker S, Cazares LH, Watson P. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) differentiation of serum protein profiles of BRCA-1 and sporadic breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2004 ; 11 : 907-14.
13. Paweletz CP, Trock B, Pennanen M, *et al.* Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer. *Dis Markers* 2001 ; 17 : 301-7.
14. Coombes KR, Fritsche HA Jr, Clarke C, *et al.* Quality control and peak finding for proteomics data collected from nipple aspirate fluid by surface-enhanced laser desorption and ionization. *Clin Chem* 2003 ; 49 : 1615-23.
15. Sauter ER, Shan S, Hewett JE, *et al.* Proteomic analysis of nipple aspirate fluid using SELDI-TOF-MS. *Int J Cancer* 2005 ; 114 : 791-6.
16. Goncalves A, Esterni B, Bertucci F, *et al.* Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Oncogene* 2006 ; 25 : 981-9.
17. Ricolleau G, Charbonnel C, Lode L, *et al.* Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling identifies ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors. *Proteomics* 2006 ; 6 : 1963-75.

## TIRÉS À PART

A. Goncalves