

# Rapport 2009 sur l'état des connaissances relatives aux biomarqueurs tissulaires uPA-PAI-1, Oncotype DX™ et Mammaprint® dans la prise en charge du cancer du sein

COLLECTION  
Rapports & synthèses

SYNTHÈSE ET ANALYSE DES  
DONNÉES DE LA LITTÉRATURE  
ÉTAT DES CONNAISSANCES  
EN 2009

DESTINÉ A L'USAGE  
DES PROFESSIONNELS DE SANTÉ



SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE SÉNOLOGIE  
ET DE PATHOLOGIE MAMMAIRE



INSTITUT  
NATIONAL  
DU CANCER

[www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)

**l'Institut National du Cancer** est l'agence nationale sanitaire et scientifique chargée de coordonner la lutte contre le cancer en France.

Ce document est téléchargeable sur  
[www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)

Ce rapport a été élaboré en partenariat  
avec la Société Française de Sénologie et de Pathologie Mammaire.



Ce document a été publié en novembre 2009 avec le soutien financier  
de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer  
[www.fnclcc.fr](http://www.fnclcc.fr)

© Place des biomarqueurs dans la prise en charge du cancer du sein - INCa – Boulogne-Billancourt – Novembre 2009.

Il peut être reproduit ou diffusé librement pour un usage personnel et non destiné à des fins commerciales ou pour des courtes citations. Pour tout autre usage, il convient de demander l'autorisation auprès de l'INCa en remplissant le formulaire de demande de reproduction disponible sur le site Internet [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr) ou auprès du département communication institutionnelle de l'INCa à l'adresse suivante : [publication@institutcancer.fr](mailto:publication@institutcancer.fr)

# TABLE DES MATIÈRES

OBJECTIF .....	4
AVANT PROPOS.....	5
SYNTHÈSE.....	8
<b>PARTIE I - ÉTAT DES CONNAISSANCES RELATIVES AUX BIOMARQUEURS uPA/PAI-1 .....</b>	<b>12</b>
1. INTRODUCTION.....	12
2. RÉSULTATS DE LA SÉLECTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	13
3. RÉSULTATS DES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE .....	14
3.1. Valeur pronostique .....	14
3.2. Valeur prédictive .....	19
4. TECHNIQUE.....	19
5. CONCLUSION .....	20
6. PERSPECTIVES.....	21
<b>PARTIE II - ÉTAT DES CONNAISSANCES RELATIVES A LA SIGNATURE MOLÉCULAIRE « 21-GÈNES », TEST ONCOTYPE DX™ .....</b>	<b>22</b>
1. INTRODUCTION.....	22
2. RÉSULTATS DE LA SÉLECTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	22
3. RÉSULTATS DES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE .....	23
3.1 Valeur pronostique .....	24
3.2 Valeur prédictive .....	29
4. TECHNIQUE.....	30
5. CONCLUSION .....	31
6. PERSPECTIVES.....	32
<b>PARTIE III - ÉTAT DES CONNAISSANCES RELATIVES À LA SIGNATURE MOLÉCULAIRE « 70-GENES », TEST MAMMAPRINT® .....</b>	<b>33</b>
1. INTRODUCTION.....	33
2. RÉSULTATS DE LA SÉLECTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	33
3. RÉSULTATS DES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE .....	34
3.1. Valeur pronostique .....	34
3.2. Valeur prédictive .....	40
4. TECHNIQUE.....	40
5. CONCLUSION .....	40
6. PERSPECTIVES.....	41
ANNEXES .....	42
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	106

## OBJECTIF

Ce rapport dresse un état des connaissances relatives aux biomarqueurs tissulaires uPA/PAI-1, Oncotype DX™ et MammaPrint® dans la prise en charge du cancer du sein.

Le rapport est établi sur la base d'une revue des données scientifiques de la littérature et de l'avis argumenté d'experts (cf. annexe 1).

Il propose notamment :

- une évaluation de la valeur pronostique de ces biomarqueurs
- une évaluation de leur valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie et/ou à l'hormonothérapie
- une description des techniques d'analyse
- des perspectives de recherche pouvant conduire à une amélioration du niveau de validation de ces biomarqueurs.

Ce document est constitué d'une synthèse suivie d'un argumentaire reprenant l'ensemble des études publiées à ce jour sur chacun des trois biomarqueurs.

Il ne couvre pas tous les biomarqueurs utilisés ou en développement dans la prise en charge des cancers du sein, notamment les biomarqueurs de prolifération (Ki-67 et grade génomique), les cellules tumorales circulantes (CTC), la signature « 76-gènes ».

Il ne donne pas de recommandations pour la pratique clinique et n'aborde pas l'évaluation médico-économique.

## AVANT PROPOS

### DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers féminins. Dans le monde, chaque année, l'incidence et la mortalité s'élèvent respectivement à plus de 1 050 000 nouveaux cas diagnostiqués et plus de 400 000 décès ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)).

En France, en 2008, il est estimé qu'environ 54 000 nouveaux cas de cancer du sein, *in situ* compris, ont été diagnostiqués ([www.invsfr](http://www.invsfr)). Plus de 50 % de ces cancers sont diagnostiqués après 65 ans et près de 10 % avant 35 ans ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)). Les effectifs de décès (11 200 estimés en 2008) et les taux de mortalité se sont stabilisés à partir des années quatre-vingt-dix, diminuant même à partir de 2000. Les progrès constatés en matière de dépistage, de traitements et de prises en charge contribuent à améliorer la survie relative (plus de 85 % de survivantes cinq ans après le diagnostic) [1].

### CONTEXTE CLINIQUE

Les indications de traitement adjuvant par hormonothérapie et/ou chimiothérapie dans la prise en charge des cancers du sein invasifs sont basées sur des données cliniques et anatomopathologiques. Le poids respectif de ces différents facteurs dans la décision a évolué ces dernières années.

À titre d'exemple, la prise en compte de facteurs tels que l'âge, le statut ménopausique, la taille tumorale, le grade, l'envahissement ganglionnaire, les angio-invasions et le statut des récepteurs hormonaux a conduit à des recommandations de traitement adjuvant systémique par hormonothérapie et/ou chimiothérapie pour 85 à 95 % des patientes avec un cancer du sein sans atteinte ganglionnaire (N-) [2-5]. Dans ce groupe, des indications de traitement adjuvant (en particulier la chimiothérapie) ont été probablement portées en excès si l'on se réfère à l'évolution clinique spontanée des patientes N- dans les méta-analyses [6-9] et les données d'analyses historiques de l'évolution naturelle des cancers [10,11].

La stratégie de prise en charge, encore tout récemment basée sur l'envahissement ganglionnaire (N-/N+), se définit à l'heure actuelle de manière prioritaire en fonction des facteurs moléculaires reconnus que sont le statut tumoral de HER-2 et celui des récepteurs hormonaux (RH). Elle s'adapte à des patientes sélectionnées sur des critères de prédiction de réponse thérapeutique. En cela, elle ouvre la porte vers une médecine de plus en plus personnalisée.

Le développement de nouveaux marqueurs biologiques, qu'ils soient déterminés par des méthodes anatomopathologiques (immunohistochimie ou hybridation *in situ*), biochimiques ou par biologie moléculaire, vise à améliorer la carte d'identité des tumeurs, avec pour corollaire de définir une population de bon pronostic qui pourrait ne pas recevoir de chimiothérapie et ainsi éviter ses effets indésirables [12-15].

Les études et les essais cliniques utilisés dans les phases de développement et de validation des biomarqueurs présentés dans ce rapport ne sont pas le reflet des traitements actuels. Cela s'explique par les délais de développement des marqueurs ainsi que par le caractère rétrospectif des études employées.

## DÉFINITION ET INTÉRÊT DES BIOMARQUEURS

Un biomarqueur est une caractéristique biologique mesurée objectivement (avec précision et reproductibilité suffisantes) et évaluée comme indicateur d'un processus physiologique ou pathologique ou de l'action de médicaments.

Les biomarqueurs peuvent être utilisés à visée diagnostique, pronostique, prédictive d'une réponse à un traitement ou d'une toxicité, ou encore dans le cadre d'un suivi. Deux types de biomarqueurs sont étudiés dans ce rapport :

- les biomarqueurs tumoraux pronostiques sont utilisés pour prédire l'évolution clinique d'un processus tumoral spécifique en l'absence de traitement ou dans le cadre d'un traitement standard. L'intérêt des biomarqueurs pronostiques réside dans la distinction entre les patients à faible risque de récurrence et ceux à risque élevé. Ils permettent de sélectionner les patients à très faible risque pouvant éviter certains traitements, d'identifier les tumeurs particulièrement agressives, ou encore de distinguer des patients nécessitant une surveillance accrue. Ils n'identifient pas les patients qui pourraient bénéficier d'un traitement spécifique ;
- les biomarqueurs tumoraux prédictifs sont utilisés pour prédire la réponse ou non à une thérapie donnée. Ce sont donc des outils précieux pour aboutir à un traitement personnalisé. Ils requièrent pour leur évaluation deux groupes de patients, de préférence randomisés, l'un soumis à un protocole thérapeutique spécifique, l'autre sans traitement ou soumis à un protocole standard. La valeur prédictive témoigne du degré d'efficacité dudit traitement par rapport au statut du biomarqueur.

Les biomarqueurs étudiés dans ce rapport ont pour objectif d'identifier :

- les patientes à faible risque de récurrence pour lesquelles un traitement adjuvant par hormonothérapie ou chimiothérapie est inutile ;
- les patientes à haut risque de récurrence pour lesquelles des études cliniques complémentaires sont nécessaires pour définir le traitement adjuvant optimal.

## NIVEAUX DE PREUVE

Dans ce rapport, les niveaux de preuve employés s'appuient sur la grille décrite par Hayes en 1996 [16] (cf. annexe 2). On distingue ainsi 3 niveaux de preuve ou *Level of evidence* (LOE) :

- LOE III : niveau de preuve bas ;
- LOE II : niveau de preuve intermédiaire ;
- LOE I : niveau de preuve élevé.

## SYNTHÈSES EXISTANTES DES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

L'*American society of clinical oncology* (ASCO) a proposé en 2007 des recommandations pour l'usage de marqueurs tumoraux dans les cancers du sein, recouvrant les champs du diagnostic, du pronostic, de l'adaptation thérapeutique et de la surveillance [17]. Ces recommandations s'appuient sur le système TMUGS (*Tumor marker utility grading system*) [16] et sa classification par niveau de preuve

(LOE : *Level of evidence*) [18] (cf. annexe 2). Trois biomarqueurs ont atteint un niveau de preuve LOE I<sup>†</sup> pour leur utilité clinique pronostique ou prédictive, à savoir :

- les récepteurs hormonaux permettant de guider la réponse à l'hormonothérapie (valeur prédictive) ;
- l'oncogène HER-2/neu permettant de guider la réponse à un traitement ciblé anti-HER-2 (valeur prédictive) ;
- l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et son inhibiteur principal (PAI-1) permettant de classer les patientes sans atteinte ganglionnaire en groupes pronostiques distincts (valeur pronostique).

D'autres facteurs ont atteint un niveau de preuve inférieur, LOE II ou III, notamment la recherche systématique des cellules tumorales circulantes (CTC) ainsi que les signatures expertisées par technique de biologie moléculaire : la signature moléculaire « 21-gènes » (Oncotype DX™) et la signature moléculaire « 70-gènes » (MammaPrint®).

Les recommandations publiées en 2008 par la *National academy of clinical biochemistry* (NACB) [19] et établies par un panel international d'experts, concordent avec celles de l'ASCO [17] et les complètent, notamment en analysant les données relatives à la qualité des procédures employées [19].

## NOTE

En parallèle des études cliniques qui sont à mener sur les signatures moléculaires, d'autres études devraient s'étendre aux biomarqueurs moléculaires sur coupes tissulaires, en particulier ceux axés sur la prolifération et l'invasion. Ces travaux doivent cibler le même objectif, à savoir l'identification d'une population de femmes ayant un cancer du sein de bon pronostic.

---

<sup>†</sup> Niveau de preuve correspondant à une validation par un essai prospectif où l'analyse du marqueur est l'objectif principal.

# SYNTHÈSE

## UPA/PAI-1

UPA et PAI-1 sont deux protéines impliquées dans les interactions entre la tumeur et son microenvironnement. Elles jouent un rôle important dans l'invasion tumorale via la dégradation de la matrice extracellulaire d'une part, la prolifération, l'adhésion et la migration cellulaire d'autre part. Elles sont associées au développement de la néoangiogenèse tumorale.

### POPULATION CONCERNÉE PAR LE TEST

Chez les patientes avec un cancer du sein sans atteinte ganglionnaire, les biomarqueurs uPA et PAI-1 permettent d'identifier des sous-groupes en fonction du risque de récurrence (survie sans récurrence locale ou contralatérale du cancer du sein).

### VALEUR PRONOSTIQUE

La valeur pronostique d'uPA/PAI-1 est acquise avec un niveau de preuve élevé (LOE I).

En appliquant les seuils de 3 ng/mg de protéine cytosolique pour uPA et/ou 14 ng/mg de protéine cytosolique pour PAI-1, 56 % des femmes avec un cancer du sein sans atteinte ganglionnaire peuvent être classées dans un groupe à faible risque. Le taux de rechute à 3 ans y est de 6,7 % [2,5 %-10,8 %] contre 14,7 % [8,5 %-20,9 %] pour le groupe à risque élevé ( $p = 0,006$ ) [20].

En utilisant les valeurs d'uPA-PAI-1 en tant que variables continues, conduisant à 5 sous-groupes chez les patientes sans atteinte ganglionnaire, les résultats à 10 ans montrent une différence entre le sous-groupe à risque le plus fort et le groupe à risque le plus faible de 28,2 % en termes de survie globale et de 34,5 %, en termes de survie sans récurrence. Un sous-groupe de 20 % des patientes de pronostic particulièrement favorable selon le score uPA/PAI-1 a pu être identifié. Pour ce groupe, la survie globale à 10 ans et la survie sans récurrence étaient respectivement de 87,2 % et de 76,9 % [21].

Chez les patientes avec atteinte ganglionnaire, un large sous-groupe à pronostic particulièrement péjoratif a pu être identifié (40 % des patientes N+). Il se caractérise par une survie sans récurrence à 10 ans inférieure à 30 % [21].

L'efficacité pronostique du test n'a pas été comparée, dans le cadre d'essais prospectifs, aux marqueurs conventionnels tels que le statut HER-2, le statut du récepteur à l'œstrogène et les marqueurs de prolifération.

Toutefois, le test permettrait notamment d'affiner le pronostic des patientes sans envahissement ganglionnaire, postménopausées, ER+, HER-2, grade II, taille de la tumeur inférieure à 2 cm pour lesquelles les indications de chimiothérapie restent discutables à l'heure actuelle.

### VALEUR PRÉDICTIVE

La valeur prédictive de réponse à une chimiothérapie d'uPA/PAI-1 atteint un niveau de preuve intermédiaire (LOE II) et reste donc à confirmer.

Actuellement il n'y a pas d'essai randomisé permettant de conclure à une validité prédictive d'uPA/PAI-1. Chez les patientes à haut risque (risque associé à des taux élevés d'uPA et/ou de PAI-1), une meilleure réponse à une chimiothérapie de type CMF est obtenue en particulier chez les patientes de grade II (LOE II). Ce protocole n'est néanmoins plus le standard thérapeutique. Les

résultats de l'essai européen NNBC-3, initié en Allemagne en 2003, utilisant uPA/PAI-1 comme facteur discriminant (inclusions clôturées en janvier 2009) renseigneront sur le pouvoir prédictif de réponse aux anthracyclines et aux taxanes chez les patientes sans atteinte ganglionnaire mais à haut risque de rechute (facteurs cliniques et histologiques défavorable et/ou uPA et PAI-1 élevés). Comme dans l'essai de Janicke *et al.* [20], les patientes à faible risque sont écartées des indications de chimiothérapie adjuvante. L'essai NNBC-3 prend en compte des paramètres anatomo-cliniques dont le statut HER-2.

## TECHNIQUE

Les analyses sont réalisées par ELISA, test Femtelle® d'*American Diagnostica* approuvé pour le diagnostic *in vitro* CE et FDA (cf. données réglementaires présentées dans l'annexe 18), sur préparation cytosolique d'un échantillon tissulaire non fixé de 50 mg (pouvant être obtenus par microbiopsies). Les mesures s'effectuent sur uPA et sur PAI-1. L'information fournie par les deux protéines est supérieure à celle obtenue par chacune séparément. Le tissu doit être congelé et contrôlé sur le plan anatomopathologique. Ce test ne nécessite pas un dosage centralisé au niveau d'une seule plateforme. Les contrôles qualité des analyses biochimiques se font dans le cadre d'un réseau européen.

## PERSPECTIVES

Au vu des données de la littérature, les thématiques suivantes restent du domaine de la recherche clinique :

- évaluation et validation des analyses pour des prélèvements biopsiques de petite taille (30 à 40 mg). Cette étude est conduite sur le plan européen par le groupe AGO et a été présentée au meeting 2008 ASCO/NIC/EORTC [22] et au SABCS 2008 [23] ;
- comparaison de la puissance pronostique et/ou prédictive d'uPA/PAI-1 par rapport aux autres marqueurs à partir de l'analyse NNBC-3 [24] ;
- comparaison de l'efficacité des anthracyclines et des taxanes dans le groupe de mauvais pronostic défini par uPA/PAI-1 (essai NNBC-3) [25] ;
- conduite de méta-analyses permettant de donner à la valeur prédictive d'uPA/PAI-1 un niveau de preuve LOE I, un essai randomisé évaluant uPA-/chimiothérapie *versus* uPA+/chimiothérapie n'étant pas faisable sur le plan éthique.

## ONCOTYPE DX™

Oncotype DX™ permet l'analyse simultanée par PCR de l'ARNm correspondant à l'expression de 21 gènes à partir de tissu inclus en paraffine.

### POPULATION CONCERNEE PAR LE TEST

Le test Oncotype DX™ permettrait d'affiner la stratification des patientes sans envahissement ganglionnaire, ER+ et recevant du tamoxifène en adjuvant. Trois niveaux de risque (Recurrence score ou RS) sont définis : risque faible, risque intermédiaire et risque élevé.

### VALIDITE PRONOSTIQUE

Compte tenu de l'absence d'essais randomisés et/ou de méta-analyses, la validité pronostique du test Oncotype DX™ ne dépasse pas le niveau de preuve intermédiaire (LOE II).

Dans l'essai nord-américain TAILORx, en cours, les patientes sont réparties de la façon suivante : 14 % en faible risque (RS < 11), 62 % en risque intermédiaire (11 % ≤ RS ≤ 25 %) et 24 % en risque élevé (RS > 25 %). Les patientes du groupe à « risque faible » défini par Oncotype DX™ pourraient se voir épargner la chimiothérapie. Cet essai n'a pas été construit pour juger l'efficacité pronostique du test en comparaison avec les marqueurs conventionnels (statuts HER-2, ER etc.) ou de prolifération.

### VALEUR PREDICTIVE

Compte tenu de l'absence d'essais randomisés et/ou de méta-analyses, la validité prédictive du test Oncotype DX™ ne dépasse pas le niveau de preuve intermédiaire (LOE II).

Chez les patientes sans atteinte ganglionnaire/ER+, ce test permettrait de réserver la chimiothérapie à base de CMF à une catégorie de patientes à haut risque de récurrence ou à risque intermédiaire (LOE II). Comme dans les études pour UPA/PAI-1, ce protocole n'est plus le standard thérapeutique.

L'objectif de l'essai TAILORx est d'attribuer au pouvoir prédictif du test le niveau de preuve LOE I en comparant, chez des patientes à risque intermédiaire la survie sans récurrence. Le schéma de l'essai compare l'association d'une chimiothérapie (laissée à la discrétion du médecin) et d'une hormonothérapie à une hormonothérapie seule.

### TECHNIQUE

Les analyses sont effectuées aux États-Unis au niveau d'une seule plateforme dont les contrôles de qualité sont performants. Les échantillons tissulaires traités sont issus des blocs en paraffine.

### PERSPECTIVES

Au vu des données de la littérature, les thématiques suivantes restent du domaine de la recherche clinique :

- attribution du niveau de preuve LOE I à la valeur pronostique du test en le mettant en compétition avec les autres facteurs de niveau de preuve LOE I (ER, HER-2 et uPA/PAI-1) ;
- attribution du niveau de preuve LOE I à la valeur prédictive du test (cf. essai TAILORx, en cours pour les RS intermédiaires) ;
- évaluation de la valeur pronostique du test chez les patientes recevant des inhibiteurs d'aromatases ;
- évaluation de l'impact des variations de fixation histologique sur les résultats ;
- évaluation de la reproductibilité du test sur d'autres plateformes d'analyse.

## MAMMAPRINT®

MammaPrint® (signature génomique d'Amsterdam) permet l'analyse simultanée par puce à ADN de l'expression de 70 gènes à partir de tissu tumoral congelé.

### POPULATION CONCERNEE PAR LE TEST

MammaPrint® permettrait de classer en haut risque et bas risque les patientes sans atteinte ganglionnaire dont la taille de la tumeur est inférieure ou égale à 5 cm (stade I ou II) et âgées de moins de 61 ans.

### VALEUR PRONOSTIQUE

Compte tenu de l'absence d'analyses prospectives, d'essais randomisés et/ou de méta-analyses, MammaPrint® présente une valeur pronostique à 5 ans avec un niveau de preuve bas (LOE III).

Les résultats attendus d'analyses d'études cliniques prospectives et/ou de l'essai européen MINDACT permettraient d'attribuer au pouvoir pronostique du test le niveau LOE I requis pour une implémentation en clinique. L'essai MINDACT compare la signature génomique (exprimée en haut risque ou bas risque) à Adjuvant! Online, basé sur des critères usuels cliniques et anatomopathologiques tenant compte d'HER-2 (également exprimé en haut risque ou bas risque) pour sélectionner les patientes sans envahissement ganglionnaire susceptibles de bénéficier ou non d'une chimiothérapie adjuvante ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)). Dernièrement, l'essai MINDACT a été étendu aux patientes N+ (1-3).

### VALEUR PREDICTIVE

Il n'y a pas d'études cliniques donc pas de preuve permettant de conclure à une valeur prédictive de MammaPrint®.

Les résultats attendus d'analyses d'études cliniques prospectives ainsi que de l'essai MINDACT permettront peut-être d'attribuer au pouvoir prédictif du test le niveau LOE I.

### TECHNIQUE

Les analyses effectuées par *microarray* sont réalisées au niveau d'un seul laboratoire, situé à Amsterdam, dont les contrôles qualité sont performants. Les échantillons de type microbiopsie concernent des tissus cryopréservés ou conservés dans une solution permettant la stabilisation de l'ARN (RNARetain®).

### PERSPECTIVES

Au vu des données de la littérature, les thématiques suivantes restent du domaine de la recherche clinique :

- attribution du niveau de preuve LOE I à la valeur pronostique du test en le mettant en compétition avec les autres facteurs de niveau de preuve LOE I (ER, HER-2 et uPA/PAI-1) ;
- évaluation des conditions de conservation des échantillons ;
- évaluation de la reproductibilité du test sur d'autres plateformes d'analyse.

# PARTIE I - ÉTAT DES CONNAISSANCES RELATIVES AUX BIOMARQUEURS UPA/PAI-1

## 1. INTRODUCTION

Si la cancérogenèse est liée à des modifications génétiques et épigénétiques intervenant dans les cellules tumorales, l'invasion tumorale et la progression métastatique sont associées en partie à l'interaction entre les cellules tumorales et leur micro-environnement tissulaire. Ce micro-environnement est composé de myofibroblastes activés, de macrophages activés, de cellules endothéliales des néocapillaires du stroma tumoral, ainsi que de cellules inflammatoires dérivant de précurseurs médullaires mobilisés et attirés vers la tumeur primitive ou vers les métastases [26-29]. Des enzymes protéolytiques jouent un rôle important dans la dégradation de la matrice extracellulaire et la régulation des protéines d'adhésion impliquées dans la liaison et la migration cellulaire. Dans ce processus, le système activateur du plasminogène type urokinase (uPA) joue un rôle majeur [30-33]. L'uPA et son inhibiteur PAI-1 sont sécrétés principalement par les cellules du stroma tumoral (myofibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, précurseurs médullaires recrutés) et pour une faible partie par les cellules tumorales [34-36].

Le « système uPA » inclut la sérine protéase uPA, ses deux inhibiteurs PAI-1 et PAI-2 de type « serpines ou *Serine protease inhibitors* », ainsi que son récepteur membranaire uPAR [37]. Le facteur uPA active un ensemble de pro-protéases impliquées dans le phénomène invasif (métalloprotéases, cathepsines à l'exception de la cathepsine D) alors que PAI-1 est un marqueur indirect de la néo-angiogenèse [30,31,38-42]. De plus, PAI-1 protège les cellules endothéliales de l'apoptose FasL induite [42] et son expression est corrélée à la prolifération cellulaire.

L'expression de PAI-1 est corrélée avec un grade histopronostique élevé. En revanche, L'expression de uPA est corrélée avec une expression faible ou nulle des récepteurs hormonaux (ER et PgR). Ces deux facteurs peuvent être analysés séparément. Dans ce texte, nous discuterons la validité clinique de uPA et/ou de PAI-1.

L'évaluation et la validation technique d'uPA/PAI-1 sont un travail essentiellement européen réalisé en réseau à partir de 1985, associant des équipes de recherche orientées d'abord sur la fibrinolyse, puis sur la cancérologie [26-28]. Sur le plan clinique, l'évaluation et la validation ont été réalisées également dans le cadre d'un réseau européen, globalement en trois étapes :

- de 1987 à 1992 : analyse de uPA/PAI-1 sur des prélèvements cryoconservés et étude pilote faite par le groupe GBG (*German breast group*). Les principales publications de la première période n'ont pas été retenues dans l'analyse bibliographique du fait de leur ancienneté ;
- la deuxième étape a été développée dans le cadre des appels à projets de la communauté européenne BIOMED 1 : protocole NNBC-2/chemo N0 dont le promoteur était l'AGO/GBG (*German working group for gynecological oncology / German breast group*), essai prospectif randomisé [20] et analyse « poolée » des études rétrospectives conduites par les membres du réseau EORTC (*European organization for research and treatment in cancer*) [21] ;
- 2003-2009 : utilisation clinique de uPA/PAI-1 dans le cadre d'un protocole européen NNBC-3 dont le promoteur était AGO/EORTC/GBG et inscription de uPA/PAI-1 comme marqueur biologique discriminant dans les recommandations diffusées par l'AGO.

## 2. RÉSULTATS DE LA SÉLECTION BIBLIOGRAPHIQUE

La stratégie de recherche et le processus de sélection bibliographique sont présentés dans les annexes 4 et 5. Au total, 22 références ont été sélectionnées pour la rédaction de la synthèse méthodique (cf. Tableau 1). De nombreuses publications, essentiellement des études rétrospectives, sont absentes de cette analyse qui n'a retenu que les publications à partir de 2001. Une grande partie de ces références est incluse dans l'analyse « poolée » de Look *et al.* publiée en 2002 [21].

TABLEAU 1. Récapitulatif de la sélection bibliographique relative à uPA/PAI-1

TYPES D'ETUDES	REFERENCES
RECOMMANDATION POUR LA PRATIQUE CLINIQUE	Harris <i>et al.</i> 2007 [17] / recommandation de l'ASCO
ESSAI RANDOMISE	Janicke <i>et al.</i> 2001 [20] / essai Chemo N- (NNBC-2) Essai NNBC-3 <sup>‡</sup> : en cours, inclusions clôturées le 15/01/2009
ANALYSE « POOLEE »	Look <i>et al.</i> 2002 [21] <sup>§</sup>
EXTENSION DE L'ANALYSE « POOLEE »	Look <i>et al.</i> 2003 [55]
AUTRES TYPES D'ETUDES	Harbeck <i>et al.</i> 2001 [56], Konecny <i>et al.</i> 2001 [57], Borstnat <i>et al.</i> 2002 [58], Borstnar <i>et al.</i> 2002a [59], Castello <i>et al.</i> 2002 [60], Harbeck <i>et al.</i> 2002 [39], Harbeck <i>et al.</i> 2002a [61], Luqmani <i>et al.</i> 2002 [62], Spyratos <i>et al.</i> 2002 [63], Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64], Cufer <i>et al.</i> 2003 [65], Dazzi <i>et al.</i> 2003 [66], Hansen <i>et al.</i> 2003 [67], Zemzoum <i>et al.</i> 2003 [68], Meo <i>et al.</i> [69], Leissner <i>et al.</i> 2006 [70], Biermann <i>et al.</i> 2008 [71], Descotes <i>et al.</i> 2008 [72], Offersen <i>et al.</i> 2008 [73]

<sup>‡</sup> Une première analyse de l'essai a été publiée par l'équipe de Schmidt en 2009 [24].

<sup>§</sup> Inclut les données issues des études publiées suivantes : [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53], toutes ayant été impliquées dans des programmes d'assurance qualité [54].

### 3. RÉSULTATS DES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

Ce travail présente successivement les études :

- évaluant la valeur pronostique du marqueur : études LOE I (avec technique ELISA) puis les études LOE II ;
- comparant uPA et PAI-1 avec d'autres marqueurs du système activateur du plasminogène ;
- évaluant la valeur prédictive du marqueur : études LOE II, les études LOE I n'étant pas disponibles à ce jour.

Les résultats détaillés des données analytiques et cliniques sont présentés dans les annexes 6 à 8.

#### 3.1. Valeur pronostique

##### 3.1.1. Études LOE I

Les études de niveau de preuve LOE I ont été menées sur du tissu congelé et analysé par des techniques quantitatives biochimiques de type ELISA. Un consensus s'est fait pour utiliser une préparation tissulaire cytosolique et un outil commun analytique développé par les laboratoires *American Diagnostica* en collaboration avec le groupe AGO. Des contrôles qualité européens ont été organisés par F. Sweep à Nijmegen [54,74]. Dans tous les cas, les dosages ont été réalisés sur un fragment de tumeur prélevé au moment de la chirurgie et contrôlé histologiquement.

Une analyse rétrospective de données « poolées » a été menée sur 8 377 données individuelles (sujets avec cancer du sein N+ et N-) provenant de 17 institutions de 9 pays européens [21]. Cette analyse a été construite sur la base des résultats d'une analyse prospective non randomisée qui a permis de valider la valeur pronostique indépendante d'uPA/PAI-1 [20]. Elle a été conduite par des membres de l'EORTC-RBG (*European organization for research and treatment of cancer - Receptor and biomarker group*).

Chez les patientes sans atteinte ganglionnaire, en utilisant les valeurs d'uPA-PAI-1 en tant que variable continue, conduisant à 5 sous groupes, les résultats à 10 ans montrent une différence entre le sous groupe à risque le plus fort et le sous groupe à risque le plus faible de 28,2 % en termes de survie globale et de 34,5 % en termes de survie sans récurrence (cf. Tableau 2). Un sous groupe de 20 % des patientes sans atteinte ganglionnaire et de pronostic particulièrement favorable selon le score uPA/PAI-1 a pu être identifié. Pour ce groupe, la survie globale et la survie sans récurrence étaient respectivement de 87,2 % et de 76,9 %.

Chez les patientes avec atteinte ganglionnaire, un large sous groupe à pronostic particulièrement péjoratif a pu être identifié (40 % des patientes N+). Il se caractérise par une survie sans récurrence à 10 ans inférieure à 30 %. La valeur pronostique de ce test permettrait ainsi de limiter à 40 % la population de patientes N+ qui pourrait bénéficier d'une chimiothérapie agressive [21].

Ces marqueurs ont un poids pronostique indépendant (en analyse multivariée) et supérieur aux autres facteurs (âge, pT, récepteurs hormonaux, grade SBR) [21].

Par ailleurs, l'analyse « poolée » de Look *et al.* a permis de confirmer la fiabilité et la robustesse du test uPA/PAI-1 ainsi que l'efficacité des contrôles qualité européens [21,54]. Néanmoins, on remarque dans cette étude une absence d'informations sur le statut HER-2, non recherché à cette époque.

En 2003, une extension de cette première analyse « poolée » a étudié la survie sans métastases [55]. Malgré son plus faible effectif, les patientes incluses dans cette étude ainsi que les résultats qui en sont issus restent comparables à ceux de l'étude originelle [21,55].

**TABLEAU 2.** Données cliniques de l'étude de Look *et al.* [21]

POPULATION ET SUIVI	RESULTATS
<u>Population</u>	Population globale, après ajustement par variable conventionnelle
3 % < 35 ans	<u>Survie sans récurrence</u>
40 % pré-ménopausées	HR (uPA, n = 8157) = 2,58 (95 % IC : 2,24 - 2,97 ; p < 0,001)
44 % pT1	HR (PAI-1, n = 6682) = 2,58 (95 % IC : 2,24 - 2,97 ; p < 0,001)
56 % sans envahissement ganglionnaire	uPA+PAI-1, n = 6480 ; p < 0,001
45 % ont reçu un ttt adjuvant systémique	<u>Survie globale</u>
35 % de rechute	HR (uPA, n = 8157) = 2,73 (95 % IC : 2,33 - 3,19 ; p < 0,001)
27 % de décès à 10 ans	HR (PAI-1, n = 6682) = 3,12 (95 % IC : 2,65 - 3,67 ; p < 0,001)
	uPA+PAI-1, n = 6480 ; p < 0,001
8377 patientes incluses	Après stratification par sous-groupes d'atteinte ganglionnaire
	<u>SSR/ tous les N- (n = 3483)</u>
<u>Suivi</u>	HR (uPA) = 3,42 (95 % IC : 2,68 - 4,37 ; p < 0,001)
46 à 120 mois	HR (PAI-1) = 2,87 (95 % IC : 2,28 - 3,60 ; p < 0,001)
	<u>SSR/N-+ttt adjuvant (n = 2864)</u>
	HR (uPA) = 3,34 (95 % IC : 2,56 - 4,36 ; p < 0,001)
	HR (PAI-1) = 2,77 (95 % IC : 2,17 - 3,55 ; p < 0,001)
	<u>SSR/tous les N+ (n = 2997)</u>
	HR (uPA) = 2,10 (95 % IC : 1,72 - 2,56 ; p < 0,001)
	HR (PAI-1) = 2,41 (95 % IC : 2,00 - 2,90 ; p < 0,001)
	Des résultats similaires ont été observés pour la survie globale

IC : intervalle de confiance ; HR : Hazard Ratio ; n : effectif de patientes ; SG : survie globale ; SSR : survie sans récurrence.

### 3.1.2. Études LOE II

Avant d'atteindre des études de niveau LOE I, le marqueur a été évalué dans le cadre d'études de niveau LOE II particulièrement riches en informations.

#### Valeur pronostique d'uPA et/ou de PAI-1

L'étude prospective de Janicke *et al.* [20] avait un double objectif :

- valider la valeur pronostique associée au taux d'uPA/PAI-1 (taux faible < au seuil décisionnel/taux élevé > au seuil décisionnel), ceci pour des patientes sans traitement adjuvant ;
- déterminer le bénéfice éventuel d'une chimiothérapie type CMF dans le groupe des patientes à haut risque (uPA et/ou PAI-1 élevés).

L'étude a permis de valider et de confirmer les hypothèses.

L'analyse intermédiaire sur 553 patientes, après un suivi de 32 mois, montrait les résultats suivants : uPA et PAI-1 sont des facteurs pronostiques indépendants déterminant deux groupes à risque, ceci en analyses univariées ou multivariées (RR = 2,8 ; p = 0,007). En effet, lorsque les taux tumoraux de uPA et de PAI-1 ont été considérés dans la classification des patientes en fonction du risque de récurrence, 56 % des patientes N- ont pu être classées dans le groupe à faible risque. En revanche, sur la base du grade histologique (G1) seulement 9 % ont pu être classées dans le groupe à faible risque [20].

En appliquant les seuils de 3 ng/mg de protéine cytosolique pour uPA et/ou 14 ng/mg de protéine cytosolique pour PAI-1, le taux de rechute à 3 ans est de 6,7 % [2,5 %-10,8 %] pour le groupe à faible risque contre 14,7 % [8,5 %-20,9 %] pour le groupe à risque élevé [20]. Devant la confirmation par l'analyse intermédiaire du haut risque associé au taux élevé d'uPA/PAI-1, le comité d'éthique allemand a demandé au promoteur AGO d'interrompre la randomisation pour les patientes à haut risque et de traiter systématiquement toutes les patientes dont le risque était validé biologiquement.

**TABLEAU 3.** Données cliniques de l'étude de Janicke *et al.* [20]

POPULATION ET SUIVI	INTERVENTION	RESULTATS
<u>Population</u> pré et post-ménopausées âge ≤ 70 ans, N- 1 ≤ TS (cm) ≤ 5	Bras A : groupe à risque faible (n = 241) : uPA ≤ 3 ng/mg de prot. et PAI-1 ≤ 14 ng/mg de prot.)	Taux de rechute à 3 ans <u>groupe à risque faible / groupe à risque élevé</u> 6,7 % (95 % IC : 2,5 - 10,8) / 14,7 % (95 % IC : 8,5 - 20,9); p = 0,006
556 patientes incluses  <u>Suivi</u> 32 mois	Groupe à haut risque (n = 315) dont 182 patientes qui ont été randomisées : Bras B1 (n = 88) : CMF Bras B2 (n = 94) : observation	Première analyse intérimaire <u>bras B1 versus bras B2</u> RR = 0,56 (95 % IC : 0,25 - 1,28)  Analyse multivariée (SSR), n=374 RR (uPA/PAI-1) = 2,83 (95 % IC : 1,3 - 6,0 ; p = 0,007) RR (grade histologique) = 3,33 (95 % IC : 1,7 - 6,8 ; p = 0,001)

IC : intervalle de confiance ; RR : risque relatif ; n : effectif de patientes ; SSR : survie sans récurrence.

L'association de uPA et PAI-1 permet une discrimination des groupes à risque plus importante que celle observée avec chacun des deux marqueurs séparément, et ce tout particulièrement en l'absence d'atteinte ganglionnaire [39]. Dans la population globale de l'étude (N-, N+, avec ou sans hormonothérapie ou chimiothérapie), uPA/PAI-1 garde une valeur pronostique, après le statut ganglionnaire, pour la survie sans récurrence et pour la survie globale [39,56]. Il en est de même pour le sous-groupe sans atteinte ganglionnaire [39,56]. Une étude italienne, portant sur 196 patientes N- n'ayant reçu aucun traitement adjuvant, confirme la valeur pronostique de uPA et PAI-1 et de leur combinaison [69]. À noter que 156/276 patientes de la population globale et 110/130 du sous-groupe sans atteinte ganglionnaire ont reçu un traitement systémique adjuvant et que la valeur pronostique est diminuée lorsque ce traitement est administré [56].

Dans une autre étude, aucun des deux marqueurs ne présente de valeur pronostique indépendante en termes de survie globale [67]. En termes de risque de rechute, PAI-1 présente une valeur pronostique indépendante confirmée par deux équipes, contrairement à uPA [67],[65]. En revanche, des taux élevés d'uPA et de PAI-1, considérés conjointement, ont été associés à un risque de rechute plus élevé [65].

L'intérêt majeur de PAI-1 a été confirmé dans une étude publiée en 2008 [72] portant sur 732 patientes (N- et N+). Dans une première analyse multivariée ne considérant que les patientes avec un cancer canalaire, contrairement à uPA, PAI-1 présente une valeur pronostique indépendante statistiquement significative dans la population globale et dans le sous-groupe sans atteinte ganglionnaire aussi bien lorsqu'il est considéré seul dans le modèle ou combiné à uPA [72]. La technique de préparation cytosolique employée est « *home made* » et donc différente de la technique recommandée par le groupe AGO qui emploie le kit *American Diagnostica*.

Deux d'études n'ont pas confirmé la valeur pronostique indépendante d'uPA et/ou de PAI-1 [62,66]. Ces études n'ont pas utilisé le kit *American Diagnostica* sur extrait triton et présentent plusieurs biais méthodologiques (données manquantes, population hétérogène, suivi relativement court).

#### Valeur pronostique d'uPA/PAI-1 et corrélation avec HER-2 (patientes ne recevant pas d'Herceptin®)

Dans une large cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein, des taux élevés de HER-2 et d'uPA/PAI-1 sont significativement associés à une survie sans récurrence réduite ( $p < 0,001$  et  $p = 0,003$ ) ainsi qu'à une survie sans métastase réduite ( $p = 0,015$  et  $p < 0,001$ ) [57]. En analyse multivariée incluant HER-2, uPA/PAI-1 présente une valeur pronostique indépendante en termes de survie sans récurrence et de survie sans métastases. Dans les tumeurs HER-2 positives, la positivité d'uPA seul n'identifie pas de patientes supplémentaires avec une faible survie sans récurrence. Par contre, en termes de survie sans métastase, uPA est particulièrement discriminant (malgré un  $p = 0,0533$ ). Néanmoins, on note l'inclusion de patientes ayant en partie reçu un traitement adjuvant systémique (chimiothérapie associée ou non à une hormonothérapie) et l'absence d'analyse du sous-groupe sans atteinte ganglionnaire. Le suivi, seulement de 3 ans, ne permet pas d'évaluer la survie globale.

Un suivi plus long (10 ans) a été conduit dans une deuxième étude monocentrique de patientes sans atteinte ganglionnaire n'ayant pas reçu de traitement adjuvant [68]. En termes de survie sans récurrence, uPA/PAI-1 est le seul facteur pronostique indépendant, ce qui est en accord avec les résultats d'autres équipes [39,69].

En revanche, lorsqu'on considère la survie globale, seuls les paramètres HER-2 déterminés par FISH (Fluorescent in situ hybridization) et HER-2 déterminés par IHC (Immunohistochimie) se sont révélés indépendants. Lorsqu'on considère les sous-groupes de risque définis par uPA/PAI-1, HER-2/IHC et

HER-2/FISH ne présentent pas d'impact pronostique significatif en termes de survie sans récurrence. En revanche, en termes de survie globale, HER-2/IHC est significatif uniquement dans le sous-groupe à taux élevés d'uPA/PAI-1 (RR = 3,2 ; 95 % IC : 1,2 - 8,3 ; p=0,018 ; n = 111) alors que HER-2/FISH l'est uniquement dans le sous-groupe à taux faible d'uPA/PAI-1 (RR = 6,0 ; 95 % IC : 1,5 - 24,0 ; p = 0,012). Les éventuels biais de sélection ainsi que des déviations possibles inhérentes à la durée de suivi relativement longue ont été contrôlés. Ces résultats contradictoires sont à considérer avec prudence puisque la détermination du statut HER-2 par FISH a été faite sans sonde du chromosome 17 et que la détermination par IHC employait un seuil discutable.

L'étude de Offersen montre que PAI-1 ne semble pas associé à HER-2 pour la survie spécifique du cancer du sein, aussi bien dans la population globale que chez les patientes avec ou sans atteinte ganglionnaire [73]. Dans cette étude, le dosage de PAI-1 est « home made » et uPA n'a pas été pris en compte.

Dans un modèle multivarié incluant HER-2, en plus des variables conventionnelles, PAI-1 présente une valeur pronostique de survie sans récurrence indépendante [64]. Lorsque la survie spécifique du cancer du sein est considérée, le paramètre HER-2 est retenu alors qu'uPA et PAI-1 ne le sont pas [64]. En l'absence d'atteinte ganglionnaire, PAI-1 est le facteur pronostique de survie sans récurrence et de survie spécifique le plus discriminant. Cette étude rétrospective se caractérise par un large effectif et par la prise en compte du sous-groupe traité par tamoxifène. Les résultats sont, néanmoins, à considérer avec prudence puisqu'aucune information concernant la chimiothérapie adjuvante n'a été rapportée.

#### Interaction de l'impact pronostique d'uPA/PAI-1 avec la thérapie systémique adjuvante (chimiothérapie et/ou hormonothérapie)

Dans une étude incluant 761 patientes avec ou sans atteinte ganglionnaire, en l'absence de thérapie systémique adjuvante, uPA et PAI-1 permettent une forte discrimination entre les patientes à faible risque et celles à haut risque de récurrence [39]. En présence d'un traitement adjuvant, cette valeur pronostique disparaît même après distinction entre l'hormonothérapie et la chimiothérapie [39]. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés précédemment par la même équipe [56]. Pour un sous-groupe traité par tamoxifène, une autre étude a rapporté que PAI-1 présente la valeur pronostique de survie sans récurrence la plus discriminante après l'état ganglionnaire (p = 0,003) et avant le statut du récepteur à l'oestrogène (p = 0,02) [64]. En revanche, la valeur pronostique d'uPA n'atteint pas la significativité [64].

#### Valeur pronostique d'uPA/PAI-1 comparée à PAI-2 et à uPAR

Lorsque les deux inhibiteurs (PAI-1 et PAI-2) sont considérés conjointement, le pronostic le plus péjoratif est observé chez les patientes ayant simultanément des taux élevés de PAI-1 et des taux faibles de PAI-2 alors que le cas de figure contraire (taux faibles de PAI-1 et taux élevés de PAI-2) indique un pronostic très favorable [58]. Des résultats similaires sont rapportés par la même équipe lorsque la survie sans récurrence à 3 ans est considérée [59]. Dans cette même étude, l'évaluation d'uPA et de son récepteur (uPAR) ne permet pas de conclure à une valeur pronostique indépendante de ces deux marqueurs. Ces données sont à considérer avec prudence puisque les patientes ont reçu en partie un traitement adjuvant systémique (chimiothérapie et/ou hormonothérapie) non inclus dans l'analyse multivariée.

## 3.2. Valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie

Seules les études de niveau de preuve LOE II évaluent la validité prédictive d'uPA/PAI-1.

Dans l'étude prospective multicentrique conduite par le groupe AGO et n'incluant que des patientes sans atteinte ganglionnaire, lorsque les taux d'uPA et de PAI-1 étaient élevés, une fraction des patientes (182/315) étaient randomisées entre chimiothérapie (CMF : cyclophosphamide, methotrexate, 5-flurouracile, n = 88) ou observation (n = 94) [20].

Chez les 241 patientes du groupe considérées à faible risque (valeurs faibles d'uPA et/ou de PAI-1), la survie sans récurrence à 3 ans est de 93,3 % (p = 0,006) et le taux de rechute de 6,7 % (95 % IC : 2,5-10,8). Avant tout traitement, chez les patientes ayant des valeurs élevées d'uPA et/ou de PAI-1, (N = 315), la survie sans récurrence à 3 ans est de 85,3 % et le taux de rechute de 14,7 % (95 % IC : 8,5-20,9 ; p = 0,006). Ces données confirmant les résultats précédents (revus dans l'étude de Prechtel [75]) ont conduit le Comité d'Éthique à interrompre cet essai n'autorisant plus l'absence de traitement pour les patientes à taux élevé d'uPA et/ou de PAI-1.

Les analyses complémentaires du groupe traité montrent que la chimiothérapie adjuvante entraîne une réduction de la probabilité du risque de rechute de 43,8 %, mais ce sur une très courte période de suivi (3 ans) [39,76]. De même, lorsque la population globale avec ou sans atteinte ganglionnaire a été considérée, la réponse à la chimiothérapie a été plus importante pour des taux élevés d'uPA/PAI-1 avec un taux d'interaction significatif (HR = 0,68 ; 95 % IC : 0,53 - 0,88 ; p < 0,003) [61].

## 4. TECHNIQUE

### ELISA

La mesure d'uPA/PAI-1 par ELISA nécessite un minimum de 50 mg de tissu congelé.

La technique est sensible, spécifique, hautement reproductible, standardisée et la qualité peut être facilement contrôlée [54].

Les seuils validés sont ceux établis par le groupe AGO (uPA > 3 ng/mg protéine cytosolique et/ou PAI-1 > 14 ng/mg protéine cytosolique).

La technique est approuvée par la FDA et labellisée « CE marked In Vitro Diagnostic Device Product ». Elle utilise le kit « FEMTELLE®, uPA/PAI-1, ELISA » anciennement Imubind-894 (uPA) et Imubind-821 (PAI-1) des laboratoires *American Diagnostica*.

En France, ce type de test entre dans la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale depuis 2003 sous la rubrique « Paramètres tissulaires en cancérologie : dosages quantitatifs à partir d'une extraction subcellulaire d'un échantillon cryopréservé ». La double détermination d'uPA et de PAI-1 et la préparation tissulaire correspondent à un B 300. Deux laboratoires en France réalisent en routine les dosages d'uPA/PAI-1. Ils ont, tous les deux, participé à l'essai NNBC-3. L'un d'entre eux a assuré la quasi-totalité des dosages des centres participant à l'essai. Les marqueurs uPA et PAI-1 sont intégrés dans la pratique clinique dans certains pays européens tels que l'Allemagne [19].

L'utilisation de ces techniques nécessite des prélèvements congelés rapidement et contrôlés sur le plan anatomopathologique.

L'emploi des marqueurs uPA/PAI-1 peut être facilité par l'existence d'un réseau européen prenant en charge la formation et les contrôles qualité.

## RT-PCR

La RT-PCR, bien qu'elle soit une technique reproductible, sensible, spécifique et qu'elle ne nécessite pas de quantités élevées d'échantillons (soit congelés soit inclus en paraffiné), ne peut pas représenter une alternative aux mesures par ELISA en raison d'une mauvaise corrélation entre les deux techniques.

La comparaison des taux d'expression des ARNm relatifs à uPA et à PAI-1 par RT-PCR par rapport aux taux de ces mêmes marqueurs obtenus par ELISA montre une corrélation statistiquement non significative pour uPA et statistiquement significative pour PAI-1 [63]. Les mêmes résultats ont été obtenus par une autre équipe [60]. *A contrario*, l'équipe de Biermann [71] n'a pas trouvé de corrélation significative, ni avec uPA, ni avec PAI-1.

Ces résultats sont à considérer avec prudence en raison des biais méthodologiques des études tels que :

- effectif relativement faible ;
- durée de suivi trop courte ;
- manque d'information quant au traitement adjuvant systémique reçu ;
- taille relativement élevée de la tumeur conduisant à un biais de sélection par hétérogénéité tumorale ;
- critères de jugement non pertinents cliniquement.

## Autres

Compte tenu de la difficulté d'interprétation de l'immunomarquage, les techniques immunohistochimiques n'ont pas été retenues.

## 5. CONCLUSION

### VALEUR PRONOSTIQUE (cf. annexe 9)

Chez les patientes porteuses d'un cancer du sein sans atteinte ganglionnaire, le test permet d'isoler un groupe de 20 % de patientes de pronostic particulièrement favorable (taux faible d'uPA et de PAI-1) et chez lesquelles une chimiothérapie n'est pas indiquée (LOE I). La performance de ce test permet de scinder de façon efficace les patientes de grade histopronostique II. Cette conclusion repose sur :

- plusieurs études rétrospectives depuis 1988 qui ont montré un impact pronostique de uPA et/ou PAI-1 ;
- des résultats issus d'une méta-analyse de bonne qualité méthodologique [21] qui concordent avec ceux d'un essai clinique de validation publié en 2001 où uPA et PAI-1 étaient analysés de manière prospective [20].

Des contrôles qualité des analyses ont été réalisés par le RBG (*Receptor and biomarker group*) de l'EORTC. Ce groupe est actuellement inclus dans le PBG (*Pathobiology group*) de l'EORTC. Le test est sensible, spécifique et hautement reproductible et a l'approbation FDA/CE pour le diagnostic [54].

Le test permettrait notamment d'affiner le pronostic pour les patientes sans envahissement ganglionnaire, post-ménopausées, ER positif, HER-2 négatif, grade II, taille tumorale inférieure à 2 cm pour lesquelles les indications de chimiothérapie restent discutables.

### VALEUR PRÉDICTIVE (cf. annexe 9)

Chez les patientes à haut risque (avec des taux élevés d'uPA ou de PAI-1), le bénéfice d'une chimiothérapie de type CMF est observé en particulier chez les patientes de grade II (LOE II). Ce protocole n'est néanmoins plus le standard thérapeutique.

## 6. PERSPECTIVES

Plusieurs questions d'ordre analytique et/ou clinique sont en cours d'évaluation :

- évaluation et validation des analyses pour des prélèvements biopsiques de petite taille (30 à 40 mg). Cette étude est conduite sur le plan européen par le groupe AGO et a été présentée au meeting 2008 ASCO/NIC/EORTC [22] et au SABCs 2008 [23] ;
- comparaison de la puissance pronostique et/ou prédictive d'uPA/PAI-1 par rapport aux autres marqueurs à partir de l'analyse NNBC-3 [24] ;
- comparaison de l'efficacité des anthracyclines et des taxanes dans le groupe de mauvais pronostic défini par uPA/PAI-1. Dans cette perspective, l'essai NNBC-3 a été initié en Allemagne en 2003 et réalisé en Europe [25]. Cet essai prend en compte des paramètres anatomocliniques, dont le statut HER-2.

D'autres questions restent du domaine de la réflexion telle la conduite de méta-analyses permettant de donner à la valeur prédictive d'uPA/PAI-1 un niveau de preuve LOE I. Les protocoles de chimiothérapie à évaluer doivent correspondre à ceux employés en routine, un essai randomisé évaluant uPA-/chimiothérapie *versus* uPA+/chimiothérapie n'étant pas faisable sur le plan éthique.

# PARTIE II - ÉTAT DES CONNAISSANCES RELATIVES À LA SIGNATURE MOLÉCULAIRE « 21-GÈNES », TEST ONCOTYPE DX™

## 1. INTRODUCTION

Chez les patientes avec un cancer du sein ER+ sans atteinte ganglionnaire, le risque de survenue de récurrence à distance est insuffisamment apprécié par les critères cliniques et histopathologiques standard. Des études cliniques d'envergure telles que les 2 essais B-14 et B-20 du NSABP (*National surgical adjuvant breast and bowel project*) ont démontré le bénéfice du tamoxifène et de la chimiothérapie chez ce type de patiente [77-79]. Cependant, en l'absence de chimiothérapie adjuvante, la majorité de ces patientes ne développe pas de métastase.

Le profil d'expression de gènes obtenu par des méthodes analytiques telles que la *Real time* RT-PCR (*Reverse transcriptase polymerase chain reaction*) ou les puces à ADN (*DNA-microarray*) pourrait affiner ce risque.

La signature « 21-gènes » repose sur une analyse en *Real-Time* RT-PCR à partir de tissu tumoral inclus en paraffine après fixation au formol. Cette technique a, en effet, démontré ses performances analytiques à partir de tissus archivés en paraffine [80]. Le test « 21 gènes » est dédié à la stratification des patientes sans envahissement ganglionnaire et ER+, recevant en adjuvant du tamoxifène. Trois catégories de patientes sont identifiées (patientes à risque faible, intermédiaire ou élevé).

## 2. RÉSULTATS DE LA SÉLECTION BIBLIOGRAPHIQUE

La stratégie de recherche et le processus de sélection bibliographique sont présentés dans les annexes 3 et 4. Au total, 14 références ont été sélectionnées pour la rédaction de la synthèse méthodique (cf. tableau 4).

TABLEAU 4. Résultat de la sélection bibliographique relatif à Oncotype DX™

TYPES D'ETUDES	REFERENCES
RECOMMANDATIONS POUR LA PRATIQUE CLINIQUE	Haaris <i>et al.</i> 2007 [17] / ASCO
ESSAI RANDOMISE	Aucune référence n'a été identifiée Essai TAILORx en cours (Sparano <i>et al.</i> 2006 [81])
SYNTHESE METHODIQUE	Marchionni <i>et al.</i> 2008 [82]
AUTRES TYPES D'ETUDES	Cronin <i>et al.</i> 2004 [80], Paik <i>et al.</i> 2004 [83], Cobleigh <i>et al.</i> 2005 [84], Esteva <i>et al.</i> 2005 [85], Habel <i>et al.</i> 2006 [86], Paik <i>et al.</i> 2006 [87], Cronin <i>et al.</i> 2007 [88], Badve <i>et al.</i> 2008 [89], Sparano <i>et al.</i> 2008 [90], Wolf <i>et al.</i> 2008 [91], Goldstein <i>et al.</i> 2008 [92], Flanagan <i>et al.</i> 2008 [93]

### 3. RÉSULTATS DES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

Avant d'atteindre des études de niveau LOE II, le marqueur a été évalué dans le cadre d'études de niveau LOE III qui ont abouti à la définition de la signature, au développement et à la validation du test. Aucune étude de niveau de preuve LOE I n'est disponible pour Oncotype DX™.

Les résultats de 3 études préliminaires indépendantes, impliquant 447 patientes avec 185 à 250 gènes candidats [94-96], ont conduit à la sélection finale des 21 gènes ainsi qu'à l'algorithme de mesure « Recurrence Score™ (RS) ». Les cas se répartissaient de la manière suivante :

- 136 patientes du Providence Saint-Joseph medical center, Burbank, Californie : N+/-, ER+/- traitées par tamoxifène ou chimiothérapie [94] ;
- 78 patientes de la Rush University, Chicago, Illinois : N+ (N+ > 10), ER+/-, ayant reçu du tamoxifène ou de la chimiothérapie [95] ;
- 233 patientes ER+/- N- dans le bras tamoxifène de l'essai NSABP-B20 [96].

Seule la série de Cobleigh a été publiée sous forme d'article dans une revue à comité de lecture [84].

Cette signature multi-gènes comprend 16 gènes spécifiques associés au risque de récurrence auxquels s'ajoutent 5 autres gènes de référence (cf. tableau 5). Ces 5 gènes permettent la normalisation des taux d'expression des gènes qui varient en fonction de la quantité et de la qualité de l'ARN extrait. Le résultat est exprimé sous forme d'une variable continue (Recurrence Score™ : RS) allant de 0 à 100, correspondant au risque de récurrence du cancer du sein à 10 ans.

Parmi les 16 gènes spécifiques, 5 gènes sont associés à la prolifération, 4 gènes à l'œstrogéno-régulation, 2 gènes à HER-2, 2 gènes à l'invasion et 3 à d'autres fonctions. L'algorithme du RS tient compte de coefficients pré-définis sur la base d'une analyse de régression de l'expression des gènes et des récurrences observées dans les 3 études de développement de la signature [94-96]. Cet algorithme est basé sur les 16 gènes spécifiques [83] (cf. tableau 5) principalement sur ceux liés à la prolifération cellulaire ainsi qu'à l'œstrogéno-sensibilité et à un moindre degré à HER-2 [83]. Les 5 gènes restants ont un poids très faible dans l'algorithme.

**TABLEAU 5.** Liste des gènes de la signature "21-gènes"\*

GENES SPECIFIQUES DU CANCER					GENES DE REFERENCE
PROLIFERATION	HER-2	ŒSTROGENE	INVASION	AUTRES	
Ki67					ACTB (α-actine)
STK15		ER	MMP11		GAPDH
Survivin	GRB7	PgR	(stromélysine 3)	GSTM1	RPLPO
CNNB1 (cycline B1)	HER-2	BCL2	CTSL2	CD68	GUS
MYBL2		SCUBE2	(cathepsine L2)	BAG1	TFRC

\*d'après Paik *et al.* [83].

Ce document présente successivement :

- la valeur pronostique : les résultats disponibles concernent les patientes N-, RH+, post-ménopausées traitées ou non par tamoxifène et/ou par chimiothérapie ;
- la valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie ou à l'hormonothérapie : les résultats sont disponibles chez les patientes ER+/N- ou ER+/N+. (cf. annexes 11 à 13).

### 3.1 Valeur pronostique

Valeur pronostique du RS (Recurrence Score) chez les patientes N-, RH+, post-ménopausées (cf. tableau 6)

La validation rétrospective du test a été réalisée par Paik en 2004 [83] sur une cohorte du NSABP-B14 évaluant l'efficacité du tamoxifène chez des patientes ER+ sans atteinte ganglionnaire [77]. Cette étude rapporte un taux de patientes sans métastase à distance à 10 ans significativement supérieur dans le groupe à RS faible (93,2 %) par rapport à celui des patientes à RS élevé (69,5 % ;  $p < 0,001$ ) [83]. Il en est de même pour les 2 critères secondaires (survie globale à 10 ans et intervalle libre de rechute), ce qui permet de considérer ces 3 critères cliniques comme pertinents dans les études ultérieures de validation de la valeur pronostique et prédictive du test. En analyse multivariée incluant des paramètres conventionnels, une relation statistiquement significative entre le RS et le risque de métastase à distance a été notée. L'étude a l'avantage d'avoir été réalisée sur une population de patientes N-, RH+, post-ménopausées, sous tamoxifène chez qui la réduction de l'offre de chimiothérapie semble la plus pertinente. Cette étude évalue donc l'utilisation du test dans des conditions similaires à la réalité.

Une étude publiée par Esteva en 2005 [85] rapporte des résultats différents de l'étude de Paik. L'étude de 149 patientes sans atteinte ganglionnaire et sans thérapie adjuvante (sans hormonothérapie, ni chimiothérapie) n'a pas montré de corrélation entre le RS et la survie sans récurrence à distance. Une concordance élevée a été mise en évidence entre les statuts ER, PgR et HER-2 mesurés par RT-PCR dans le test d'une part, et les mêmes statuts par immunohistochimie, d'autre part. Ce résultat apporte de la crédibilité à la RT-PCR. Bien que l'extraction des ARN soit réalisée selon une procédure standardisée [80] et que l'analyse soit effectuée par des statisticiens indépendants, l'étude d'Esteva présente plusieurs limites méthodologiques [85] :

- absence de traitement par du tamoxifène ;
- inclusion des patientes avec des statuts ER+ et ER- ;
- population prise comme référence non représentative des patientes atteintes d'un cancer du sein en raison de l'association inattendue entre un grade nucléaire élevé et une bonne évolution clinique ( $p = 0,02$ ) ;
- le test employé est en partie « home made » et donc n'est pas strictement identique au test Oncotype DX™ commercialisé.

Dans une étude cas-témoins indépendante publiée en 2006, sur 790 patientes sans atteinte ganglionnaire (220 cas et 550 témoins), n'ayant pas reçu de chimiothérapie, le RS était fortement associé au risque de décès dans le groupe ER+ non traité par tamoxifène [86].

Globalement, les 3 études [83,85,86] évaluent la performance du RS en l'absence de chimiothérapie et ont l'avantage d'employer des méthodes analytiques et des seuils similaires ainsi que d'être conduites dans des cohortes de patientes indépendantes de celle employée pour la sélection des gènes et pour le développement de l'algorithme conduisant au RS.

Une étude confirmatoire monocentrique publiée en 2008 a rapporté une valeur pronostique du RS statistiquement significative ( $p < 0,0001$ ) pour le risque de récurrence chez 397 patientes ER+ avec ou sans atteinte ganglionnaire [89]. Les résultats prouvent que le score RS est particulièrement discriminant dans l'identification des patientes à faible risque ( $RS < 18$ ). Dans le sous-groupe de patientes sans atteinte ganglionnaire, le RS présente une valeur pronostique significative ( $p = 0,0016$ ), ce qui est en accord avec les résultats des études antérieures. La performance du RS ne faisait pas partie des objectifs principaux de l'étude et le seuil considéré ( $RS < 18$ ) ne correspondait pas à celui validé ( $RS < 11$ ) [90].

**TABLEAU 6.** Données cliniques des études de Paik *et al.* [83], de Esteva *et al.* [85] et de Habel *et al.* [86]

REFERENCES	POPULATION	FACTEURS PRONOSTIQUES*	RESULTATS
Paik <i>et al.</i> 2004 [83] 668 patientes évaluées	NSABP-B14 âge < 50 ans (29 %), 50-60 (26 %), > 60 (45 %) N- (100 %), ER+ (100 %) tamoxifène (100 %) CT (0 %) TS < 2 cm (62 %) 2617 patientes incluses 675 patientes évaluables	âge, TS, TG ER / PgR HER-2 (ADN)	Analyse multivariée 1 (métastases à distance) âge : HR = 0,71 (95 % IC : 0,48 - 1,05 ; $p = 0,08$ ) TS : HR = 1,26 (95 % IC : 0,86 - 1,86 ; $p = 0,23$ ) RS : HR = 3,21 (95 % IC : 2,23 - 4,16 ; $p < 0,001$ ) Analyse multivariée 2 (métastases à distance) âge, TS, HER-2, ER : ns TG faiblement différencié : HR = 5,14 (95 % IC : 2,89 - 9,15 ; $p < 0,001$ ) RS : HR = 2,81 (95 % IC : 1,70 - 4,64 ; $p < 0,001$ )
Esteva <i>et al.</i> 2005 [85] 149 patientes évaluées	âge 58 ans $\pm 11,5$ ; N- pré-ménopausées (81,9 %) post-ménopausées (18,1 %) pas de thérapie adjuvante TS : 2,3 $\pm$ 1,1 cm ER+ (69,1 %) PgR+ (33,6 %) HER-2 + (16,8 %)	NA	Pas de corrélation significative entre le RS et la survie sans récurrence distante. Pas de différence significative entre les 3 catégories (faible, intermédiaire et fort) en termes de RS ou de survie sans récurrence distante. Récurrence distante à 10 ans (95 % IC) RS < 18 : 18 % (7 - 30) / 18 < RS < 31 : 38 % (15 - 61) / RS $\geq$ 31 : 28 % (13 - 32)
Habel <i>et al.</i> 2006 [86] 790 patientes évalués	Registre KAISER : 220 cas 570 témoins ; N- âge <40 : 8 % / 4 % 40-49 : 19 % / 22 % 50-59 : 29 % / 27 % 60-74 : 44 % / 47 % Sans Tam adjuvant : 71 % / 69 % ER+ : 76 % / 90 % ; ER- : 24 % / 10 % TS $\leq$ 1 : 22 % / 34 % 1,1 - 2 : 42 % / 45 % 2,1 - 4 : 33 % / 20 % >4 : 3 % / 1 % TG élevé : 11 % / 31 % moyen : 42 % / 46 % faible : 47 % / 23 % RS<18 : 26 % / 56 % 18<RS<31 : 25 % / 19 % $\geq$ 31 : 50 % / 25 %	âge, TS, TG, ER, Tam	ER+ traitées par du Tam : RS < 18 : RR = 2,8 95 % IC (1,7 - 3,9) 18 < RS < 31 : RR = 10,7 95 % IC (6,3 - 14,9) RS $\geq$ 31 : RR = 15,5 95 % IC (7,6 - 22,8)  ER+ non traitées par du Tam : RS < 18 : RR = 6,2 (95 % IC : 4,5 - 7,9) 18 < RS < 31 : 17,8 (95 % IC : 11,8 - 23,3) RS $\geq$ 31 : 19,9 (95 % IC : 14,2 - 25,2)

\*étudiés en analyse multivariée ; IC : intervalle de confiance ; CT : chimiothérapie ; HR : Hazard Ratio ; n : effectif de patientes ; NA : non applicable ; ns : non significatif ; SSMD : survie sans métastases distantes ; SSR : survie sans récurrence ; RR : risque relatif ; Tam : tamoxifène ; TG : grade tumoral ; TS : taille tumorale.

## Valeur pronostique du RS (Recurrence Score) - association avec la chimiothérapie

La valeur pronostique du RS en association avec la chimiothérapie chez des patientes avec atteinte ganglionnaire a été évaluée pour la première fois dans une étude rétrospective sur 99 patientes (cas ayant rechuté) et 366 patientes (témoins n'ayant pas rechuté) [92] (cf. tableau 7). Il en ressort que le RS est un facteur pronostique significatif de la récurrence globale aussi bien en présence qu'en absence d'atteinte ganglionnaire. Après ajustement aux variables cliniques et anatomopathologiques, le RS reste fortement associé au risque de récurrence. Dans le groupe de patientes sous chimiothérapie, le risque de récurrence n'est pas augmenté quand le RS est supérieur à 40, ce qui est en accord avec les données de l'étude de Paik publiée en 2006 [87] (cf. tableau 10) suggérant que le meilleur bénéfice apporté par la chimiothérapie est observé lorsque le RS est élevé. Les caractéristiques clinicopathologiques ont été intégrées dans un logiciel (appelé intégrateur) similaire à celui d'Adjuvant ! Online dans lequel les critères de jugement ont été ajustés à 5 ans et comparés au RS. Les données montrent une faible concordance entre l'intégrateur et le RS, et ce indépendamment de la modalité de mesure du grade tumoral (lecture locale ou lecture centralisée) [92]. La comparaison de la courbe ROC (*Receiver operating characteristic*) de l'intégrateur avec celle du RS indique que ce dernier présente une valeur pronostique de récurrence plus précise puisque le taux de récurrence était seulement de 5 % ou moins chez les patientes ayant un RS inférieur à 18 (46 %). Ce résultat doit néanmoins être considéré avec prudence puisque :

- la durée de suivi de cette étude est de 6 ans alors que le logiciel Adjuvant ! Online et le RS ont été testés dans des populations suivies pour une durée supérieure à 10 ans ;
- toutes les patientes avec un RS faible ont reçu de la chimiothérapie adjuvante, ce qui ne permet pas d'attribuer l'excellent pronostic rapporté à une valeur pronostique élevée du test puisqu'on ne peut pas exclure un bénéfice apporté par la chimiothérapie [92].

**TABLEAU 7.** Données cliniques de l'étude de Goldstein *et al.* [92]

POPULATION	FACTEURS PRONOSTIQUES*	RESULTATS
opérable, HR+ HER-2/neu + : 21,9 %, - : 44,9 %, non connu : 34,1 % N (0-3) ; TS ≥ 1,1 cm CT : AT ou AC ≤ 45 ans : 23 % ± 1,1 % 46-65 ans : 63,7 % ± 2,3 >65 ans : 12,7 % ± 1,6 % pré-ménopausées : 41,4 % ± 2,4 post-ménopausées : 58,6 % ± 2,4 % RS < 18 : 46 % / 18 ≤ RS < 30 : 30 % / RS ≥ 31 : 24 %  465 patientes	TS, TG HER-2 âge, envahissement ganglionnaire	Récidive à 5 ans RS < 18, N (0-1) : 3,3 % (95 % IC : 2,2 - 5,0) RS < 18, N (2-3) : 7,9 % (95 % IC : 4,3 - 14,1) Analyse 1 : N2-3, âge jeune, TG central RS: HR (écart de 50 points) = 2,12 (95 % IC : 0,97 - 4,65; p = 0,06) Analyse 2 : N2-3, âge jeune, TG local RS: HR = 3,13 (95 % IC : 1,60 - 6,14; p = 0,0009) Analyse 3 : N2-3, âge jeune, TG local ou central et HER-2/neu négatif : RS non pronostique; p NS Concordance RS/Intégrateur/ grade localement mesuré : 36 % ; grade centralement mesuré : 38 % Analyse multivariée, grade localement mesuré RS : HR = 2,64 (95 % IC : 1,80 - 3,87; p < 0,001) Intégrateur : HR = 1,34 (95 % IC : 0,94 - 1,91 ; p = 0,11) Analyse multivariée, grade centralement mesuré RS : HR = 2,51 (95 % IC : 1,71 - 3,70 ; p < 0,001) Intégrateur : HR = 1,51 (95 % IC : 1,07 - 2,13 ; p = 0,02) AUC = 0,69 (RS) vs 0,56 (intégrateur, grade local) vs 0,61 (intégrateur, grade central)

\*étudiés en analyse multivariée ; IC : intervalle de confiance ; CT : chimiothérapie ; HR : Hazard Ratio ; N : nombre de ganglions atteints ; AUC : aire sous la courbe ROC ; TG : grade tumoral ; TS : taille tumorale.

#### Valeur pronostique du RS (Recurrence Score), corrélation avec les outils existants (cf. tableaux 8 et 9)

Dans une cohorte de 300 patientes, un carcinome canalaire infiltrant, un grade tumoral élevé, une faible expression du récepteur à la progestérone, ainsi qu'une forte expression de HER-2 étaient associés à un RS élevé alors que l'âge, la taille de la tumeur, le statut du récepteur à l'œstrogène et l'envahissement ganglionnaire étaient faiblement corrélés avec le RS [91]. Ces variables, aussi bien seules qu'associées entre elles, ont une capacité limitée de prédiction du RS.

Dans un autre modèle multivarié, le RS était significativement corrélé au grade nucléaire, à l'index mitotique, aux récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone mesurés par immunohistochimie ainsi qu'au statut HER-2/neu [93] (cf. tableau 9). En revanche, l'âge et la taille tumorale n'étaient pas prédicteurs du RS aussi bien dans le modèle univarié que multivarié, ce qui est en accord avec les résultats de Wolf *et al.* [91]. L'étude de Flanagan porte sur un faible effectif (42 patientes) et nécessite donc des validations supplémentaires. En revanche, elle présente l'avantage d'être indépendante du laboratoire privé commercialisant le test [93].

Les groupes définis par le RS et ceux définis par les recommandations comme nécessitant une chimiothérapie sur la base des critères anatomo-cliniques ne sont pas superposables :

- selon les recommandations du NCCN (*National comprehensive cancer network*), la chimiothérapie doit être proposée à toutes les patientes à RS élevé ainsi qu'à plus de 90 % des patientes des groupes à RS faible et intermédiaire [97] ;
- selon les recommandations de St-Gallen, les patientes ER+ sans atteinte ganglionnaire peuvent être classées dans le groupe à RS faible (chimiothérapie non nécessaire) ou dans le groupe à RS intermédiaire (chimiothérapie à considérer). Les patientes à haut risque sont classées en grande majorité (98 %) comme étant dans le groupe à RS intermédiaire. De même, 66 % des patientes à faible RS et 82 % des patientes à RS intermédiaire seraient

classées comme étant dans la catégorie à risque moyen (chimiothérapie pourrait être considérée) [2].

**TABLEAU 8.** Données cliniques de l'étude de Wolf *et al.* [91]

POPULATION	FACTEURS PRONOSTIQUES*	RESULTATS
RS obtenu entre oct 2004 et oct 2006 dans 16 centres différents  300 patientes évaluables	âge, TS, TG envahissement ganglionnaire ER / PgR HER-2 statut histologique	RS < 18 : (N = 109, 36 %) 18 ≤ RS < 30 : (N = 134, 45 %) RS ≥ 31 : (N = 57, 19 %) Corrélation RS / TS : r = 0,2 ; p = 0,0001 Corrélation RS / âge : r = 0,03 ; p = 0,6 NCCN : (faible/intermédiaire/élevé), N = 286 CT non nécessaire : 7 % / 4 % / 0 % CT serait à considérer : 11 % / 16 % / 11 % CT serait à administrer : 82 % / 80 % / 89 % ; p = 0,17 St-Gallen : (faible/intermédiaire/élevé), N = 296 risque faible : 34 % / 18 % / 2 % risque moyen : 66 % / 82 % / 98 % ; p < 0,0001 Adjuvant! Online, HT (faible/intermédiaire/élevé), N = 296 SSR à 10 ans, bénéfique < 10 ans : 83 % / 75 % / 39 % SSR à 10 ans, bénéfique > 10 ans : 17 % / 25 % / 61 % ; p < 0,001 Adjuvant! Online, CT (faible/intermédiaire/élevé), N=296 SSR à 10 ans, bénéfique < 5 ans : 37 % / 40 % / 37 % SSR à 10 ans, bénéfique > 5 ans : 63 % / 60 % / 63 % ; p = 0,7

\*étudiés en analyse multivariée ; CT : chimiothérapie ; ER : récepteur à l'œstrogène ; HT : hormonothérapie ; N : effectif de patientes ; PgR : récepteur à la progestérone ; r : coefficient de corrélation ; RS : Recurrence Score ; SSR : survie sans récurrence ; TG : grade tumoral ; TS : taille tumorale..

**TABLEAU 9.** Données cliniques de l'étude de Flanagan *et al.* [93]

POPULATION	FACTEURS PRONOSTIQUES*	RESULTATS
ER+ et N- (sauf 1 pte ER-) âge (58 ans), TS (1,3 cm) GNO = 1 (15 ptes), GNO = 2 (19 ptes), GNO = 3 (8 ptes)  42 patientes	âge, TS, grade nucléaire, formation tubulaire, nombre de figures mitotiques, ER et PgR (IHC), HER-2/neu, GNO, score de Nottingham	Analyse univariée, corrélation / RS âge : r = -0,12 ; p = 0,46 TS : r = 0,06 ; p = 0,69 Formation tubulaire : r = 0,32 ; p = 0,04 GN : r <sub>s</sub> = 0,52 ; p < 0,01 Nombre de figures mitotiques : r <sub>s</sub> = 0,52 ; p < 0,01 ER (IHC) : r = -0,58 ; p < 0,01 PgR (IHC) : r = -0,44 ; p < 0,01 HER-2/neu: r <sub>s</sub> = 0,37 ; p = 0,02 Score de Nottingham (1-9) : r = 0,56 ; p < 0,01 GNO (1-3) : r = 0,59 ; p < 0,01

\*étudiés en analyse multivariée ; CT : chimiothérapie ; GN : grade nucléaire ; GNO : grade de Nottingham ; HT : hormonothérapie ; IHC : immunohistochimie ; N- : sans atteinte ganglionnaire ; r : corrélation de Pearson ; r<sub>s</sub> : corrélation de Spearman ; SSR : survie sans récurrence ; TS : Taille de la tumeur.

## 3.2 Valeur prédictive

### Valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie avec du tamoxifène concomitant chez les patientes ER+, N- (cf. tableau 10)

Une étude comparative publiée en 2006 évaluant 651 patientes ER+, sans atteinte ganglionnaire, sous tamoxifène en présence ou en l'absence d'une chimiothérapie, a rapporté un bénéfice plus important de la chimiothérapie pour un RS élevé ( $\geq 31$ ) par rapport à un RS faible ( $< 18$ ) [87]. Dans le groupe à RS élevé, lorsque la chimiothérapie est ajoutée au tamoxifène, la survie sans métastases à distance à 10 ans (critère de jugement principal) est améliorée de 60 % à 88 %. Ce bénéfice est nettement moins clair dans le groupe à RS intermédiaire. Ces résultats sont similaires lorsque la survie sans récurrence ou la survie globale sont considérées. Il en est de même lorsque les deux protocoles de chimiothérapie (CMF ou MF) sont pris en compte.

Dans un modèle de Cox comprenant la chimiothérapie et le RS, le taux d'interaction entre ces deux variables s'est révélé statistiquement significatif ( $p = 0,038$ ). La persistance de cette interaction a été démontrée même lorsque le coefficient d'interaction chimiothérapie-RS est ajouté au modèle ou même après ajustement aux autres variables clinicopathologiques (âge, taille tumorale, grade tumoral, ER, PgR) [87]. L'amplitude du bénéfice apporté par la chimiothérapie est augmentée au fur et à mesure que le RS augmente. Cependant, un seuil RS à partir duquel aucun bénéfice apporté par la chimiothérapie n'est observé, n'a pas pu être défini précisément [87]. Les données montrent que le degré d'interaction entre la chimiothérapie et le RS est plus élevé que celui de la chimiothérapie et des variables clinicopathologiques, suggérant une meilleure prédictivité par le RS de la réponse à la chimiothérapie. Par comparaison à l'étude antérieure de validation de 2004 [83], l'étude de 2006 présente une valeur ajoutée, notamment pour le bras « 100 % tamoxifène » pour lequel une version plus récente de la RT-PCR a été employée (réactifs, étalonnage et références internes standardisés). Néanmoins, quelques limites persistent [87] :

- la population de cette étude est issue de la banque d'échantillons du NSABP-B20 [78]. Or, cette dernière a été employée dans le « training set » analysée par l'équipe de Paik en 2003 [96] ;
- la population présente un biais de sélection puisque la corrélation entre le RS et les caractéristiques clinicopathologiques a été analysée chez des patientes ER+, sans atteinte ganglionnaire. Or, cette population peut être considérablement différente de la population générale candidate pour recevoir le test, car il s'agit d'une étude rétrospective et que certaines patientes avaient de la chimiothérapie.

**TABLEAU 10.** Données cliniques de l'étude de Paik *et al.* [87]

POPULATION	FACTEURS PRONOSTIQUES*	RESULTATS
patientes du NSABP B-20 sans atteinte ganglionnaire ER+	âge, TS, ER, PgR, GR	<u>Tam seul ( % ptes) / Kaplan-Meier</u> RS < 18 (20,6 %) / 96,8 % 95 % IC (93,7 - 99,9) 18 < RS < 31 (7 %) / 90,9 % 95 % IC (82,5 - 99,4)) RS $\geq$ 31 (7,2 %) / 60,5 % 95 % IC (46,2 - 74,8)
Tam ou Tam+CT		<u>Tam+CT ( % ptes) / Kaplan-Meier</u> RS < 18 (33,5 %) / 95,6 % 95 % IC (92,7 - 98,6) RS < 31 (13,7 %) / 89,1 % 95 % IC (82,4 - 95,9) RS $\geq$ 31 (18 %) / 88,1 % 95 % IC (82,0 - 94,2)
651 évaluables		<u>RR du bénéfice de la CT</u> RS < 18 : RR=1,31 95 % IC (0,46 - 3,78) RS < 31 : RR = 0,61 95 % IC (0,24 - 1,59) RS $\geq$ 31 : RR = 0,26 95 % IC (0,31 - 0,53)

\*étudiés en analyse multivariée ; IC : intervalle de confiance ; CT : chimiothérapie ; ER : Récepteur à l'œstrogène ; GR : grade histologique ; PgR : Récepteur à la progestérone ; RR : risque relatif ; RS : Recurrence Score ; Tam : tamoxifène ; TS : taille tumorale.

## Valeur prédictive de réponse à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie chez les patientes ER+/N+ ou ER+/N-

La comparaison du niveau de risque par le RS avec le bénéfice apporté par l'hormonothérapie prédit par le logiciel Adjuvant ! Online montre une corrélation faible mais statistiquement significative ( $r = 0,32$  ;  $p = 0,0001$ ) [91] (cf. tableau 8). En revanche, la corrélation entre le RS et le bénéfice de la chimiothérapie prédit par le logiciel était identifiée comme statistiquement non significative ( $r = 0,11$  ;  $p = 0,06$ ). Deux remarques sont néanmoins à considérer :

- l'analyse est réalisée sur la population générale, qui ne représente pas la population pour laquelle les cliniciens souhaiteraient actuellement réaliser le test (faible risque de récurrence) ;
- aucune description des méthodes de collecte, du stockage des échantillons, des techniques d'extraction, du contrôle qualité des ARN et de la quantification de l'expression n'est identifiée.

## 4. TECHNIQUE

Oncotype DX™ utilise la RT-PCR sur des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine. Seuls 5 % des échantillons sont inutilisables en raison d'une cellularité insuffisante. Au sein d'une unique plateforme analytique, le test est validé, reproductible (cf. données réglementaires en annexe 18). Parmi les 16 gènes analysés figurent les gènes ER, PgR et HER-2 dont l'analyse par RT-PCR pourrait représenter une alternative à l'immunohistochimie ou à la FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) bien que la mesure de HER-2 par RT-PCR ne soit pas recommandée en standard par *l'American society of clinical oncology*.

### Standardisation analytique et contrôles qualité interne du test

Une étude de validation de la technique de quantification de l'expression des gènes de la signature « 21-gènes » a été réalisée en 2007 [88]. L'objectif de cette étude était d'optimiser l'essai par une documentation complète des procédures opérationnelles standardisées. Ainsi, les écarts inter-échantillons liés à la qualité de l'ARN extrait, elle-même dépendante de la durée de conservation, de la méthode de fixation, du manipulateur, des instruments de mesure, des réactifs, etc., ont été minimisés par la standardisation des procédures à tous les stades analytiques du test.

Globalement, les performances analytiques et opérationnelles définies permettent, dans les conditions de l'étude, une quantification du RS avec un écart-type de 2 unités RS sur une échelle de 100 unités [88]. La reproductibilité intra et inter-coupes tissulaires a été évaluée sur 5 coupes consécutives issues de 6 blocs en paraffine prélevés chez 2 patientes. L'écart-type inter-blocs était de 0,72 unité RS (95 % IC : 0,55 - 1,04). L'écart-type inter-blocs était de 2,2 unités RS. Ces résultats sont à considérer avec prudence en raison du très faible effectif et de l'absence de données relatives à la variabilité inter-plateformes du test.

### Validation d'un seuil optimal (cf. tableau 11)

Les premières études ([83,87]) ont déterminé un seuil RS définissant trois niveaux de risque ( $RS < 18$  : risque faible ;  $18 \leq RS < 30$  : risque intermédiaire ;  $RS \geq 31$  : risque élevé) alors que l'essai TAILORx en cours emploie des intervalles de seuil différents ( $RS < 11$  : risque faible ;  $11 \leq RS \leq 25$  : risque intermédiaire ;  $RS > 25$  : risque élevé (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/digestpage/TAILORx>)). Ces intervalles ont été ajustés afin de minimiser le risque de sous-traitement dans le groupe intermédiaire (groupe randomisé) et dans le groupe à haut risque. Lorsque les seuils de l'essai TAILORx ont été employés dans l'analyse des

données du NSABP-B20 [87], la réponse à la chimiothérapie était identique à celle observée dans les études originales. Dans les 2 groupes à risque faible et intermédiaire, le risque de récurrence sous tamoxifène seul était  $\leq 5\%$  [90]. Une tendance favorisant l'adjonction de la chimiothérapie au tamoxifène semble s'imposer pour un RS équivalent à 11. Ce dernier est associé à un risque de récurrence locale et distante d'environ 10 %, ce qui correspond au seuil typiquement défini pour recommander la chimiothérapie adjuvante [90]. En employant le seuil RS de 11, la distribution des 3 groupes à risque, sur 20 500 tests utilisés en conditions réelles, est similaire à celle observée dans l'échantillon de 651 patientes de l'essai NSABP-B20 (faible : 14 % - intermédiaire : 62 % - élevé : 24 %) [90].

**TABLEAU 11.** Données cliniques de l'étude de Sparano *et al.* [90]

POPULATION	RESULTATS
Données du NSABP-B20 décrites dans PAIK2006 ré-évaluées sur la base des nouveaux seuils tels que définis dans l'essai TAILORx	SSMD à 10 ans RS < 11 (27 %) : 98 % (tam) vs 95 % (tam+CT) HR = 1,788 (95 % IC : 0,360 - 8,868 ; p = 0,471) 11 $\leq$ RS $\leq$ 25 (43 %) : 95 % (tam) vs 94 % (tam+CT) HR = 0,755 (95 % IC : 0,313 - 1,824 ; p = 0,531)
651 patientes évaluées	RS > 25 (30 %) : 63 % (tam) vs 88 % (tam+CT) HR = 0,284 (95 % IC : 0,148 - 0,551 ; p < 0,0001)  SSR locale à 10 ans RS < 11 (27 %) : 77 % (tam) vs 85 % (tam+CT) HR = 0,605 (95 % IC : 0,317 - 1,153 ; p = 0,124) 11 $\leq$ RS $\leq$ 25 (43 %) : 81 % (tam) vs 76 % (tam+CT) HR = 1,106 (95 % IC : 0,671 - 1,823 ; p = 0,691) RS > 25 (30 %) : 53 % (tam) vs 75 % (tam+CT) HR = 0,446 (95 % IC : 0,270 - 0,738 ; p = 0,0012)

IC : intervalle de confiance ; CT : chimiothérapie ; HR : Hazard Ratio ; RS : Recurrence Score ; SSMD : survie sans métastases à distance ; SSR : survie sans récurrence ; tam : tamoxifène ; vs : versus.

## 5. CONCLUSION

### VALEUR PRONOSTIQUE

L'analyse des données montre que le test Oncotype DX™ pourrait permettre d'affiner la stratification des patientes sans atteinte ganglionnaire, ER+, sous tamoxifène en les divisant en trois groupes de risque de rechute à 10 ans (haut, intermédiaire et faible) conférant une information complémentaire aux caractéristiques anatomocliniques typiquement utilisées chez les patientes ER+ (cf. tableau 26). Compte tenu de l'absence d'essais randomisés et/ou de méta-analyses, la validité pronostique du test ne dépasse pas le niveau de preuve LOE II.

### VALEUR PRÉDICTIVE

L'analyse des données permet d'aboutir aux conclusions suivantes :

- le test permettrait de réserver la chimiothérapie à une catégorie de patientes à haut risque de récurrence, ce qui orienterait le choix thérapeutique dans le sens de la réduction des chimiothérapies. Cette conclusion résulte d'études utilisant des chimiothérapies à base de CMF, très peu utilisées actuellement en France. Compte tenu de l'absence d'essais

randomisés et/ou de méta-analyses, la validité prédictive du test ne dépasse pas le niveau de preuve LOE II (cf. tableau 27) ;

- le test ne permet pas de prédire le bénéfice apporté par la chimiothérapie, lorsque la survie sans métastase est considérée (cf. tableau 27) ;
- le test ne présente pas de valeur prédictive de réponse au tamoxifène (cf. tableau 28).

## 6. PERSPECTIVES

Plusieurs questions d'ordre méthodologique subsistent :

- les disparités observées entre les différentes méthodes de prédiction communément utilisées suggèrent l'importance d'évaluations et de comparaisons prospectives qu'il reste à conduire sur le RS avant qu'il ne soit accepté et validé en tant qu'outil clinique ;
- l'origine des différences observées entre d'une part la population de l'étude de Wolf [91] et d'autre part celles des études de validation de l'essai mérite d'être élucidée ;
- la variation inter-cohortes (NSABP, KAISER, etc.) de la proportion de patientes dans les 3 groupes de RS (faible, intermédiaire ou élevé) mérite d'être étudiée.

Plusieurs questions d'ordre analytique et/ou clinique méritent une réflexion :

- Attribution à la valeur pronostique du test du niveau de preuve LOE I en le mettant en compétition avec les autres facteurs de niveau de preuve LOE I (ER, HER-2 et uPA/PAI-1) ;
- Attribution à la valeur prédictive du test du niveau de preuve LOE I requis pour une application en routine (cf. essai TAILORx, en cours pour les RS intermédiaires) ;
- Évaluation de la valeur pronostique du test chez les patientes recevant des inhibiteurs d'aromatases ;
- Validation des « classifieurs » (dont Oncotype DX™) sur des séries très larges et dans des essais randomisés permettant de trouver un consensus sur la signature universelle ou la combinaison de gènes utiles pour la prise en charge des patientes ;
- Contribution du test à la décision thérapeutique chez les patientes N+/ER+, lorsque la chimiothérapie est de type FAC (étude SWOG8814, [98]) ou à base de docetaxel 60 mg/m<sup>2</sup>/3 semaines (étude ECOG2197, [99]). Ces résultats sont publiés à ce jour uniquement sous forme de communication à un congrès ; ils restent donc à confirmer dans le cadre d'une publication dans une revue à comité de lecture ;
- Évaluation de l'impact des variations de fixateurs employés dans les préparations histologiques (concentration en formol, etc.) ;
- Évaluation de la reproductibilité du test dans d'autres plateformes d'analyse.

Il n'y a pas de preuve que l'information apportée par Oncotype DX™ améliore la valeur pronostique et/ou prédictive apportée par les marqueurs phénotypiques usuels.

# PARTIE III - ÉTAT DES CONNAISSANCES RELATIVES À LA SIGNATURE MOLÉCULAIRE « 70-GENES », TEST MAMMAPRINT®

## 1. INTRODUCTION

La signature « 70-gènes » repose sur une analyse par puces à ADN (*DNA-microarray*) à partir de tissu tumoral congelé. Les puces à ADN sont utilisées afin d'obtenir un large aperçu de l'expression des gènes tumoraux humains, ce qui a permis d'identifier des biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et prédictifs pour plusieurs types de tumeurs solides [100].

Il a été prouvé que le comportement clinique de patientes atteintes d'un cancer du sein dépendait du profil d'expression des gènes de la tumeur primaire, ce qui rend cette technique particulièrement applicable dans cette localisation [101-103].

## 2. RÉSULTATS DE LA SÉLECTION BIBLIOGRAPHIQUE

La stratégie de recherche et le processus de sélection bibliographique sont présentés dans les annexes 3 et 4. Au total, 11 références ont été sélectionnées pour la rédaction de la synthèse méthodique (cf. tableau 12).

TABLEAU 12. Résultat de la sélection bibliographique relatif à MammaPrint®

TYPES D'ETUDES	REFERENCES
RECOMMANDATION POUR LA PRATIQUE CLINIQUE	Harris <i>et al.</i> 2001 [17] / ASCO
ESSAI RANDOMISE	Aucune référence publiée n'a été identifiée Essai MINDACT en cours (Bogaerts <i>et al.</i> 2006 [104])
SYNTHESE METHODIQUE	Marchionni <i>et al.</i> 2008 [82]
AUTRES TYPES D'ETUDES	Van't Veer <i>et al.</i> 2002 [103], van de Vijver <i>et al.</i> 2002 [105], Buyse <i>et al.</i> 2006 [106], Glas <i>et al.</i> 2006 [107], Ach <i>et al.</i> 2007 [108], Mook <i>et al.</i> 2008 [109], Thomassen <i>et al.</i> 2007 [110], Wittner <i>et al.</i> 2008 [111]

### 3. RÉSULTATS DES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

Aucune étude de niveau de preuve LOE I ou de niveau de preuve LOE II n'est disponible pour MammaPrint®.

Seules les études de niveau de preuve LOE III, notamment les études de phase 1 du diagramme TMUGS, ont donc été analysées (cf. annexes 14 à 16). Ce document présente successivement :

- la validation et la reproductibilité du test ;
- le développement du test et sa validation indépendante chez des patientes avec ou sans atteinte ganglionnaire.

La signature « 70-gènes » (cf. tableau 13) comprend 55 gènes à fonction connue comme la prolifération, l'angiogenèse, l'adhésion extracellulaire et 15 gènes à fonction inconnue à ce jour. Elle a été développée à partir de plus de 25 000 gènes non sélectionnés analysés par la technique d'ADNc *microarray* et d'une méthode de classification basée sur un coefficient de corrélation [103].

TABLEAU 13. Liste des gènes de la signature "70-gènes"\*

AL080059	EXT1	GNAZ	Contig 55725RC	MP1	NMU	HSA250839
Contig 63649RC	AL137718	SERF1A	DCK	Contig 40831RC	LOC57110	GSTM3
LOC51203	PK428	OXCT	CENPA	Contig 24252RC	Contig 63102RC	BBC3
Contig 46218RC	HEC	ORC6L	SM20	FLJ11190	PEIC	CEGP1
Contig 38288RC	ECT2	L2DTL	MCM6	Contig 51464RC	AP2B1	Contig 48328RC
AA555029RC	GMPS	PRC1	AKAP2	IGFBP5	CFFM4	WISP1
Contig 28552RC	Contig 32185RC	AF052162	Contig 56457RC	IGFBP5	PEIC	ALDH4
FLT1	UCH37	COL4A2	RFC4	IGFBP5	TGFB3	KIAA1442
MMP9	Contig 35251RC	KIAA0175	DKFZP564D0462SLC2A3	CCNE2	Contig 46223RC	Contig 32125RC
DC13	KIAA1067	RAB6B		ESM1	Contig 55377RC	FGF18
				Contig 20217RC		

\*d'après Van't Veer *et al.* [103]

#### 3.1. Valeur pronostique

##### Développement et validation du test

Le test a été développé à partir d'une série de 78 patientes âgées de moins de 55 ans et dont la tumeur était inférieure à 5 cm de diamètre, sans atteinte ganglionnaire. Le test identifie 2 groupes : haut risque et bas risque. Était classée en bon pronostic une tumeur avec une probabilité de survie sans métastases à distance à 5 ans dépassant 90 % [103].

Dans une série de validation externe sur 295 patientes jeunes avec ou sans atteinte ganglionnaire, la signature présente une valeur pronostique pour la survenue de métastases à distance à 5 ans [105] (cf. tableau 14). Ses performances sont comparables dans les deux groupes (avec et sans atteinte ganglionnaire). Elle est corrélée à l'âge ( $p < 0,001$ ), au grade histologique ( $p < 0,001$ ), au statut du récepteur à l'œstrogène ( $p < 0,001$ ) et au diamètre tumoral ( $p = 0,012$ ). Cette cohorte a inclus 61 échantillons de tumeurs issus de la série de cohorte de Van't Veer qui a servi au développement de la signature [103] (cf. tableau 15).

TABLEAU 14. Données cliniques de l'étude de van de Vijver *et al.* [105]

POPULATION	FACTEURS PRONOSTIQUES*	RESULTATS
<p>âge &lt; 52 ans, TS &lt; 5 cm, pT1 ou pT2, 151 N- vs 144 N+ CT ; tamoxifène ou les deux chez 10 N- et 144 N+ 69 ER- vs 226 ER+ pronostic favorable (n = 115) &gt; seuil pronostic péjoratif (n = 180) &lt; seuil</p> <p>295 patientes évaluées dont 61 provenant de la cohorte de Van't Veer <i>et al.</i> 2002</p> <p>Suivi : 5 ans</p>	<p>invasion vasculaire N- vs 1-3 ou N- vs ≥ 4 TS, TG âge, ER CT, HT mastectomie vs chirurgie conservatrice</p>	<p><u>Métastases distantes à 5 ans</u> OR (N-, nouvelle série, n = 67) : 15,3 (95 % IC : 1,8 - 127) ; p = 0,003 OR (N+, nouvelle série, n = 113) : 13,7 (95 % IC : 3,1 - 61) ; p &lt; 0,001 OR(ttes ptes, nvelle série, n = 180) : 14,6 (95 % IC : 4,3 - 50) ; p &lt; 0,001</p> <p><u>Analyse univariée</u> HR (ttes ptes) : 5,1 (95 % IC : 2,9 - 9,0) ; p &lt; 0,001 HR (N-, n = 151) : 5,5 (95 % IC : 2,5 - 12,2) ; p &lt; 0,001 HR (N+, n = 144) : 4,5 (95 % IC : 2 - 10,2) ; p &lt; 0,001</p> <p><u>Analyse multivariée</u> HT (ttes ptes) : 4,6 (95 % IC : 2,3 - 9,2) ; p &lt; 0,001</p>

\*étudiés en analyse multivariée ; IC : intervalle de confiance ; CT : chimiothérapie ; HR : Hazard Ratio ; HT : hormonothérapie ; n : effectif de patientes ; N- : sans atteinte ganglionnaire ; N+ : avec atteinte ganglionnaire ; OR : Odds Ratio ; TS : taille de la tumeur ; ttes : toutes.

TABLEAU 15. Données cliniques de l'étude de Van't Veer *et al.* [103]

POPULATION	FACTEURS PRONOSTIQUES*	RESULTATS
<p>âge &lt; 55 ans, TS &lt; 5 cm ER+ : 79,2 % ; PgR+ : 57,7 % ; N- : 100 % Tamoxifène : 4 % ; CT : 4 % ; mastectomie radicale (n = 35) ; traitement conservateur (n = 62)</p> <p>Suivi : 5 ans</p>	<p>TG, TS angiogénèse, âge, ER</p>	<p>Population expérimentale (n = 78) <u>univariée</u> OR = 15 (95 % IC : 4 - 56) ; p = 0,0000041 <u>multivariée</u> OR = 18 (95 % IC : 3,3 - 94) ; p = 0,00014 65 / 78 ptes avec 5 ptes de mauvais pronostic et 8 de bon pronostic assignées à la catégorie opposée.</p> <p>Population test (n = 19) 17/19 prédictions correctes avec un bon pronostic classé dans le mauvais et un mauvais pronostic classé dans le bon.</p>

\*étudiés en analyse multivariée ; IC : intervalle de confiance ; CT : chimiothérapie ; ER : récepteur à l'œstrogène ; n : effectif de patientes ; N- : sans atteinte ganglionnaire ; OR : Odds Ratio ; ptes : patientes ; TG : grade tumoral ; TS : Taille de la tumeur.

## Reproductibilité du test

La reproductibilité inter-laboratoires de la phase pré-analytique a été étudiée par Ach *et al.* [108]. Les aliquotes de la même préparation d'ARN totaux de 4 patientes différentes ont été transmis à 3 laboratoires (Amsterdam, Californie et Paris) qui ont procédé séparément au marquage de l'ARN, à l'hybridation et à la lecture des puces. Le contrôle de la reproductibilité a été réalisé entre 2 des plateformes (Amsterdam et Californie). Les résultats montrent que le marquage de l'ARN représentait la première source de variabilité technique inter-plateformes. Malgré cette variabilité, les auteurs concluent à une forte reproductibilité intra-plateforme et inter-plateformes lorsque la mesure était réalisée selon des procédures standardisées strictement contrôlées [108]. Cette conclusion est à considérer avec prudence en raison du très faible effectif analysé et des données insuffisantes portant sur la variabilité inter-plateformes de l'essai.

La reproductibilité de la phase analytique a été étudiée par analyse de 49 échantillons sur plaques comprenant chacune 8 puces. Le coefficient de corrélation de Pearson était de 0,99 indiquant ainsi un degré de reproductibilité intra-plaque très satisfaisant [107]. La reproductibilité du test au cours du temps a été prouvée par plus de 100 mesures effectuées sur 3 échantillons sur une période de 12 mois. Par ailleurs, les données de l'hybridation de la même cohorte sur deux puces différentes (étude originale de Van't Veer et étude sur outil MammaPrint®) sont hautement similaires (coefficient de Pearson : 0,92 ;  $p < 0,0001$  et *Odds ratio* comparables). Néanmoins, des résultats discordants ont été observés chez 7 patientes [103,107] :

- 2 patientes n'ont pas développé de métastases à distance alors qu'elles ont été classées dans le groupe de mauvais pronostic par Van't Veer, mais correctement classées par l'outil diagnostique de Glass ;
- 1 patiente a développé des métastases à distance alors qu'elle a été classée dans le groupe de bon pronostic dans l'étude de Van't Veer, mais correctement classée par l'outil diagnostique de Glass ;
- 2 patientes n'ont pas développé de métastases à distance alors qu'elles ont été classées dans le groupe de mauvais pronostic par l'outil diagnostique de Glass, mais correctement classées dans l'étude de Van't Veer ;
- 2 patientes ont développé des métastases à distance alors qu'elles ont été classées dans le groupe de bon pronostic par l'outil diagnostique de Glass, mais correctement classées dans l'étude de Van't Veer.

L'étude de validation interne du test a permis de montrer une différence significative entre le groupe de bon pronostic et le groupe de mauvais pronostic pour la survenue de métastases à distance [103]. Cette validation reste malgré tout imparfaite puisque la cohorte expérimentale et la cohorte de validation se chevauchent, alors qu'aucune validation externe exploitant des données indépendantes n'a été réalisée. En effet, le développement de la signature « 70-gènes » pourrait être influencé par l'échantillon de patientes ayant été impliquées dans la sélection des gènes. Cette cohorte comprend principalement des patientes jeunes ( $44 \pm 8$  ans) et la majorité des patientes avec une atteinte ganglionnaire a reçu un traitement adjuvant (120/144), ce qui rend difficile l'évaluation de la valeur pronostique chez des patientes non traitées.

Validation indépendante chez des patientes sans atteinte ganglionnaire, âgées de moins de 61 ans (cf. tableau 16)

La validité et l'utilité clinique du test ont été étudiées par une équipe indépendante de celle ayant développé et validé la signature. Cette étude a porté sur 307 patientes sans atteinte ganglionnaire issues de 5 centres européens (TRANSBIG : *Translating molecular knowledge breast international group*) [106]. Les échantillons de 151 patientes sans atteinte ganglionnaire provenant de la série originale de van de Vijver ont été ajoutés à cette série de validation. L'extraction des ARN (transmis par les différents centres) et l'analyse des puces ont été réalisées par le NKI (*Netherlands cancer institute*).

La valeur pronostique de la signature a été comparée aux résultats du logiciel Adjuvant ! Online. Ce logiciel permet de calculer la survie à 10 ans sur la base de l'âge, des comorbidités, de la taille, du grade de la tumeur, du statut du récepteur à l'œstrogène et du nombre de ganglions axillaires positifs (<http://www.adjuvantonline.com>) [112,113]. Certains biomarqueurs tels que HER-2 et le statut du récepteur à la progestérone ne sont pas inclus à ce score clinicopathologique.

La variable continue du logiciel a été transformée en une variable dichotomique divisant les patientes en 2 groupes de risque clinicopathologique. Le groupe à faible risque était défini par une probabilité de survie à 10 ans (estimée par Adjuvant ! Online) supérieure à 88 % (ER+) ou à 92 % (ER-). Une discordance entre MammaPrint® et Adjuvant ! Online a été observée pour 28 % des patientes. En termes de survie globale, les aires sous la courbe ROC (AUC) étaient de 0,659 pour MammaPrint® et de 0,576 pour Adjuvant ! Online.

La validité clinique a été basée sur l'estimation du rapport des risques relatifs des groupes à haut risque et à bas risque. Les résultats montrent que la signature présente une valeur pronostique indépendante statistiquement significative pour la survenue de métastases à distance et pour la survie globale chez les patientes sans envahissement ganglionnaire non traitées (même après ajustement aux facteurs clinicopathologiques). La sensibilité de la signature à classer les patientes selon le risque de métastases à distance à 5 ans et la survie à 10 ans est similaire à celle du logiciel alors que la spécificité\*\* de la signature est supérieure à celle du logiciel. Pour les trois critères de jugement considérés (temps d'apparition de métastases à distance, survie sans récurrence et survie globale), aucune hétérogénéité statistiquement significative n'a été observée entre les 5 centres. L'étude suggère que MammaPrint® semble mieux prédire la survenue des métastases précoces que celle des métastases tardives [106].

L'analyse de deux cohortes de patientes à risque faible (n = 26) ou intermédiaire (n = 37)<sup>††</sup> rapporte une sensibilité de 77 % et une spécificité de 50 % [114]. Cette analyse emploie une plateforme différente de celle utilisée dans l'étude de Van't Veer. Après ajustement aux différences inter-plateformes, la sensibilité et la spécificité obtenues étaient respectivement de 73 % et 77 %. Le seuil fixé est de 0,5 ( $\leq 0,5$  : risque faible et  $> 0,5$  : risque fort) ; il est différent de celui de l'étude de Van't Veer ( $\leq 0,4$  : risque faible et  $> 0,4$  : risque fort). Cette étude présente pour la première fois une validation indépendante indiquant une performance importante du test dans le groupe de patientes à faible risque. Ce groupe a été très peu évalué dans les premières études de développement de la signature et du test, en raison de la faible fréquence de récurrences observées pour ces patientes et du développement tardif des métastases (nécessité de recourir à un plus grand effectif pour l'étude avec une longue période de suivi).

---

\*\* Spécificité : Pourcentage des patientes correctement classées pour ne pas développer de métastases (vrais négatifs).

<sup>††</sup> Classification selon les critères du DBCG : *Danish breast cancer cooperative group*

**TABLEAU 16.** Données cliniques de l'étude de Buysse *et al.* [106]

POPULATION	FACTEURS PRONOSTIQUES*	RESULTATS
<p><u>Série de validation</u> (326 patientes):            âge &lt; 61 ans, N-, T1-T2 (≤ 5 cm)            Tamoxifène : 0 % ;            CT : 0 %</p> <p><u>Série de van de Vijver</u> (151 patientes):            sans envahissement ganglionnaire</p> <p><u>Risque Adjuvant! Online/ Risque « 70-gènes » [82]:</u>            faible/faible (n = 52) : ER+, 100 %; TS 2 cm, 67 %; TG bon, 43 %; TG mauvais, 0 %            faible/élevé (n = 28) : ER+, 100 %; TS 2 cm, 59 %; TG bon, 43 %; TG mauvais, 0 %            élevé/faible (n = 59): ER+, 91 %; TS 2 cm, 29 %; TG bon, 12 %; TG mauvais, 18 %            élevé/élevé (n = 163) : ER+, 48 %; TS 2 cm, 25 %; TG bon, 3 %; TG mauvais, 69 %</p> <p>302 patientes évaluées</p>	<p>variables clinico-pathologiques (Adjuvant! Online)</p>	<p><u>HR ajusté par Adjuvant! Online</u>            Temps de métastases à distance : 2,13 (95 % IC : 1,19 - 3,82)            Survie sans récurrence : 1,36 (95 % IC : 0,91 - 2,03)            Survie globale : 2,63 (95 % IC : 1,45 - 4,79)</p> <p><u>Métastase à distance à 5 ans</u>            Sensibilité de MammaPrint®: 0,90 (95 % IC : 0,78 - 0,95)            Sensibilité de Adjuvant! Online: 0,87 (95 % IC : 0,75 - 0,94)            Spécificité de MammaPrint®: 0,42 (95 % IC : 0,36 - 0,48)            Spécificité de Adjuvant! Online: 0,29 (95 % IC : 0,24 - 0,35)</p> <p><u>AUC, temps de métastase à distance</u>            MammaPrint® : 0,681            Adjuvant! Online : 0,648</p> <p><u>AUC, survie globale</u>            MammaPrint® : 0,659            Adjuvant! Online: 0,576</p> <p>Discordance MammaPrint®/Adjuvant ! Online pour 28 % des patientes</p>

\*étudiés en analyse multivariée ; AUC : aire sous la courbe ROC ; IC : intervalle de confiance ; CT : chimiothérapie ; HT : hormonothérapie ; n : effectif de patientes ; TG : grade tumoral ; TS : taille tumorale.

#### Validation chez des patientes avec atteinte ganglionnaire

Dans une cohorte indépendante de patientes avec atteinte ganglionnaire (N 1-3), la signature « 70-gènes » peut identifier un groupe de patientes à risque faible parmi un groupe de patientes habituellement classées par l'évaluation clinico-pathologique conventionnelle comme à risque de récurrence élevé [109] (cf. tableau 17).

**TABLEAU 17.** Données cliniques de l'étude de Mook *et al.* [109]

POPULATION	FACTEURS PRONOSTIQUES*	RESULTATS
<p><u>Cohorte 1</u> (2 centres) &lt; 71 ans ; T1-2 ou T3 opérable N+ (1-3) pas de ttt néoadjuvant mastectomie ou chirurgie conservatrice suivies de RT ou ttt adjuvant si indiqué 241 patientes évaluées Suivi : 7,8 ans</p> <p><u>Cohorte 2</u> N+ (1-3) de la cohorte de van de Vijver 106 patientes évaluées Suivi : 10,3 ans</p>	<p>âge, nombre de ganglions, TS, TG, ER et PgR HER-2/neu chirurgie, CT, HT</p>	<p><u>Cohorte 1</u> DMFS à 5 ans / 10 ans 98 ± 2 % / 91 ± 4 % (bon pronostic) vs 80 ± 4 % / 76 ± 4 % (mauvais pronostic) HR = 4,13 (95 % IC : 1,72 - 9,96; p = 0,002)</p> <p>BCSS à 5 ans / 10 ans 99 ± 1 % / 96 ± 2 % (bon pronostic) vs 88 ± 3 % / 76 ± 4 % (mauvais pronostic) Signature de mauvais pronostic associée à une survie spécifique plus courte HR = 5,70 (95 % IC : 2,01 - 16,23; p = 0,001)</p> <p>En analyse multivariée / BCSS la signature est le facteur pronostique indépendant le plus puissant avec HR = 7,17 (95 % IC : 1,81 - 28,43; p = 0,005)</p> <p>En analyse multivariée / DMFS uniquement la thérapie endocrine se présente comme facteur pronostique indépendant avec HR = 0,31 (95 % IC : 0,12 - 0,80; p = 0,02) alors que la signature tend vers la significativité avec HR = 2,99 (95 % IC : 0,996 - 8,99; p = 0,051)</p> <p><u>Cohorte 2</u> BCSS à 10 ans 98 %±2 (bon pronostic) vs 64 %±6 % (mauvais pronostic) signature de mauvais pronostic associée à une courte BCSS avec HR = 6,60 (95 % IC : 1,97 - 22,10; p = 0,002)</p> <p>Analyse multivariée / BCSS HR = 3,63 (95 % IC : 0,88 - 14,96; p = 0,07)</p>

\*étudiés en analyse multivariée ; BCSS : survie spécifique à 5 ans/10 ans ; ER : récepteur à l'œstrogène ; IC : intervalle de confiance ; CT : chimiothérapie ; DMFS : métastases à distance à 5 ans/10 ans ; HR : Hazard Ratio ; HT : hormonothérapie ; n : effectif de patientes ; N- : sans atteinte ganglionnaire ; N+ : avec atteinte ganglionnaire ; PgR : récepteur à la progestérone ; TG : grade tumoral ; TS : taille tumorale ; ttt : traitement.

#### Validation chez des patientes âgées sans atteinte ganglionnaire (cf. tableau 18)

Lorsque des patientes sans atteinte ganglionnaire significativement plus âgées sont prises en compte ( $p < 0,001$  pour l'âge, par comparaison à celle du NKI [103,105]), la signature classe 27 % des patientes dans le groupe à faible risque de métastases à distance contre 73 % dans le groupe à risque élevé [111]. La fraction de patientes à risque élevé (73 %), en désaccord avec le faible taux de métastases (9 %), peut être liée au traitement adjuvant reçu par 45 % de ces patientes. L'écart entre les deux groupes à risque est statistiquement non significatif pour la survenue de métastases à distance à 5 ou 10 ans ( $p = 0,108$ ). Ces résultats ne concordent pas avec ceux du NKI (*Netherlands cancer institute*) ( $p < 0,001$ ), probablement en raison du taux de métastases relativement faible au sein de la cohorte de Wittner. La signature présente dans ce cadre une excellente valeur prédictive négative (VPN) puisqu'elle permet d'identifier 100 % des patientes à faible risque de métastases à distance à 5 ans. Ce résultat est en accord avec les études précédentes où la VPN était de 88 %. En revanche, la valeur prédictive positive (VPP) est plus faible que celle observée dans les précédentes études (VPP = 52 %), puisque seulement 12 % des patientes à haut risque de métastases à distance à 5 ans ont été identifiées [111].

L'étude de Wittner se distingue par des points forts analytiques, principalement en raison des contrôles qualité standardisés effectués dans la mise en œuvre de la technique. Elle présente également des points forts méthodologiques concernant la conception de l'étude, la sélection des patientes, les analyses histopathologiques, les annotations et les interprétations cliniques et l'analyse statistique. Néanmoins, le nombre de rechutes métastatiques est trop faible pour que les différences soient statistiquement significatives. De plus, une partie des patientes a reçu un traitement adjuvant (45 %) et le statut du récepteur à l'œstrogène a été estimé par RT-PCR et non par immunohistochimie comme dans les études précédentes.

**TABLEAU 18.** Données cliniques de l'étude de Wittner *et al.* [111]

POPULATION	RESULTATS
<p><u>Cohorte de l'étude</u> (100 patientes)            N- ; 62,5 ans            mastectomie ou chirurgie conservatrice ± RT            CT, HT ou les deux : 45 %</p> <p>suivi : 11,3 ans</p> <p><u>Cohorte NKI</u> de 151 patientes sans envahissement ganglionnaire dont 61 patientes de la cohorte de Van't Veer <i>et al.</i> 2002</p>	<p>cohorte de l'étude / cohorte du NKI  <u>VPN</u> : 100 % (95 % IC : 87 - 100) / 88 % (95 % IC : 77 - 95)  <u>VPP</u> : 12 % (95 % IC : 6 - 22) / 52 % (95 % IC : 41 - 62)</p>

CT : chimiothérapie ; IC : intervalle de confiance ; HR : Hazard Ratio ; HT : hormonothérapie ; n : effectif de patientes ; N- : sans atteinte ganglionnaire ; NKI : *Netherlands cancer institute* ; RT : radiothérapie ; VPN : valeur prédictive négative ; VPP : valeur prédictive positive.

### 3.2. Valeur prédictive

Aucune étude évaluant la valeur prédictive de MammaPrint® n'est disponible.

## 4. TECHNIQUE

Les mesures s'effectuent à l'aide d'un test commercialisé MammaPrint®. Ce test emploie la technique *microarray* sur des échantillons de petite taille (type microbiopsie), congelés ou conservés dans une solution permettant la stabilisation de l'ARN (RNARetain®). À ce jour, la détermination est centralisée au niveau d'un seul laboratoire dont les contrôles qualité sont performants. Le marqueur a été approuvé par la FDA pour les mesures au sein de l'unique plateforme analytique d'Agendia mais n'a pas été validé dans une étude prospective (cf. données réglementaires présentées dans l'annexe 18).

## 5. CONCLUSION

Les conclusions sont à considérer avec prudence puisque les données de la littérature sont issues d'études rétrospectives hors essais thérapeutiques. De telles études rétrospectives comportent plusieurs biais méthodologiques liés notamment :

- aux méthodes diagnostiques qui évoluent avec le temps comme cela a été constaté par exemple pour l'identification des métastases ganglionnaires lymphatiques et pour le statut des récepteurs hormonaux ;
- à la préservation de l'échantillon (acheminement, modalités de conservation).

### VALEUR PRONOSTIQUE

Une valeur pronostique significative de MammaPrint® a été rapportée dans plusieurs études concordantes. Néanmoins, l'absence d'analyse « poolée », d'un large essai prospectif ou d'études prospectives non randomisées fait classer le biomarqueur en niveau LOE III pour sa valeur pronostique sur la survie sans métastases à distance (cf. tableau 28). Ainsi, MammaPrint® :

- pourrait prédire les métastases à distance chez les patientes avec un cancer du sein inférieur ou égal à 5 cm, sans atteinte ganglionnaire (stade I ou II) et âgées de moins de 61 ans ;
- pourrait apporter une information supplémentaire aux outils existants. En effet, Buyse *et al.* [106] suggère que MammaPrint® pourrait prédire un plus grand nombre de patientes de bon pronostic qu'Adjuvant ! On line.

### VALEUR PRÉDICTIVE

En l'absence de données de la littérature, aucune conclusion ne peut être faite concernant la valeur prédictive de MammaPrint® pour la réponse à la chimiothérapie ou à l'hormonothérapie.

## 6. PERSPECTIVES

Plusieurs points d'ordre analytique et/ou clinique subsistent :

- l'attribution du niveau de preuve LOE I à la valeur pronostique du test en le mettant en compétition avec les autres facteurs de niveau de preuve LOE I (ER, HER-2 et uPA/PAI-1) ;
- la plus-value du test par rapport aux outils existants. Ces données n'ont été testées que dans une seule étude [106] en confrontant le test à Adjuvant ! Online qui est un outil de performance clinique non validé ;
- la validation des « classifieurs » (dont MammaPrint®) sur des séries très larges et dans des essais randomisés qui permettraient de trouver un consensus sur la signature universelle ou la combinaison de gènes utiles pour la prise en charge des patientes ;
- l'évaluation de la faisabilité du test dans d'autres infrastructures, notamment en ce qui concerne la qualité de l'analyse et sa reproductibilité sur d'autres plateformes d'analyse ;
- l'évaluation des conditions de conservations des échantillons.

Il n'y a pas de preuve que l'information apportée par MammaPrint® améliore la valeur pronostique et/ou prédictive apportée par les marqueurs usuels.

Actuellement, l'essai européen MINDACT compare la signature génomique d'Amsterdam aux critères cliniques et anatomopathologiques usuels pour des patientes sans envahissement ganglionnaire susceptibles de bénéficier de l'administration d'une chimiothérapie adjuvante et *a contrario* d'épargner une chimiothérapie adjuvante aux patientes de bon pronostic ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)). Dans un second temps, l'essai MINDACT a été étendu récemment aux patientes N+ (1-3).

## ANNEXES

ANNEXE 1. GROUPE DE TRAVAIL .....	43
ANNEXE 2. MÉTHODOLOGIE D'ÉVALUATION D'UN MARQUEUR BIOLOGIQUE .....	44
ANNEXE 3. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE.....	46
ANNEXE 4. SÉLECTION DES ÉTUDES .....	54
ANNEXE 5. GRILLE D'ANALYSE DES ÉTUDES.....	56
ANNEXE 6. UPA/PAI1 - DONNÉES ANALYTIQUES PAR ÉTUDE .....	58
ANNEXE 7. UPA/PAI-1 / DONNÉES CLINIQUES, MESURES PAR ELISA.....	69
ANNEXE 8. UPA/PAI-1 / DONNÉES CLINIQUES, MESURES PAR RT-PCR .....	81
ANNEXE 9. UPA/PAI1 : CONCLUSION .....	83
ANNEXE 10. ONCOTYPE DX™ / DONNÉES ANALYTIQUES COMMUNES A TOUTES LES ÉTUDES .....	85
ANNEXE 11. ONCOTYPE DX™ / DONNÉES ANALYTIQUES DISPONIBLES PAR ÉTUDE .....	86
ANNEXE 12. ONCOTYPE DX™ / DONNÉES CLINIQUES DISPONIBLES PAR ÉTUDE.....	87
ANNEXE 13. ONCOTYPE DX™ : CONCLUSION .....	93
ANNEXE 14. MAMMAPRINT® / DONNÉES ANALYTIQUES COMMUNES A TOUTES LES ÉTUDES .....	94
ANNEXE 15. MAMMAPRINT® / DONNÉES ANALYTIQUES DISPONIBLES PAR ÉTUDE .....	95
ANNEXE 16. MAMMAPRINT® / DONNÉES CLINIQUES PAR ÉTUDE.....	96
ANNEXE 17. MAMMAPRINT® : CONCLUSION.....	101
ANNEXE 18. DONNÉES RÉGLEMENTAIRES .....	102
ANNEXE 19. DESCRIPTION DES ESSAIS CLINIQUES .....	103
ANNEXE 20. ABRÉVIATIONS .....	105

## ANNEXE 1. GROUPE DE TRAVAIL

Élisabeth Luporsi, oncologue médical, Centre Alexis Vautrin, Nancy (Coordinatrice)  
Fabrice André, oncologue médical, Institut Gustave Roussy, Villejuif  
Jean-Pierre Bellocq, pathologiste, CHRU, Strasbourg  
Yves Caron, pathologiste, Reims  
Pierre Fumoleau, oncologue médical, Centre Georges-François Leclerc, Dijon  
Anne Gompel, endocrinologue, Hôtel Dieu, Paris  
Pierre-Marie Martin, biologiste, AP-HM, Marseille  
Henri Roché, oncologue médical, Institut Claudius Régaud, Toulouse  
Rémy Salmon, chirurgien, Institut Curie, Paris  
Brigitte Sigal-Zafrani, pathologiste, Institut Curie, Paris  
Frédérique Spyratos, biologiste - pharmacienne, Centre René Huguenin, Saint-Cloud

Les membres du groupe de travail - rédacteurs ont effectué une déclaration afin d'identifier les conflits d'intérêts potentiels. Aucun membre du groupe de travail n'a déclaré d'intérêt majeur selon la « grille de dépistage des conflits d'intérêts » de l'Institut national du cancer, [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr).

### Coordination

Diana Kassab-Chahmi, biochimiste, méthodologiste, Institut National du Cancer, Boulogne-Billancourt  
Lise Bosquet, responsable des méthodologistes et des documentalistes, Institut National du Cancer, Boulogne-Billancourt  
Valérie Mazeau-Woynar, médecin, responsable du département des recommandations pour les professionnels de santé, Institut National du Cancer, Boulogne-Billancourt

## ANNEXE 2. MÉTHODOLOGIE D'ÉVALUATION D'UN MARQUEUR BIOLOGIQUE

La validation d'un facteur biologique pronostique ou prédictif ne repose pas sur les mêmes étapes que celles de la validation d'une intervention diagnostique ou thérapeutique.

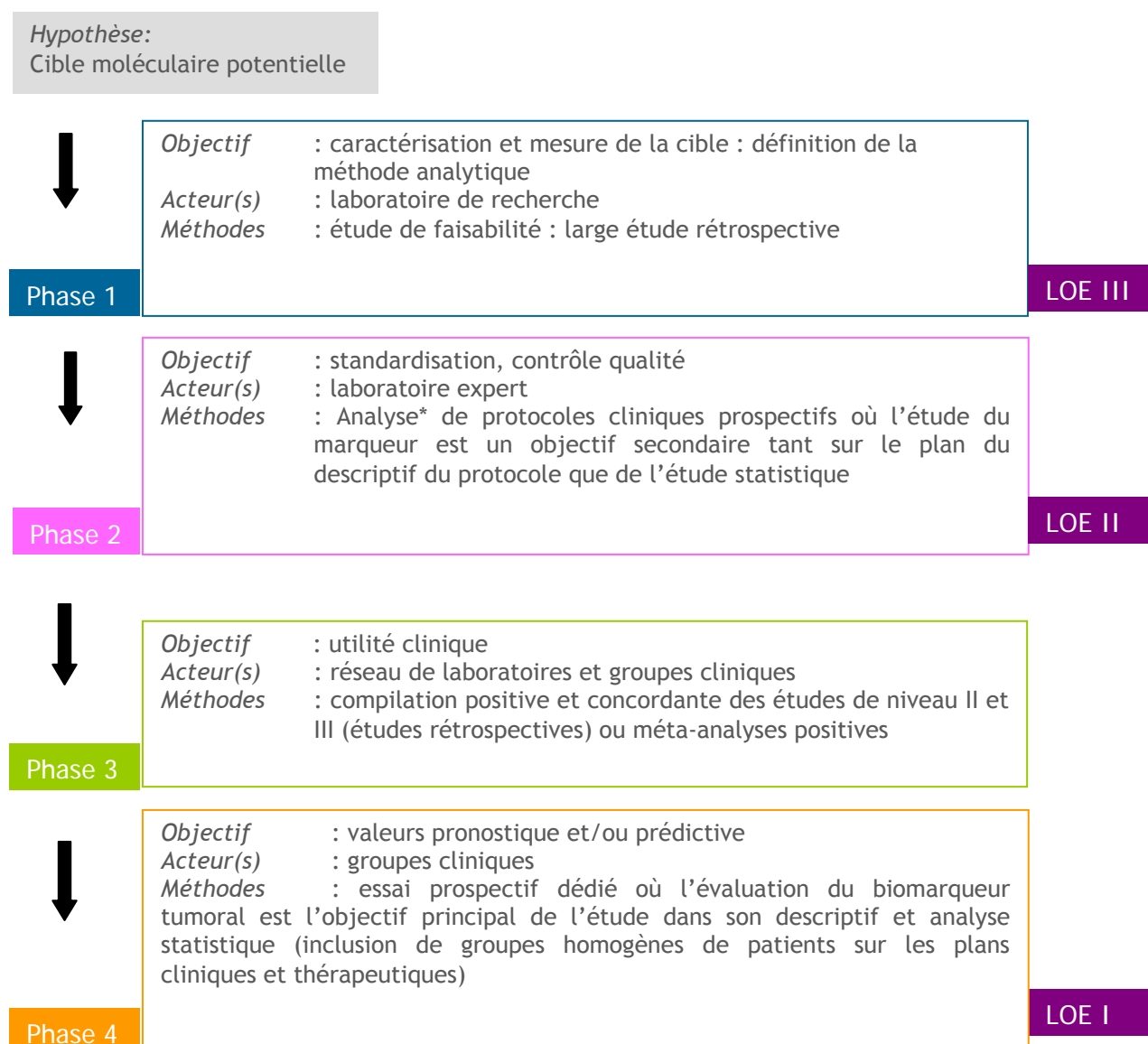
En 1996, une méthode validée par une commission de l'*American society of clinical oncology* (ASCO) sous la conduite de D.F. Hayes a été proposée pour donner des bases objectives de jugement pour l'évaluation et la pertinence des biomarqueurs : le *Tumor marker utility grading system* (TMUGS) [16]. En 1998, une extension de la grille d'évaluation a été décrite, permettant un classement des marqueurs par niveau d'utilité et par niveau de preuve (LOE : *Level of evidence*) [18]. Pour chaque marqueur, l'analyse des grilles devrait permettre d'identifier les étapes manquantes pour une étude complète d'un marqueur.

Dans ce rapport, seule la grille d'évaluation du niveau de preuve est utilisée. L'interprétation de la grille évaluant l'utilité clinique proposée par Hayes est difficile. Les auteurs ayant eux-mêmes souligné ses limites. Dans les recommandations 2007 de l'ASCO, l'utilité clinique est évidemment abordée mais sans référence à une quelconque classification.

Le niveau de preuve d'un facteur biologique est attribué selon la classification décrite dans le diagramme TMUGS (cf. Figure 1).

Un facteur biologique ne peut être considéré comme pronostique ou prédictif que si son évaluation est arrivée en phase 4 du diagramme TMUGS (cf. Figure 1).

Figure 1 : Diagramme TMUGS



\* Le marqueur, étudié en tant qu'objectif secondaire dans les essais prospectifs, est analysé en rétrospectif.

## ANNEXE 3. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

### uPA/PAI1

Une analyse « poolée » menée sur des données individuelles provenant de 17 institutions de 9 pays européens a été conduite par des membres de l'EORTC-RBG (European organization for research and treatment of cancer - Receptor and biomarker group) [21]. Cette analyse met en évidence le caractère indépendant d'uPA/PAI1 et regroupe ainsi les résultats attendus des études des phases 1 et 2 du diagramme TMUGS validé à l'ASCO [16,18], à savoir, la validation, la standardisation de la technique et la démonstration de la valeur indépendante du biomarqueur uPA/PAI-1.

À la lumière de ces données, seules les études des phases 3 et 4 ont été recherchées :

- études rétrospectives ;
- méta-analyses ;
- essais prospectifs dédiés où l'évaluation du biomarqueur tumoral est l'objectif principal de l'étude dans son descriptif et analyse statistique : inclusion de groupes homogènes de patients sur les plans cliniques et thérapeutiques.

En raison de l'identification de l'étude de Look *et al.* publiée en 2002 [21] dans laquelle la dernière étude incluse date de 2001, la recherche bibliographique porte sur la période allant de 2001 à 2008.

Cette recherche a été basée sur :

- l'interrogation en juin 2008 de la base de données Medline® sur la période 2001-2008. L'équation de recherche utilisée est présentée dans le tableau 20 ;
- le suivi prospectif et continu de la littérature dans la base de données Medline® entre le 1<sup>er</sup> juillet 2008 et le 31 octobre 2008.

La stratégie de la recherche bibliographique a été limitée aux publications en français et en anglais. Toutes les patientes atteintes d'un cancer du sein, à l'exception du cancer du sein inflammatoire, ont été recherchées.

Au total, l'équation de recherche utilisée a permis de retrouver 148 références.

### ONCOTYPE DX™ ET MAMMAPRINT®

Toutes les études avec des patientes atteintes d'un cancer du sein, à l'exception du cancer du sein inflammatoire, ont été recherchées. En l'absence d'une analyse de données « poolées » récente conférant un niveau de preuve LOE bien établi, les études de toutes les phases du diagramme TMUGS ont été recherchées :

- études rétrospectives ;
- études prospectives non randomisées ;
- essais randomisés ;
- méta-analyses / synthèses méthodiques ;
- « Research Support ».

Une synthèse méthodique de qualité publiée en 2008, traitant les deux signatures « 21-gènes » et « 70-gènes », a été retrouvée [82] (période de recherche : 1990 - juillet 2007). L'exploitation du

résultat de la stratégie bibliographique de cette synthèse a été jugée pertinente. Par conséquent, la recherche a été complétée sur la période allant de 2007 à 2008.

Cette recherche a été basée sur :

- l'interrogation en juin 2008 de la base de données Medline® sur la période 2007 - 2008. L'équation de recherche utilisée est présentée dans le tableau 21 ;
- le suivi prospectif et continu de la littérature dans la base de données Medline® entre le 1<sup>er</sup> juillet 2008 et le 30 novembre 2008.

La stratégie de la recherche bibliographique a été limitée aux publications de langues française et anglaise.

Au total, les équations de recherche relatives à Oncotype DX™ et MammaPrint® ont permis de retrouver respectivement 15 références et 14 références.

**TABLEAU 19.** Équation de recherche bibliographique sur uPA/PAI-1

ÉQUATION DE RECHERCHE MEDLINE (OVID)	DESCRIPTION DE LA RECHERCHE	RÉSULTAT
1. EXP BREAST NEOPLASMS/ 2. ((CANCER\$1 OR CARCINOMA\$1 OR ADENOCARCINOMA\$1 OR TUMOUR\$1 OR TUMOR\$1 OR MALIGNANC\$3) ADJ2 BREAST).TI. 3. 1 OR 2	Module de recherche « cancer du sein »	
4. (INFLAMMAT\$3 ADJ2 BREAST).TI. 5. 3 NOT 4	Module d'exclusion « cancer du sein inflammatoire »	
6. URINARY PLASMINOGEN ACTIVATOR/ 7. (URINARY PLASMINOGEN ACTIVATOR OR (U ADJ1 PLASMINOGEN ACTIVATOR) OR (UROKINASE ADJ1 TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR) OR UROKINASE OR (U ADJ1 PA)).TI. 8. PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR 1/ 9. (PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR 1 OR (PAI ADJ1 BIOLOGICAL FACTORS) OR TYPE 1 PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR OR PAI).TI. 10. OR/6-9 11. 5 AND 10	Module de recherche « UPA-PAI1 »	
12. EDITORIAL.PT. 13. LETTER.PT. 14. NEWS.PT. 15. CASE REPORTS.PT. 16. IN VITRO.PT. 17. ANIMAL/ 18. OR/12-17 19. 11 NOT 18 20. LIMIT 19 TO (HUMAN AND (ENGLISH OR FRENCH) AND YR=2001-2008)	Filtre d'exclusions avec limitation langue et date	170 références retrouvées
21. RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL.PT. 22. RANDOM ALLOCATION.DE. 23. RANDOM\$.TI. 24. DOUBLE-BLIND METHOD.DE. 25. OR/21-24	Module « essais randomisés »	
26. META-ANALYSIS.PT. 27. META-ANALYS\$.TI. 28. METAANALYS\$.TI. 29. (SYSTEMATIC ADJ3 OVERVIEW\$).TW. 30. (SYSTEMATIC ADJ3 REVIEW\$).TW. 31. (QUANTITATIVE ADJ3 OVERVIEW\$).TW. 32. (QUANTITATIVE ADJ3 REVIEW\$).TW. 33. OR/26-32	Module « méta-analyses »	
34. REVIEW.PT.	Module « revues »	
35. PROSPECTIVE STUDIES/	Module « études prospectives »	
36. 20 AND 25	Recherche des essais randomisés sur le cancer du sein et uPA-PAI1	1 référence retrouvée
37. 20 AND 33	Recherche des méta- analyses sur le cancer du sein et uPA-PAI1	2 références retrouvées
38. 25 OR 33 OR 34 OR 35 39. 20 NOT 38	Recherche des autres types d'études sur le cancer du sein et uPA- PAI1	145 références retrouvées

>> suite

ÉQUATION DE RECHERCHE MEDLINE (OVID)	DESCRIPTION DE LA RECHERCHE	RÉSULTAT
40. EXP IMMUNOHISTOCHEMISTRY/ 41. (((IMMUNOGOLD-SILVER OR IMMUNOLABELING OR IMMUNOGOLD) ADJ3 TECHNIQUE\$1) OR IMMUNOHISTOCYTOCHEMISTRY OR IHC).TI. 42. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY/ 43. (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY\$1 OR ELISA).TI. 44. CYTOSOL/ OR OCTOXYNOL/ 45. (CYTOSOLS OR (OCTOXYNOL\$2 OR OCTYLPHENOXPOLYETHOXYETHANOLS OR TRITON X-100 OR TRITON X-305 OR TRITON X-45)).TI. 46. EXP RADIOIMMUNOASSAY/ 47. (RADIOIMMUNOASSAY\$1 OR RIA).TI. 48. OR/40-47	Module de recherche « techniques »	
49. 36 AND 48	Recherche des essais randomisés sur les techniques de mesure d'uPA/PAI1 dans le cancer du sein	Aucune référence
50. 37 AND 48	Recherche des méta- analyses sur les techniques de mesure d'uPA/PAI1 dans le cancer du sein	Aucune référence
51. 39 AND 48	Recherche des autres types d'études sur les techniques de mesure d'uPA/PAI1 dans le cancer du sein	48 références retrouvées

**TABLEAU 20.** Équation de recherche bibliographique du 30/06/2008 sur Oncotype DX™

EQUATION DE RECHERCHE MEDLINE (OVID)	DESCRIPTION DE LA RECHERCHE	RÉSULTAT
1. EXP BREAST NEOPLASMS/ 2. ((CANCER\$1 OR CARCINOMA\$1 OR ADENOCARCINOMA\$1 OR TUMOUR\$1 OR TUMOR\$1 OR MALIGNANC\$3) ADJ2 BREAST).TI. 3. 1 OR 2	Module « cancer du sein »	
4. (INFLAMMAT\$3 ADJ2 BREAST).TI. 5. 3 NOT 4	Module d'exclusion « cancer du sein inflammatoire »	
6. EDITORIAL.PT. 7. LETTER.PT. 8. NEWS.PT. 9. CASE REPORTS.PT. 10. IN VITRO.PT. 11. ANIMAL/ 12. OR/6-11	Filtre d'exclusions	
13. RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL.PT. 14. RANDOM ALLOCATION.DE. 15. RANDOM\$.TI. 16. DOUBLE-BLIND METHOD.DE. 17. OR/13-16	Module « essais randomisés »	
18. META-ANALYSIS.PT. 19. META-ANALYS\$.TI. 20. METAANALYS\$.TI. 21. (SYSTEMATIC ADJ3 OVERVIEW\$).TW. 22. (SYSTEMATIC ADJ3 REVIEW\$).TW. 23. (QUANTITATIVE ADJ3 OVERVIEW\$).TW. 24. (QUANTITATIVE ADJ3 REVIEW\$).TW. 25. OR/21-24	Module « méta-analyses »	
26. REVIEW.PT.	Module « revues »	
<b>&gt; RECHERCHE ELARGIE</b>		
27. GENE EXPRESSION PROFILING/ 28. (GENE EXPRESSION ADJ2 (PROFILING OR SIGNATURE\$1)).TW. 29. GENE EXPRESSION/ 30. REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION/ 31. (RTPC OR RT-PCR).TI. 32. OR/27-31 33. 32 AND 5 34. 33 NOT 12	Module « profil d'expression des gènes (gene expression profiling) »	
35. LIMIT 34 TO (HUMAN AND (ENGLISH OR FRENCH) AND YR=2007-2008)	Limitation langue et date	
36. 35 AND 17	Recherche des essais randomisés sur les profils d'expression des gènes dans le cancer du sein	12 références retrouvées
37. 35 AND 25	Recherche des méta-analyses sur les profils d'expression des gènes dans le cancer du sein	2 références retrouvées
38. 17 OR 25 OR 26 39. 35 NOT 38	Recherche des autres types d'études sur les profils d'expression des gènes dans le cancer du sein	494 références retrouvées

>> suite

EQUATION DE RECHERCHE MEDLINE (OVID)	DESCRIPTION DE LA RECHERCHE	RÉSULTAT
40. "RESEARCH SUPPORT, NON-U.S. GOVT.".PT.	Module « research support »	
41. 35 AND 40	Recherche des références « research support » sur les profils d'expression des gènes dans le cancer du sein	374 références retrouvées
<u>&gt; RECHERCHE RESTREINTE N° 1 (limite sur l'auteur et la signature moléculaire)</u>		
42. (21-GENE OR ONCOTYPE DX).TW. 43. PAIK S.AU. 44. 42 OR 43	Module « Oncotype ou 21-gene » + auteur Paik»	
45. 36 AND 44	Recherche des essais randomisés sur la signature 21 gènes dans le cancer du sein, dont Paik S est l'un des auteurs	1 référence retrouvée
46. 37 AND 44	Recherche des méta-analyses sur la signature 21 gènes dans le cancer du sein, dont Paik S est l'un des auteurs	1 référence retrouvée
47. 39 AND 44	Recherche des autres types d'études sur la signature 21 gènes dans le cancer du sein, dont Paik S est l'un des auteurs	7 références retrouvées
48. 41 AND 44	Recherche des références « research support » sur la signature 21 gènes dans le cancer du sein, dont Paik S est l'un des auteurs	6 références retrouvées
<u>&gt; RECHERCHE RESTREINTE N° 2 (limite de date)</u>		
49. 5 NOT 12 50. LIMIT 49 TO (HUMAN AND (ENGLISH OR FRENCH) AND YR=2007-2008)		
51. 50 AND 17 AND 44	Recherche des essais randomisés sur la signature 21 gènes dans le cancer du sein, dont Paik S est l'un des auteurs	2 références retrouvées
52. 50 AND 25 AND 44	Recherche des méta-analyses sur la signature 21 gènes dans le cancer du sein, dont Paik S est l'un des auteurs	2 références retrouvées
53. (50 NOT 38) AND 44	Recherche des autres types d'études sur la signature 21 gènes dans le cancer du sein, dont Paik S est l'un des auteurs	10 références retrouvées
54. 50 AND 40 AND 44	Recherche des références « research support » sur la signature 21 gènes dans le cancer du sein, dont Paik S est l'un des auteurs	7 références retrouvées

**TABLEAU 21.** Équation de recherche bibliographique du 30/06/2008 sur MammaPrint®

ÉQUATION DE RECHERCHE MEDLINE (OVID)	DESCRIPTION DE LA RECHERCHE	RÉSULTAT
1. EXP BREAST NEOPLASMS/ 2. ((CANCER\$1 OR CARCINOMA\$1 OR ADENOCARCINOMA\$1 OR TUMOUR\$1 OR TUMOR\$1 OR MALIGNANC\$3) ADJ2 BREAST).TI. 3. 1 OR 2	Module « cancer du sein »	
4. (INFLAMMAT\$3 ADJ2 BREAST).TI. 5. 3 NOT 4	Module d'exclusion « Cancer du sein inflammatoire »	
6. EDITORIAL.PT. 7. LETTER.PT. 8. NEWS.PT. 9. CASE REPORTS.PT. 10. IN VITRO.PT. 11. ANIMAL/ 12. OR/6-11	Filtre d'exclusions	
13. RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL.PT. 14. RANDOM ALLOCATION.DE. 15. RANDOM\$.TI. 16. DOUBLE-BLIND METHOD.DE. 17. OR/13-16	Module « essais randomisés »	
18. META-ANALYSIS.PT. 19. META-ANALYS\$.TI. 20. METAANALYS\$.TI. 21. (SYSTEMATIC ADJ3 OVERVIEW\$).TW. 22. (SYSTEMATIC ADJ3 REVIEW\$).TW. 23. (QUANTITATIVE ADJ3 OVERVIEW\$).TW. 24. (QUANTITATIVE ADJ3 REVIEW\$).TW. 25. OR/21-24	Module « méta-analyses »	
26. REVIEW.PT.	Module « revues »	
<b>&gt; RECHERCHE ELARGIE</b>		
27. GENE EXPRESSION PROFILING/ 28. (GENE EXPRESSION ADJ2 (PROFILING OR SIGNATURE\$1)).TW. 29. OLIGONUCLEOTIDE ARRAY SEQUENCE ANALYSIS/ 30. OR/27-29 31. 30 AND 5 32. 31 NOT 12	Module « profil d'expression des gènes (gene expression profiling) »	
33. LIMIT 32 TO (HUMAN AND (ENGLISH OR FRENCH) AND YR=2007-2008)	Limitation langue et date	
34. 33 AND 17	Recherche des essais randomisés sur les profils d'expression des gènes dans le cancer du sein	9 références retrouvées
35. 33 AND 25	Recherche des méta- analyses sur les profils d'expression des gènes dans le cancer du sein	2 références retrouvées
36. 17 OR 25 OR 26 37. 33 NOT 36	Recherche des autres types d'études sur les profils d'expression des gènes dans le cancer du sein	332 références retrouvées
38. "RESEARCH SUPPORT, NON-U.S. GOVT.".PT.	Module « research support »	
39. 33 AND 38	Recherche des références « research support » sur les profils d'expression des gènes dans le cancer du sein	256 références retrouvées

>> suite

ÉQUATION DE RECHERCHE MEDLINE (OVID)	DESCRIPTION DE LA RECHERCHE	RÉSULTAT
<u>&gt; RECHERCHE RESTREINTE N° 1 (limite sur l'auteur et la signature moléculaire)</u>		
40. (70-GENE OR MAMMAPRINT).TW. 41. VAN'T VEER LJ.AU. 42. 40 OR 41	Module « Mammaprint ou 70-gène » + auteur Van't Veer»	196 références retrouvées
43. 34 AND 42	Recherche des essais randomisés sur la signature 70 gènes dans le cancer du sein, dont Van't Veer LJ est l'un des auteurs	Aucune référence retrouvée
44. 35 AND 42	Recherche des méta-analyses sur la signature 70 gènes dans le cancer du sein, dont Van't Veer LJ est l'un des auteurs	1 référence retrouvée
45. 37 AND 42	Recherche des autres types d'études sur la signature 70 gènes dans le cancer du sein, dont Van't Veer LJ est l'un des auteurs	7 références retrouvées
46. 39 AND 42	Recherche des références « research support » sur la signature 70 gènes dans le cancer du sein, dont Van't Veer LJ est l'un des auteurs	6 références retrouvées
<u>&gt; RECHERCHE RESTREINTE N° 2 (limite de date)</u>		
47. 5 NOT 12 48. LIMIT 47 TO (HUMAN AND (ENGLISH OR FRENCH) AND YR=2007-2008)		
49. 48 AND 17 AND 42	Recherche des essais randomisés sur la signature 70 gènes dans le cancer du sein, dont Van't Veer LJ est l'un des auteurs	Aucune référence retrouvée
50. 48 AND 25 AND 42	Recherche des méta-analyses sur la signature 70 gènes dans le cancer du sein, dont Van't Veer LJ est l'un des auteurs	1 référence retrouvée
51. (48 NOT 36) AND 42	Recherche des autres types d'études sur la signature 70 gènes dans le cancer du sein, dont Van't Veer LJ est l'un des auteurs	12 références retrouvées
52. 48 AND 38 AND 42	Recherche des références « research support » sur la signature 70 gènes dans le cancer du sein, dont Van't Veer LJ est l'un des auteurs	10 références retrouvées

## ANNEXE 4. SÉLECTION DES ÉTUDES

### UPA/PAI1

#### Critères d'inclusion

Seules les études répondant aux critères d'inclusion suivantes ont été retenues :

- cancer du sein invasif et uPA/PAI-1 ;
- valeur pronostique du biomarqueur / caractéristiques clinicopathologiques ;
- uPAR et PAI-2 ne seront retenus que s'ils sont associés à uPA/PAI-1 ;
- comparaison de la valeur pronostique d'uPA/PAI-1 à celle d'un autre marqueur validé : est exclu si le marqueur est non validé.

Tous les critères de jugement ont été considérés.

#### Critères d'exclusion

Les études comprenant au moins un des critères d'exclusion suivants ne sont pas retenues :

- études de patientes atteintes d'un cancer du sein inflammatoire ou d'un cancer du sein *in situ* ;
- études rapportant les mécanismes moléculaires ;
- études du complexe uPA.PAI-1 (où uPA : 5 % de la quantité totale antigénique) qui est une entité structurale différente de celle d'uPA et de PAI-1 mesurés séparément ou conjointement ;
- études rapportant la mise en évidence de la localisation du marqueur dans un type cellulaire donné (stromales, etc.) ;
- études rapportant l'association avec le risque de survenue du cancer du sein et non pas avec un critère clinique (SSR, SG, etc.) ;
- études dans lesquelles un autre marqueur « non validé » en objectif principal (TIMP-1, métalloprotéinase-9, etc.) ;
- études de la faisabilité d'une technique (autre que ELISA et RT-PCR, ex : protéine-« microarray » pour des mesures simultanées de uPA, PAI-1 et VEGF) ;
- études du polymorphisme du gène uPA ou PAI-1 et son impact pronostique ;
- études de phases 1 et 2 telles que définies dans le diagramme TMUGS.

À l'exception des synthèses méthodiques, les abstracts de communications dans les congrès et les études qui ne présentent pas de données originales sont exclus de la sélection (doublons de publications et revues non systématiques notamment). Les éditoriaux, les lettres à l'éditeur, les cas rapportés, les communiqués, les références qui ne présentent pas d'abstract ainsi que les études conduites spécifiquement chez l'animal sont également exclus de la sélection.

Une première sélection des références a été faite par le méthodologiste sur la base des 148 références retrouvées par la stratégie de recherche. Dans un second temps, les listings bibliographiques ont été soumis aux membres du groupe de travail pour avis et commentaires qui ont été, par la suite, discutés entre le méthodologiste et la coordinatrice scientifique du projet :

- des références pertinentes non retrouvées par l'équation de recherche Medline® ont été ajoutées ;
- des références incluses à tort ont été rejetées (type d'étude inapproprié).

## ONCOTYPE DX™, MAMMAPRINT®

### Critères d'inclusion

Seules les études répondant aux critères d'inclusion suivantes sont retenues :

- cancer du sein invasif et signature « 21-gènes » ou Oncotype DX™ ;
- cancer du sein invasif et signature « 70-gènes » ou MammaPrint® ;
- tous les critères de jugement ont été considérés.

### Critères d'exclusion

Les études comprenant au moins un des critères d'exclusion suivants ne sont pas retenues :

- les patientes non atteintes d'un cancer du sein ou ne traitant pas la signature « 21-gènes » ou la signature « 70-gènes » ;
- les patientes atteintes d'un cancer du sein inflammatoire ;
- les patientes atteintes d'un cancer du sein *in situ* ;
- les études rapportant les mécanismes moléculaires ;
- les études rapportant la construction de modèles mathématiques relatifs aux signatures ;
- les études de comparaison des données de 2 ou plusieurs marqueurs avec celles de chacune des deux signatures « 21-gènes » ou « 70-gènes » ;
- les études d'implémentation du marqueur à l'échelle internationale.

À l'exception des synthèses méthodiques, les abstracts de communications dans les congrès et les études qui ne présentent pas de données originales sont exclus de la sélection (doublons de publications et revues non systématiques notamment). Les éditoriaux, les lettres à l'éditeur, les cas rapportés, les communiqués, les références qui ne présentent pas d'abstract ainsi que les études conduites spécifiquement chez l'animal sont également exclus de la sélection.

Une première sélection des références a été faite par le méthodologiste sur la base des références retrouvées par la stratégie bibliographique (15 références pour la signature « 21-gènes » et 14 références pour la signature « 70-gènes »). Dans un second temps, les listings bibliographiques ont été soumis aux membres du groupe de travail pour avis et commentaires qui ont été, par la suite, discutés entre le méthodologiste et la coordinatrice scientifique du projet :

- des références pertinentes non retrouvées par l'équation de recherche Medline® ont été ajoutées ;
- des références incluses à tort ont été rejetées.

## ANNEXE 5. GRILLE D'ANALYSE DES ÉTUDES

### Description de l'étude

MARQUEURS ETUDIÉS / TYPE DE MOLECULE (ADN/MUTATION, ARN/SUR-EXPRESSION, PROTEINE/SURPRODUCTION, ANTICORPS, REPONSE CELLULAIRE...)		EFFECTIF	TYPE D'ÉTUDE OBJECTIF DE L'ÉTUDE
En objectif principal	En objectif secondaire	Nombre de patients / nombre de facteurs étudiés  Permet de déduire la puissance de l'étude	Étude descriptive ? Étude confirmatoire ? Si oui, y a-t-il eu une étude clinique pilote ? (preuve du concept ou d'une hypothèse biologique), bien cadré ? multicentrique ? monocentrique ?  Étude de standardisation de la technique ? Étude rétrospective (multicentrique ou non ?) Méta-analyse ? (décrire la qualité méthodologique) Essai prospectif randomisé ? sur quoi ? déterminant la valeur pronostique ou prédictive du marqueur ?  Essai utilisant le marqueur comme déterminant dans la sélection des patients dans un essai clinique impliquant une comparaison de traitements ?

### STUDY DESIGN

Stratification Type de strates (âge, taille de la tumeur, etc.) <b>Pré / post-ménopausées ?</b> Proportion en Marqueur+ / Marqueur- N ? M ? Critères clinicopathologiques ? Traitements en cours ou précédents l'inclusion ? Analyse multiparamétrique, comparative... Représentativité de la population générale du cancer du sein : Oui/Non ?	Intervention Définition des bras Homogénéité des groupes de patientes ?
--	---

## Description des données analytiques

<p><b>1- Nom de la technique</b></p> <p>Gène : Southern blot, CDGE, SSCPE, PCR/séquençage, etc.          ARN : Northern blot, PCR, hybridation in situ, etc.          Protéine, lipide, glucide : ELISA, EIA, RIA, IRMA, études immuno-histochimiques, immunoperoxidase, fluorescence, etc.          Processus biologique (angiogenèse, réponse cellulaire, ...) : immuno-pathologie, essai cellulaire in vitro, etc.</p>	<p><b>2- Réactifs employés</b></p> <p>anticorps spécifiques dirigés contre un épitope à définir, ligands, sonde, amorce, kits ...</p> <p>Label :          « Pour le diagnostic » ?          « Home Made » ?</p>	<p><b>3- Échantillons/source</b></p> <p>Tissu :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- entier ou fractionné ?</li> <li>- si fractionné, y a-t-il eu contrôle de qualité du fractionnement ?</li> <li>- isolé ou fixé ?</li> <li>- solide ou liquide biologique ?</li> </ul> <p>Traçabilité de collecte et de stockage décrite : Oui/Non ?          (concerne les études rétrospectives)</p>
---	---	---

<p><b>4- Conditions de mise en œuvre</b></p> <p>Accréditation :          inter-manipulations* ?          inter-laboratoires ?</p>	<p><b>5- Sensibilité de la technique</b></p> <p>Oui/Non ?</p>	<p><b>6- Reproductibilité de la technique</b></p> <p>Oui/Non ?          (analyse de variance)</p>
---	---	---

\* dans un même laboratoire.

<p><b>7- Standardisation de la technique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Étalonnage externe, Oui/Non ?</li> <li>- Contrôle de qualité, Oui/Non ?</li> </ul>	<p><b>8- Modalités de lecture du résultat</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- expérimentateur dépendant, Oui/Non ?</li> <li>- lecture automatisée, Oui/Non ?</li> <li>- lecture répétée, Oui/Non ?</li> <li>- lecture qualitative ou quantitative ou semi-quantitative ?</li> <li>- lecture continue ou discontinue ?</li> </ul>	<p><b>9- Détermination du seuil / signal</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- dichotomique (+ / -) ?</li> <li>- « Likert-scale » ?</li> <li>- supérieur à une valeur donnée ?</li> </ul> <p>contrôle de qualité effectué ?          national ?          international ?</p>
--	---	---

## Résultats cliniques, Analyses statistiques

<p><b>1- Critères de jugement étudiés</b></p> <p>Survie globale, DFS, CR/PR          Bénéfice clinique...</p>	<p><b>2- Durée de suivi</b></p> <p>« Follow-up »</p>	<p><b>3- Type d'analyse</b></p> <p>Monovariée, Oui/Non ? Multivariée, Oui/Non ? Si oui, facteurs cliniques vs un facteur biologique ? ou vs plusieurs facteurs biologiques ?          Modèle de Cox, normal ou pondéré ?</p>
<p><b>4- Nombre d'événements</b></p> <p>population étudiée par rapport à la population générale</p>	<p><b>5- Résultats</b></p> <p>Exemple :          - % de survie par bras (p ?)</p>	<p><b>6- Conclusion</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- facteur indépendant ?</li> <li>- facteur de pronostic favorable ?</li> <li>- facteur complémentaire* ?</li> <li>- facteur redondant ? si oui quel est son intérêt par rapport à un autre ? est-il plus facilement quantifiable ? ...</li> </ul>

\* ne trouve sa signification que dans une sous-population

## ANNEXE 6. UPA/PAI1 - DONNÉES ANALYTIQUES PAR ÉTUDE

RÉFÉRENCE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTIONNEMENT	ÉCHANTILLON SOURCE CONSERVATION	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTIBILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT
TECHNIQUE		TYPE DE TISSU	TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE				ÉTALONNAGE EXTERNE ?	DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
							CONTRÔLE QUALITE	
Janicke <i>et al.</i> 2001 [20]	réactif spécifique, parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research" uPA : Imubind-894 PAI-1 : Imubind-821 ( <i>American Diagnostica</i> )	Solide-fractionné Extraits tissulaires repris dans du Triton X-100	NP  décrite	Cryoconservation	Contrôle qualité inter-laboratoires, effectué spécifiquement dans le cadre de cette étude	NP /  essais réalisés dans 6 laboratoires	ng / mg de prot.  OUI  OUI The Munich Study Headquarters and the Quality Assurance Center, Netherlands"	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée   Seuil propre à l'équipe; uPA : 3 ng/mg de prot. PAI-1 : 14 ng/mg de prot. optimisé [50]
Harbeck <i>et al.</i> 2001 [56]	réactif spécifique, parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research" uPA : Imubind-894 PAI-1 : Imubind-821 ( <i>American Diagnostica</i> )	Solide-fractionné Extraits tissulaires repris dans du Triton X-100	NP  Non décrite	Cryoconservation	NP	NP /  NP	ng / mg de prot.  NP  NP	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée   Seuil propre à l'équipe; uPA : 3 ng/mg de prot. PAI-1 : 14 ng/mg de prot., optimisé [50]

>> suite

RÉFÉRENCE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTIONNEMENT	ÉCHANTILLON SOURCE	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTIBILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT
TECHNIQUE		TYPE DE TISSU	TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE	CONSERVATION			ÉTALONNAGE EXTERNE ?	DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
							CONTRÔLE QUALITE	
<b>Konecny et al. 2001 [57]</b>	réactif spécifique, parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research" uPA : Imubind-894 PAI-1 : Imubind-821 (American Diagnostica)	Solide-fractionné Extraits tissulaires repris dans du Triton X-100	OUI  décrite	Cryoconservation	NP	NP /  NP	ng / mg de prot.  OUI  Concentrations prot. par BCA	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe; uPA : 5,5 ng/mg de prot. PAI-1 : 14 ng/mg de prot.
<b>Borstnar et al. 2002 [58]</b>	réactif spécifique, parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research" PAI-1 et PAI-2 (American Diagnostica)	Solide-fractionné Extraits tumoraux cytosoliques	NP  NP	Cryoconservation	défini selon un programme d'assurance qualité [54]	NP /  NP	ng / mg de prot.  OUI  Concentrations prot. par BCA	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe déterminé dans le cadre de l'étude <u>PAI-1</u> : 3,9 ng/mg de prot. <u>PAI-2</u> : 6,5 ng/mg de prot.

>> suite

RÉFÉRENCE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTIONNEMENT	ÉCHANTILLON SOURCE	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTIBILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT
TECHNIQUE		TYPE DE TISSU	TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE	CONSERVATION			ÉTALONNAGE EXTERNE ?	DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
<b>Borstan <i>et al.</i> 2002a [59]</b>	réactif spécifique, parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research" (American Diagnostica)	Solide-fractionné  Extraits cytosoliques (PAI-2)  Extraits Triton X-100 (uPA, PAI-1, uPAR)	NP  NP	Cryoconservation	défini selon un programme d'assurance qualité [54]	NP /  NP	ng / mg de prot.  OUI  Concentrations prot. par la méthode Bio-Rad	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe déterminé dans le cadre de l'étude uPA : 5,58 ng/mg de prot. PAI-1 : 9,81 ng/mg de prot. PAI-2 : 14,75 ng/mg de prot. uPAR : 2,46 ng/mg de prot.
<b>Harbeck <i>et al.</i> 2002 [39]</b>	réactif spécifique, parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research"; uPA : Imubind-894; PAI1 : Imubind-821 (American Diagnostica)	Solide-fractionné  Extraits cytosoliques	NP  Non décrite	NP	NP	définie; 100 µg de tissu tumoral (= 1 µg d'extrait protéique) est suffisant  NP	ng / mg de prot.  NP  NP	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe uPA : 3 ng/mg PAI-1 : 14 ng/mg

>> suite

RÉFÉRENCE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTIONNEMENT	ÉCHANTILLON SOURCE	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTIBILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT
TECHNIQUE		TYPE DE TISSU	TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE	CONSERVATION			ÉTALONNAGE EXTERNE ?	DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
							CONTRÔLE QUALITE	
Castello <i>et al.</i> 2002 [60]  RT-qPCR, comparaison avec ELISA	RT-qPCR amorces spécifiques « home made »  ELISA réactif spécifique, parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe  (Tint Elize, Biopool) <u>PAI-1/</u> active/inactive/complexé <u>uPA/</u> les 2 formes moléculaires  (Chromolize, Biopool) uPA/fonctionnel	ARN totaux ou extraits cytosoliques ou extraits membranaires-Triton (formes antigéniques)	Contrôle des concentrations protéiques (BCA) dans les fractions  décrite	Cryoconservation	Décrites dans l'étude	RT-PCR/limite de détection : 10 copies d'ADNc <u>RT-PCR</u> écart(intra) :0,12 écart(inter) : 0,15 <u>PAI-1</u> antigène: CV(intra) = 3 % CV(inter) = 7 % <u>PAI-1</u> fonctionnel : CV(intra) = 6 % CV(inter) = 10 % <u>uPA</u> antigène : CV(intra) = 4 % CV(inter) = 10 % <u>uPA</u> fonctionnel : CV(intra) = 6 % CV(inter) = 11 %	<u>ARNm</u> : nombre de copies ARNm du gène cible (normalisation/ $\beta$ -actine) <u>PAI-1/antigène, uPA/antigène/fonctionnel</u> : ng/mg de prot. <u>PAI-1/fonctionnel</u> : unités <sup>a</sup> /mg de prot. Courbes d'étalonnage Essais en double, données normalisées (RT-PCR), pureté des ARN (A260/280), pureté des ADNc (électrophorèse agarose)	Lecture quantitative, automatisée, chiffrée  Seuil : NP

>> suite

RÉFÉRENCE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTIONNEMENT	ÉCHANTILLON SOURCE CONSERVATION	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTIBILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT
TECHNIQUE		TYPE DE TISSU	TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE				ÉTALONNAGE EXTERNE ?	DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
							CONTRÔLE QUALITE	
Harbeck <i>et al.</i> 2002 [61]	Cohorte de Munich et de Rotterdam uPA : Imubind-894; PAI1 : Imubind-821 (American Diagnostica)	Solide-fractionné Cohorte de Munich Extraits Triton Cohorte de Rotterdam Extraits cytosoliques	Cf. Janicke <i>et al.</i> 2001 [115] et Foekens <i>et al.</i> 2000 [51]			NP  NP	ng / mg de prot.  NP	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe uPA : 3 ng/mg PAI-1 : 14 ng/mg
Luqmani <i>et al.</i> 2002 [62]	Procurés de chez Pr. Benraad, méthode interne Anticorps non spécifiques	Solide-fractionné  Extraits cytosoliques	NP  Non décrite	Cryoconservation	ELISA décrite dans [116], mesure effectuée en 3 fois	NP /  Variation inter-manipulations : 5-8 %	ng / mg de prot.  Standards et contrôles externes (de l'EORTC)	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe uPA : 0,05 ng/mg PAI-1 : 1,65 ng/mg
Look <i>et al.</i> 2002 [21]	réactif spécifique parfaitement caractérisé <u>ELISA</u> : <i>American Diagnostica</i> "for research", / Monozyme et Oncogene Science "research only" <u>LIA</u> : AB Sangtec Medical ou propre à l'équipe	Solide-fractionné  Extraits tumoraux cytosoliques ou repris dans du Triton X-100	NP  non décrite	NP	Contrôle de qualité défini Contrôle de qualité inter-laboratoires [54]	NP /  définie, analyse de variance inter-laboratoires	ng/mg de prot.  NP  NP	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe

>> suite

RÉFÉRENCE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTIONNEMENT	ÉCHANTILLON SOURCE CONSERVATION	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTIBILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT
TECHNIQUE		TYPE DE TISSU	TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE				ÉTALONNAGE EXTERNE ?	DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
							CONTRÔLE QUALITE	
<i>Spyratos et al.</i> 2000 [63]  RT-qPCR, comparaison avec ELISA	RT-qPCR réactif spécifique, parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research", kit : "SYBR Green® PCR Core Reagent" (Perkin-Elmer Applied Biosystems)  ELISA réactif spécifique, parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research"; uPA : Imubind-894; PAI-1 : Imubind-821 ( <i>American Diagnostica</i> )	ARN totaux ou extraits cytosoliques (ELISA)	NA  décrite	Cryoconservation	RT-PCR décrite dans Bieche <i>et al.</i> 1999, [117] Bieche <i>et al.</i> 1999a [118] et Spyratos <i>et al.</i> 2000 [119]  ELISA décrite dans Bouchet <i>et al.</i> 1999 [48]	NP /  reproductibilité définie, agrément inter-laboratoires [120]	NTARGET : différences en nombre de copies d'expression du gène cible par rapport au gène TBP et à l'étalon  NP  contrôle des "amorces" et des ARN extraits	Lecture quantitative, automatisée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe; uPA : ≤ 16 ; 16 - 38 ; ≥ 38 PAI-1 : ≤ 4,7 ; 4,7 - 9 ; ≥ 9

>> suite

RÉFÉRENCE TECHNIQUE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE TYPE DE TISSU	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTION- NEMENT  TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE	ÉCHANTILLON SOURCE CONSERVATION	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTI- BILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS  ÉTALONNAGE EXTERNE ?  CONTRÔLE QUALITE	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT  DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
<b>Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64]</b>  <b>EIA (c-erbB-2) ELISA (uPA et PAI-1)</b>	<u>EIA kit</u> (Ciba Corning, USA)  <u>ELISA</u> réactif parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research"; uPA : Imubind-894; PAI-1 : Imubind-821 ( <i>American Diagnostica</i> )	<u>uPA/PAI-1</u> Solide-fractionné Extraits cytosoliques  <u>c-erbB-2</u> Fractions membranaires, Triton X-100	NP  décrite	Cryoconservation	Essais effectués en double ; mesures ELISA ramenées au taux protéique total	NP /  Reproductibilité définie	uPA/PAI-1 en ng/mg de prot. c-erbB-2 en UI/mg de prot.  OUI  Concentration protéique déterminée par la méthode BCA ; Contrôles internes (cytosoles et extraits membranaires « poolés »)	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe : tumeurs >75 <sup>ème</sup> percentile sont considérées positives <u>uPA</u> : 1,40 ng/mg prot. <u>PAI-1</u> : 5,53 ng/mg prot. <u>c-erbB-2</u> : 300 UI/mg prot.
<b>Cufer <i>et al.</i> 2003 [65]</b>  <b>ELISA</b>	réactif non propre à l'équipe, portant le label "for research"; uPA : Imubind-894; PAI-1 : Imubind-821 ( <i>American Diagnostica</i> )	Solide-fractionné  Extraits Triton X-100	NP  décrite	Cryoconservation	Qualité des mesures contrôlée par des programmes d'assurance qualité [54]	NP /  NP	ng/mg de prot.  NP  Concentration protéique déterminée par la méthode BIO-RAD	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuils optimisés et ré-évalués précédemment [38] <u>uPA</u> : 3 ng/mg de prot. <u>PAI-1</u> : 14 ng/mg de prot.

>> suite

RÉFÉRENCE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTIONNEMENT	ÉCHANTILLON SOURCE	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTIBILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT
TECHNIQUE		TYPE DE TISSU	TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE	CONSERVATION			ÉTALONNAGE EXTERNE ?	DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
							CONTRÔLE QUALITE	
Dazzi <i>et al.</i> 2003 [66]	réactif parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research"; uPA : Imubind-894; PAI-1 : Imubind-821 ( <i>American Diagnostica</i> )	Solide-fractionné  Extraits cytosoliques	NP  décrite	Cryoconservation	NP	NP /  NP	ng/mg de prot.  NP  Concentration protéique déterminée par la méthode BIO-RAD	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe, médiane uPA : 0,31 ng/mg prot. PAI-1 : 4,31 ng/mg prot.
Hansen <i>et al.</i> 2003 [67]	réactif parfaitement caractérisé, propre à l'équipe uPA : IgG monoclonal des clones 2, 6 et 12. PAI-1 : IgG monoclonal du clone 2.	Solide-fractionné  Extraits Triton X-100	NP  décrite	Cryoconservation	NP	NP /  NP	ng/mg de prot.  NP	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuils optimisés et évalués précédemment [121] uPA : 4,5 ng/mg de prot. PAI-1 : 11,1 ng/mg de prot.
Look <i>et al.</i> 2003 [55]	cf. Look <i>et al.</i> 2002 [21]							

>> suite

RÉFÉRENCE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTIONNEMENT	ÉCHANTILLON SOURCE	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTIBILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT
TECHNIQUE		TYPE DE TISSU	TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE	CONSERVATION			ÉTALONNAGE EXTERNE ?	DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
							CONTRÔLE QUALITE	
<b>Zemzoum et al. 2003 [68]</b>	réactif parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, portant le label "for research"; uPA : Imubind-894; PAI-1 : Imubind-821 ( <i>American Diagnostica</i> )	Solide-fractionné  Extraits Triton X-100		Cryoconservation		NP /  NP	ng/mg de prot.	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuils optimisés et ré-évalués précédemment [38] <u>uPA</u> : 3 ng/mg de prot. <u>PAI-1</u> : 14 ng/mg de prot.
<b>Meo et al. 2004 [69]</b>	réactif parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe uPA : Imubind-894; PAI-1 : Imubind-821 ( <i>American Diagnostica</i> )	Solide-fractionné  Extraits cytosoliques	Cytosols préparés selon les recommandations de l'EORTC [122]	Absorbance à 450 nm : limite minimale de détection est de 0,1 ng/mg de prot. (uPA) et 1 ng/mg de prot. (PAI-1) / CV intra-manipulation < 5 % (uPA et PAI-1) CV inter-manipulations = 6,8 % (uPA) et 10,2 % (PAI-1)	ng/mg de prot.  OUI, cytosols « poolés » / contrôle pour chaque essai protéique  Concentration protéique déterminée par la méthode de Bradford	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe, variable dichotomisée ; médiane <u>uPA</u> : 0,46 ng/mg de prot. <u>PAI-1</u> : 7,06 ng/mg de prot.	cf. Meo et al. 2004 [69]  ELISA	réactif parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe uPA : Imubind-894; PAI-1 : Imubind-821 ( <i>American Diagnostica</i> )

>> suite

RÉFÉRENCE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE TYPE DE TISSU	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTIONNEMENT  TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE	ÉCHANTILLON SOURCE CONSERVATION	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTIBILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS  ÉTALONNAGE EXTERNE ?  CONTRÔLE QUALITE	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT  DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
Leissner <i>et al.</i> 2006 [70]  RT-qPCR	« home made »	ARN totaux	NA  Non décrite	Cryoconservation	Décrites	NP /  NP	Nombre de copies ARNm du gène cible par rapport à celui du gène de référence PPIB Courbes d'étalonnage contrôle interne : gène PPIB Contrôle négatif (eau) pour vérification de contamination	Lecture quantitative, automatisée, chiffrée  Seuil propre à l'équipe; médiane PAI-1/PPIB : 0,25 uPA/PPIB : 2,12
Offersen <i>et al.</i> 2008 [73]  ELISA (sandwich)	réactif parfaitement caractérisé, non propre à l'équipe, commercialisé (Monozyme) <u>PAI-1</u> : anticorps monoclonal qui reconnaît le complexe uPA.PAI-1 et les 2 formes (active et latente)	Solide-fractionné  Extraits cytosoliques	Extraits cytosoliques préparés selon méthode « standard »  décrite	Cryoconservation	Méthode décrite dans Grondahl-Hansen <i>et al.</i> 1993 [123]	NP /  NP	ng/mg de prot.  cf. Grondahl-Hansen <i>et al.</i> 1993 [123]	Lecture quantitative, automatisée, répétée, chiffrée  <u>PAI-1</u> : seuil propre à l'équipe <0,48 ng/mg ; 0,48 - 1,10 ng/mg ; >1,10 ng/mg

>> suite

RÉFÉRENCE	RÉACTIFS EMPLOYÉS	ÉCHANTILLONS SOURCE	CONTRÔLE QUALITE DU FRACTIONNEMENT	ÉCHANTILLON SOURCE	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ / REPRODUCTIBILITÉ	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	MODALITES DE LECTURE DU RÉSULTAT
TECHNIQUE		TYPE DE TISSU	TRAÇABILITE DE COLLECTE ET DE STOCKAGE	CONSERVATION			ÉTALONNAGE EXTERNE ?	DÉTERMINATION DU SEUIL/SIGNAL
							CONTRÔLE QUALITE	
<b>Biermann <i>et al.</i> 2008 [71]</b>	ELISA/cytosoles réactifs parfaitement caractérisés, propres à l'équipe [74] [116] ELISA/Triton réactifs parfaitement caractérisés, non propres à l'équipe uPA : Imubind-894; PAI-1 : Imubind-821 ( <i>American Diagnostica</i> ) RT-qPCR amorces spécifiques	Solide-fractionné  Protéine Extraits cytosoliques Extraits membranaires (Triton)  ARNm selon [124] [125]	Concentrations protéiques déterminées dans chacune des fractions obtenues par chacune des 2 techniques d'extraction des protéines  décrite	Cryoconser-vation	ELISA/cytosoles selon Sweep <i>et al.</i> 1998 [54]	NP /  RT-qPCR CV (inter/uPA) = 11 % CV (inter/PAI-1) = 8 % Corrélation intra-manipulation (uPA et PAI-1) : r = 0,99 (p < 0,001)	ELISA : ng/mg prot. Concentration protéique déterminée par « Lowry » (cytosoles) ou par « BCA » (Triton) RT-qPCR moles analyte/moles h-G6PDH Vérification sur agarose, purification puis séquençage Courbes d'étalonnage Normalisation/h-G6PDH)	

A : absorbance ; ADNc : ADN complémentaire ; ARNm : ARN messagers ; BCA : acide bicinchoninique ; CV(inter) : covariance inter-manipulations ; CV(intra) : coefficient de variation intra-manipulation ; ELISA : « Enzyme Linked Immunosorbent Assay » ; FISH : Hybridation in situ ; h-G6PDH : glucose-6-phosphate-deshydrogénase humaine ; NA : non applicable ; NASBA : « Nucleic acid sequence-based amplification » ; NP : non précisé ; PPIB : cyclophiline B ; prot. : protéine ; RT-qPCR : « Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction » ; TBP : protéine de liaison au TATA box ; uPA.PAI-1 (sous forme de complexe). a. 1 UI de PAI = quantité qui inhibe 1 UI d'uPA (simple) en 15 min. à température ambiante.

## ANNEXE 7. UPA/PAI-1 / DONNÉES CLINIQUES, MESURES PAR ELISA

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	INTERVENTION	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
<p>Janicke <i>et al.</i> 2001 [20]</p> <p>Chemo N-</p> <p>Essai randomisé</p> <p>Étude prospective déterminant la valeur pronostique du marqueur</p>	Principal suivi : 32 mois	<p>pré et post-ménopausées ≤ 70 ans, N-1 ≤ TS (cm) ≤ 5 ttt conservateur incluant RT ou mastectomie radicale modifiée</p> <p>556 patientes incluses</p>	<p>Bras A : groupe à risque faible (n = 241) : uPA ≤ 3 ng/mg de prot. et PAI-1 ≤ 14 ng/mg de prot.)</p> <p>groupe à haut risque (n = 315) : uPA &gt; 3 ng/mg de prot. et/ou PAI-1 &gt; 14 ng/mg de prot. randomisation : Bras B1 : CMF Bras B2 : observation</p>	<p>Principal : SSR</p> <p>Secondaire : SG</p> <p>OUI</p>	<p>log-rank test univariée et multivariée (Cox)</p> <p>grade histologique ttt locorégional âge, pT, RH</p> <p>NON</p>	<p>Taux de rechute à 3 ans <u>groupe à risque faible versus groupe à risque élevé</u> 6,7 % (95 % IC : 2,5 - 10,8) versus 14,7 % (95 % IC : 8,5 - 20,9) ; (p = 0,006)</p> <p>Première analyse intérimaire <u>bras B1 versus bras B2</u> RR = 0,56 (95 % IC : 0,25 - 1,28)</p> <p>Analyse multivariée (SSR), n = 374 RR (uPA/PAI-1) = 2,83 (95 % IC : 1,3 - 6,0 ; p = 0,007) RR (grade histologique) = 3,33 (95 % IC : 1,7 - 6,8 ; p = 0,001)</p>

\* étudiés en analyse multivariée et/ou univariée ; CMF : cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracile ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'œstrogène et à la progestérone) ; pT : statut T pathologique ; RR : risque relatif ; RT : radiothérapie ; SG : survie globale ; SSR : survie sans récurrence ; TS : taille de la tumeur ; ttt : traitement.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RÉSULTATS
<p><b>Look <i>et al.</i> 2002 [21]</b></p> <p><b>Méta-analyse sur données publiées (11 centres) et non publiées (7 centres)</b></p> <p><b>18 cohortes de 9 pays</b></p>	Principal suivi : 46 à 120 mois	<p>Cancer du sein invasif patientes opérées entre septembre 1978 et décembre 1995 nées entre novembre 1891 et septembre 1969</p> <p>3 % &lt; 35 ans 40 % pré-ménopausées 44 % pT1 56 % N- 45 % ont reçu un traitement adjuvant systémique 35 % de rechute et 27 % de décès à 10 ans</p> <p>8377 patientes incluses</p>	<p>SSR SG</p> <p>OUI</p>	<p>Spearman Wilcoxon Kruskal-Wallis</p> <p>Modèle de Cox stratifié</p> <p><u>Facteurs conventionnels</u> âge, statut ménopausique, TS, grade histologique, RH, statut ganglionnaire</p> <p>OUI</p>	<p>Population globale, après ajustement par variable conventionnelle</p> <p><u>SSR</u> HR (uPA, n = 8157) = 2,58 (95 % IC : 2,24 - 2,97) HR (PAI-1, n = 6682) = 2,58 (95 % IC : 2,24 - 2,97) ; p &lt; 0,001</p> <p><u>SG</u> HR (uPA, n = 8157) = 2,73 (95 % IC : 2,33 - 3,19 ; p &lt; 0,001) HR (PAI-1, n = 6682) = 3,12 (95 % IC : 2,65 - 3,67 ; p &lt; 0,001) (uPA+PAI-1, n = 6480) ; p &lt; 0,001</p> <p>Après stratification par sous-groupes d'atteinte ganglionnaire</p> <p><u>SSR/ tous les N- (n = 3483)</u> HR (uPA) = 3,42 (95 % IC : 2,68 - 4,37; p &lt; 0,001) HR (PAI-1) = 2,87 (95 % IC : 2,28 - 3,60; p &lt; 0,001)</p> <p><u>SSR/N- et ttt adjuvant (n = 2864)</u> HR (uPA) = 3,34 (95 % IC : 2,56 - 4,36; p &lt; 0,001) HR (PAI-1) = 2,77 (95 % IC : 2,17 - 3,55; p &lt; 0,001)</p> <p><u>SSR/tous les N+ (n = 2997)</u> HR (uPA) = 2,10 (95 % IC : 1,72 - 2,56; p &lt; 0,001) HR (PAI-1) = 2,41 (95 % IC : 2,00 - 2,90; p &lt; 0,001)</p> <p>Des résultats similaires ont été observés pour la survie globale.</p>

\* étudiés en analyse multivariée et/ou univariée ; HR : hazard ratio ; 95 % IC : intervalle de confiance à 95 % ; N- : sans envahissement ganglionnaire ; pT : statut T pathologique ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'œstrogène et à la progestérone) ; SG : survie globale ; SSR : survie sans récurrence ; TS : taille de la tumeur.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
Look <i>et al.</i> 2003 [55]  Étude rétrospective, extension de Look <i>et al.</i>	Principal  Suivi : 46 mois à 10 ans	celle de Look <i>et al.</i> 2002  8377 patientes incluses / 7424 évaluées	SSM SSR	multivariée, Cox stratifié (cf. Look <i>et al.</i> 2002)  âge, statut ménopausique, TS, TG, RH, atteinte ganglionnaire, traitement adjuvant  NON	SSM HR (uPA, n = 7226) = 2,95 (95 % IC : 2,50 - 3,48 ; p < 0,001) HR (PAI-1, n = 5732) = 2,77 (95 % IC : 2,34 - 3,29 ; p < 0,001)  uPA+PAI-1, n = 5534 ; p < 0,001
Harbeck <i>et al.</i> 2001 [56]  Étude rétrospective confirmatoire monocentrique	Secondaire avec Cathepsines  Suivi 109 mois	N+ : 53 % TS > 2 cm : 68 % HR+ : 79 % Post-ménopausées : 62 % Mastectomie radicale (n = 214) Chirurgie conservatrice, (n = 62)  276 patientes évaluées	SSR SG  OUI	Spearman Mann-Whitney univariée multivariée (Cox proportionnel)  Cathepsines B, D et L grade histologique  NON	Analyse univariée sans traitement adjuvant / CT / HT : RR (95 % IC) uPA : 2,4 (1,3-4,7 ; p = 0,008) / 2,0 (0,97-3,9 ; p = 0,060) / 1,4 (0,8-2,6 ; p ns) PAI-1 : 4,3 (2,1-8,4 ; p<0,001) / 1,5 (0,8-3,1 ; p ns) / 1,6 (0,8-3,1 ; p ns)  Analyse multivariée Population générale SSR (PAI-1) : RR = 1,7 ; p = 0,027 / SG (PAI-1) : RR = 1,9 ; p < 0,01 SSR (uPA) et SG (uPA) p ns Sous groupe, sans atteinte ganglionnaire (n=130) SSR (PAI-1) : RR = 3,7 ; p = 0,004 / SG(PAI-1) : RR = 3,7 ; p = 0,004 SSR (uPA) et SG (uPA) p ns Sous groupe, avec atteinte ganglionnaire uPA et PAI-1 ne présentent pas de valeur pronostique indépendante

\* étudiés en analyse multivariée et/ou univariée ; CT : chimiothérapie ; HR : hazard ratio ; HT : hormonothérapie ; n : effectif ; N+ ; envahissement ganglionnaire ; ns : non significatif ; SG : survie globale ; SSM : survie sans métastase ; SSR : survie sans récurrence ; TG : grade tumoral ; TS : tailles de la tumeur ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'œstrogène et à la progestérone) ; RR : risque relatif.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES† AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
<b>Konecny <i>et al.</i> 2001 [57]</b>  <b>Étude rétrospective monocentrique</b>	Secondaire avec HER-2/neu  Suivi : 26 mois (SSR) 32 mois (SSM)	TS ≥ 5 : 17,7 % ; N- : 48,2 % ; GN (1-2) : 61,3 % ; Post-ménopausées : 75,8 % ; ER+ : 67,1 % ; PgR+ : 68,1 % ; HER-2/neu+ : 18,2 % ; uPA+ : 24,5 % ; PAI-1+ : 43,4 % ; CT ± HT (N+ et N- à haut risque)  587 patientes évaluées	SSR SSM  OUI	Spearman multivariée (Cox proportionnel)  âge, TS, N, ER, PgR, HER-2, uPA/PAI-1*  NON	Association avec HER-2/neu uPA, r = 0,147 ; p < 0,001 PAI-1, r = 0,07 ; p = 0,085 Taux élevés† HER-2/neu et uPA/PAI-1 sont significativement associés à une SSR réduite (p < 0,001 et p = 0,003) ainsi qu'à une SSM réduite (p = 0,015 et p < 0,001) Analyse multivariée uPA/PAI-1 : facteur indépendant de SSR ; (p = 0,0096) et de SSM (p = 0,0005) SSM <sup>c</sup> ; p = 0,0016 HER-2/neu : facteur indépendant de SSR (p = 0,024) et de SSM (p = 0,025) SSM <sup>c</sup> ; p = 0,064 Effet combiné HER-2/neu et uPA/PAI-1 SSR et SSM (cf. synthèse)
<b>Harbeck <i>et al.</i> 2002 [61]</b>  <b>Etude rétrospective multicentrique (2 centres)</b>	Principal  Suivi 83 mois	N- : 51 % TS (pT1) : 41 %, TS (pT2) : 47 % Tamoxifène : 12,6 % CT (CMF ou protocoles à base d'anthracyclines) : 33,7 % <sup>μ</sup> Tamoxifène+CT : 1,6 %  3424 patientes évaluées	SSR à 5 ans  OUI	multivariée (Cox proportionnel)  ER, PgR, âge, N, pT, CT, HT, RT  NON	Analyse multivariée / population globale uPA/PAI-1 : HR=2,0 (95 % IC : 1,8 - 2,3 ; p < 0,001) Les autres variables analysées étaient significatives à l'exception de la radiothérapie et du statut ER. Interaction uPA/PAI-1 avec la CT/population globale/SSR (N=3376) HR = 0,68 (95 % IC : 0,53 - 0,88 ; p < 0,003) Interaction uPA/PAI-1 avec la CT/NO-3/SSR (N=2592) HR = 0,70 (95 % IC : 0,50 - 0,98 ; p < 0,041) Interaction uPA/PAI-1 avec la CT/N>4/SSR HR = 0,66 (95 % IC : 0,44 - 0,87 ; p = 0,040)

\* analysés en tant qu'une seule variable ; † HER-2/neu surexpression (≥ 400 fmol/mg) et taux élevés uPA/PAI-1 (≥5,5 et/ou ≥14 ng/mg de prot., respectivement) ; ‡ étudiés en analyse multivariée et/ou univariée ; CMF : cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracile ; CT : chimiothérapie ; ER : statut des récepteurs à l'œstrogène ; GN : grade nucléaire ; HT : hormonothérapie ; HR : hazard ratio ; N+ : avec envahissement ganglionnaire ; N- : sans envahissement ganglionnaire ; PgR : statut des récepteurs à la progestérone ; pT : statut T pathologique ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'œstrogène et à la progestérone) ; RT : radiothérapie ; SSM : survie sans métastase ; SSR : survie sans récurrence ; TS : taille de la tumeur.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
Harbeck <i>et al.</i> 2002a [39]  Étude rétrospective monocentrique	Principal  Suivi 60 mois	N- : 51 % TS > 2 cm : 60 % GN (1-2) : 54 % RH+ : 80 % Post-ménopausées : 64 % traitement adjuvant : 62 %  761 patientes évaluées	SSR SG  OUI	Log-rank multivariée (Cox proportionnel et Cox « temps-dépendant »  <u>Analyse 1</u> : TS, grade, RH, statut ménopausique <u>Analyse 2</u> : grade, statut ménopausique, RH, TS <u>Analyse 3</u> : N, TS, grade, HT, CT, RH, statut ménopausique  NON	Analyse multivariée 1 : uPA, PAI-1, SSR RR (uPA) = 2,3 (95 % IC : 1,1 - 4,1 ; p = 0,022) RR (PAI-1) = 2,0 (95 % IC : 1,0 - 4,0 ; p = 0,049)  Analyse multivariée 2 : N-, sans ttt adj. (n = 269) <u>SSR</u> (uPA/PAI-1) : RR = 3,9 (95 % IC : 2,0,- 7,5 ; p < 0,001) <u>SG</u> (uPA/PAI-) : RR = 2,8 (95 % IC : 1,4 - 5,9 ; p = 0,005)  Analyse multivariée 3 : population globale (n = 761) <u>SSR</u> (uPA/PAI-1) : RR = 1,9 (95 % IC : 1,4 - 2,5 ; p < 0,001) <u>SG</u> (uPA/PAI-) : RR = 2,0 (95 % IC : 1,4 - 2,7 ; p < 0,001)  Interaction avec le ttt adj./SSR <u>Sans ttt adj.</u> ; uPA/PAI-1 RR = 4,6 (95 % IC : 2,6 - 8,3 ; p < 0,001) <u>Avec ttt adj.</u> ; uPA/PAI-1 RR = 1,3 (95 % IC : 0,9 - 1,8 ; p = 0,165) <u>CT, uPA/PAI-1</u> : RR = 1,3 (95 % IC : 0,8 - 2,2 ; p = 0,260) <u>HT, uPA/PAI-1</u> : RR = 1,3 (95 % IC : 0,7 - 2,2 ; p = 0,404)  Interaction avec le ttt adj./SG <u>Sans ttt adj.</u> ; uPA/PAI-1 RR = 3,8 (95 % IC : 2,1 - 7,2 ; p < 0,0001) <u>CT, uPA/PAI-1</u> : RR = 2,0 (95 % IC : 1,1 - 3,7 ; p = 0,023) <u>HT, uPA/PAI-1</u> : RR = 1,2 (95 % IC : 0,7 - 2,0 ; p = 0,467)

\* étudiés (analyse multivariée et/ou univariée ; adj : adjuvant ; CT : chimiothérapie ; GN : grade nucléaire ; HT : hormo,othérapie ; 95 % IC : intervalle de confiance à 95 % ; n : nombre de patientes ; N : statut ganglionnaire ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'œstrogène ou à la progestérone) ; RR : risque relatif ; RT : radiothérapie ; SG : survie globale ; SSR : survie sans récurrence ; ttt : traitement ; TS : taille de la tumeur.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
<b>Luqmani <i>et al.</i> 2002 [62]</b>  <b>Étude rétrospective</b>	Secondaire avec t-PA  Suivi 48 mois	44 ans (24-87) ; post-ménopausées (34 %) ; N- (34 %) ; stade clinique 1-2 (70 %), 3-4 (30 %) ; Grade 1-2 (70 %), 3 (30 %) ; pT 1-2 (70 %), 3-4 (30 %)  217 patientes incluses	SSR SG  OUI	Spearman Multivariée (Cox proportionnel)  âge, pT, N, grade (1/2 vs 3/4), stade clinique (1/2 vs 3/4), ER, PgR, PS2, t-PA, uPA, PAI-1  NON	En analyse multivariée, uniquement l'état ganglionnaire et le stade clinique étaient associés de manière statistiquement significative à la survie sans récurrence et la survie globale.
<b>Borstnar <i>et al.</i> 2002 [58]</b>  <b>Étude rétrospective</b>	Secondaire (PAI-1 vs PAI-2)  Suivi 46 mois	Cancer opérable Traitées entre 1994 et 1996 55 ans (22-87) Mastectomie ± RT (100 %) ttt adjuvant (301/332) Post-ménopausées (63 %) N- (44,5 %) TS < 2 cm (30 %) ER+ (60 %) PgR+ (47 %)  332 patientes évaluées	SSR à 4 ans  OUI	Spearman's rank Kruskal-Wallis Univariée (Cox) multivariée (Cox)  Stade UICC, TS, TT, GN, N, RH  NON	Corrélation : r (PAI-1 et PAI-2) = 2,33 ; p < 0,001 Analyse multivariée PAI-1 : HR = 2,78 (95 % IC : 1,67 - 4,62; p < 0,0001) PAI-2 : HR = 2,17 (95 % IC : 1,23 - 3,85 ; p = 0,0075) Effet combiné, PAI-1/ PAI-2 : SSR <u>faible/élevé</u> (n = 33) : 90 % ; RR = 6,11 (95 % IC : 1,9 - 19,5 ; p NP) <u>élevé/faible</u> (n = 122) : 52 % <u>faible/faible</u> (n = 133) : pronostic intermédiaire ; p < 0,0001 <u>élevé/élevé</u> (n = 44) : pronostic intermédiaire ; p < 0,0001 Groupe PAI-1 à taux élevé RR (PAI-2) = 1,82 (95 % IC : 0,98-3,45 ; p = 0,0523) Groupe PAI-1 à taux faible Pas d'impact de PAI-2 sur le risque de récurrence ; p = 0,2706

\* étudiés (analyse multivariée et/ou univariée ; ER : récepteurs à l'oestrogène ; GN: grade nucléaire; HR : hazard ratio ; 95 % IC : intervalle de confiance à 95 % ; N : statut ganglionnaire ; n : nombres de patientes ; NP : non précisé ; PgR : récepteurs à la progestérone ; pT : statut T pathologique ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'oestrogène ou à la progestéron) ; RR : risque relatif ; SG : survie globale ; SSR : survie sans récurrence ; TT : type de tumeur ; t-PA : « tissue type plasminogen activator » ; ttt : traitement ; TS : taille de la tumeur.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
<b>Borstnar <i>et al.</i> 2002a [59]</b>  <b>Étude rétrospective</b>	Secondaire (uPA, PAI-1, PAI-2, uPAR)  Suivi: 33 mois (1-46)	Cancer opérable 57 ans (26-83) Mastectomie (n = 297) Chirurgie conservatrice±RT (n = 163) ttt adjuvant (n = 408) Post-ménopausées (n = 304) N- (n = 214) TS < 2 cm (n = 121) RH+ <sup>c</sup> (n = 338)  460 patientes évaluées	SSR à 3ans  OUI	Spearman's rank Kruskal-Wallis Univariée (Cox) multivariée (Cox)  Statut ménopausique, TS, TT, GN, N, RH, invasion tumorale des vaisseaux  NON	Analyse multivariée PAI-1 : HR = 2,08 (95 % IC : 1,26 - 3,42 ; p = 0,0041) PAI-2 : HR = 1,72 (95 % IC : 0,99 - 3,03 ; p = 0,0538) uPA et uPAR perdent leur valeur pronostique  Effet combiné, PAI-1/ PAI-2 : SSR faible/élevé (n = 48) : 91 % élevé/faible (n = 135) : 68 % <u>faible/faible</u> ou <u>élevé/élevé</u> (n = 252) :81 % ; p < 0,0002
<b>Hansen <i>et al.</i> 2003 [67]</b>  <b>Étude rétrospective</b>	Secondaire (angiogénèse)  Suivi 12 ans	Age > 60 ans (55 %), post-ménopausées (70 %), TS ≤ 2 cm (38 %), grade-3/canalaire (32 %), HR+ (76 %), N- (44 %) Mastectomie ± RT, ttt adj. (n = 104)  228 patientes évaluées	SSR SG  OUI	Spearman Kruskal-Wallis Multivariée (Cox proportionnel)  Statut ménopausique, TS, grade, N, angiogénèse (Chalkley)  stratification par statut ER	Analyse multivariée / SSR PAI-1 : HR = 1,7 (95 % IC : 1,02 - 2,72 ; p = 0,040) uPA : HR = 1,3 (95 % IC : 0,79 - 2,01 ; p = 0,33) N (p < 0,0001), TS (p = 0,015) Analyse multivariée / SG PAI-1 : HR = 1,3 (95 % IC : 0,83 - 1,92 ; p = 0,28) uPA : HR = 1,1 (95 % IC : 0,74 - 1,67 ; p = 0,60) Chalkley (p<0,0001), statut ménopausique (p = 0,003)

\* étudiés (analyse multivariée et/ou univariée ; adj. Adjuvant; ER : récepteurs à l'oestrogène ; GN: grade nucléaire; HR : hazard ratio ; 95 % IC : intervalle de confiance à 95 % ; N : statut ganglionnaire ; n : nombre de patientes ; NP : non précisé ; PgR : récepteurs à la progestérone ; pT : statut T pathologique ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'oestrogène ou à la progestérone) ; SG : survie globale ; SSR : survie sans récidence ; TT : type de tumeur ; ttt : traitement ; TS : taille de la tumeur.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
Hansen <i>et al.</i> 2003 [65]  Étude prospective	Principal  Suivi : 33 mois	Mastectomie ou chirurgie conservatrice±RT ; Post-ménopausées (66 %) ; TS pathologique ≥ 2 cm (72 %) ; TT pathologique/UICC-WHO : canalaire (86,5 %), lobulaire (8 %) ; Grade SBR : I (11,5 %), II (37 %), III (49,5 %) ; N- (46,5 %) ; RH <sup>a</sup> (73,5 %) ; invasion tumorale des vaisseaux (30 %) ; CT (34 %), HT (31 % dont 95 % tamoxifène), CT-HT (24 %) ; uPA < 3 ng/mg (26 %) ; PAI-1 < 14 ng/mg (69 %)  460 patientes évaluées	SSR  OUI	Spearman  Kruskal-Wallis Multivariée (Cox proportionnel)  TS pathologique, TT pathologique, grade, N, RH, invasion tumorale des vaisseaux, PAI-2  NON	Analyse multivariée / population globale PAI-1 : RR = 1,81 (95 % IC : 1,1 - 2,99 ; p = 0,020) le plus significatif après l'envahissement ganglionnaire (p < 0,001) uPA : non significatif  Analyse univariée / sans ttt adj. (n = 52 ; 7 rechutes) PAI-1 : HR = 2,14 (95 % IC / 0,48 - 9,56 ; p = 0,321) uPA : HR = 1,37 (95 % IC : 0,27 - 7,1 ; p = 0,71) uPA/PAI-1 : HR = 0,30 (95 % IC : 0,48 - 9,56 ; p = 0,321)  Analyse univariée / HT (n = 141, 13 rechutes) PAI-1 : HR = 0,26 (95 % IC : 0,03 - 2,06 ; p = 0,204) uPA : HR = 0,79 (95 % IC : 0,24 - 2,56 ; p = 0,0693) uPA/PAI-1 : HR = 0,30 (95 % IC : 0,04 - 2,34 ; p = 0,250)  Analyse univariée / CT (n = 156 ; 43 rechutes) PAI-1 : HR = 2,48 (95 % IC : 1,35 - 4,57 ; p = 0,003) uPA : HR = 1,44 (95 % IC : 0,64 - 3,25 ; p = 0,381) uPA/PAI-1 : HR = 2,25 (95 % IC : 1,22 - 4,13 ; p = 0,009)

<sup>a</sup> seuil de 15 fmol/mg de protéine, technique EIA, anticorps monoclonal (Abbott, USA), laboratoire participant à des programmes de contrôle de qualité de l'EORTC [126] ;  
\* étudiés en analyse multivariée et/ou univariée ; CT: chimiothérapie; ER : récepteurs à l'oestrogène ; HR : hazard ratio ; HT: hormothérapie; 95 % IC : intervalle de confiance à 95 % ; N : statut ganglionnaire ; n : nombres de patientes ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'oestrogène ou à la progestérone) ; RR : risque relatif ; SBR : classification *Scarff Bloom Richardson* ; SSR : survie sans récurrence ; TT : type de tumeur ; TS : taille de la tumeur.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
<b>Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64]</b>  <b>Étude rétrospective</b>	Secondaire avec c-erbB-2  Suivi 10 ans	<p>âge &gt; 50 ans (75,6 %) ; TS clinique &gt; 2,5 cm (62,9 %) ; TS pathologique &gt; 2 cm (57,6 %) ; Grade SBR: I (9,6 %) - II (62,3 %) - III (28,1 %) ; N- (46,3 %) ; ER<sup>+</sup><sup>a</sup> (74,0 %) ; PgR<sup>+</sup><sup>a</sup> (57,6 %) ; uPA &lt; 1,40 ng/mg prot. (75,0 %) ; PAI-1 &lt; 5,53 ng/mg prot. (75,0 %) ; c-erbB-2 &lt; 300 UI/mg prot. (74,6 %)</p> <p>488 patientes évaluées</p>	<p>SSR<sup>b</sup> SS  OUI</p>	<p>Wilcoxon's rank Kruskal-Wallis Spearman Multivariée (Cox proportionnel)</p> <p>âge, N, TS clinique, TS pathologique, grade SBR, ER, PgR, c-erbB-2</p> <p>OUI / facteurs pronostiques conventionnels</p>	<p>SSR / <u>analyse multivariée / population globale</u> PAI-1 : RR = 2,02 (95 % IC : 1,47 - 2,77 ; p = 0,00001) avant N+ &gt; 3 (p = 0,0006) et le TS clinique (p = 0,007) <u>analyse multivariée / sous-groupe N-</u> (n = 226) PAI-1 : RR = 2,39 (95 % IC : 1,47 - 3,89 ; p = 0,0005) avant le TS clinique (p = 0,04) <u>analyse multivariée / sous-groupe N+</u> (n = 262) uPA : RR = 1,75 (95 % IC : 1,16 - 2,64 ; p = 0,007) après le grade SBR (p = 0,003) <u>analyse multivariée / sous-groupe tamoxifène</u> (n = 199) PAI-1 : RR = 1,98 (95 % IC : 1,21 - 3,24 ; p = 0,007) après l'état ganglionnaire (p = 0,003) et avant le statut ER (p = 0,02) SS / <u>analyse multivariée / population globale</u> N (p = 0,00004) ; TS clinique (p = 0,02) ; Grade SBR (p = 0,03) ; c-erbB-2 : RR = 1,57 (95 % IC : 1,07 - 2,30 ; p = 0,02) ; PAI-1 : RR = 1,56 (95 % IC : 1,07 - 2,28 ; p = 0,02) ; uPA : RR = 1,54 (95 % IC : 1,06 - 2,24 ; p = 0,03) <u>analyse multivariée / Sous-groupe N-</u> (n = 226) PAI-1 : RR = 2,52 (95 % IC : 1,35 - 4,70 ; p = 0,003) uPA : RR = 2,00 (95 % IC : 1,07 - 3,74 ; p = 0,03) <u>analyse multivariée / Sous-groupe N+</u> (n=262) Grade SBR (p = 0,004) ; TS clinique (p=0,02) ; c-erbB-2 : RR = 1,73 (95 % IC : 1,08 - 2,77 ; p = 0,02) ; uPA : RR = 1,68 (95 % IC : 1,05 - 2,71 ; p = 0,03) <u>analyse multivariée / Sous-groupe tamoxifène</u> (n = 199) N (p = 0,00001) ; ER (p = 0,002)</p>

<sup>a</sup> seuil de 15 fmol/mg de protéine, technique EIA, anticorps monoclonal (Abbott, USA), laboratoire participant à des programmes de contrôle de qualité de l'EORTC [126] ;  
<sup>b</sup> temps depuis le diagnostic à la première rechute locale et/ou aux métastases à distance ; \* étudiés en analyse multivariée et/ou univariée ; ER : récepteurs à l'oestrogène ; 95 % IC : intervalle de confiance à 95 % ; N : statut ganglionnaire ; n : nombres de patientes ; PgR : récepteurs à la progestérone ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'oestrogène ou à la progestérone) ; RR : risque relatif ; SBR : classification *Scarff Bloom Richardson* ; SS : survie spécifique du cancer du sein ; SSR : survie sans récurrence ; TS : taille de la tumeur.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
<b>Dazzi <i>et al.</i> 2003 [66]</b>  <b>Étude prospective</b>	Secondaire (VEGF, angiogénèse)  Suivi 38 mois	Mastectomie ou chirurgie conservatrice, 62 ans, N- (40/81), ER+ (49/81), PgR+ (43/81), ttt adj. (71/81), grade-3 (46/81)  81 incluses / 78 évaluées	SSR  OUI	Spearman  VEGF, CD34, ER, PgR, grade, TS, N  NA	Corrélation uPA/PAI-1 : r = 0,61 ; p < 0,0001 PAI-1 élevé et G3 : p = 0,009 uPA élevé et TS > 1 cm : p = 0,04 uPA faible au diagnostic et SSR améliorée ; p = 0,008 PAI-1 faible au diagnostic et SSR améliorée ; p ns
<b>Zemzoum <i>et al.</i> 2003 [68]</b>  <b>Étude prospective monocentrique</b>	Principal  Suivi 10 ans	55 ans, N-, sans ttt adj. Mastectomie radicale (n = 74) ou chirurgie conservatrice±RT (n=44) pT1(46,6 %), pT2 (51,7 %), HR+(80,5 %), grade-3 (27,4 %), post-ménopausées (60,2 %), HER-2/FISH+ <sup>d</sup> (33,3 %), HER-2/IHC+ <sup>e</sup> (44,2 %)  118 incluses	SSR SG  OUI	Multivariée (Cox proportionnel)  HER-2/FISH, HER-2/IHC, pT, grade, RH, statut ménopausique  NON	Analyse multivariée / SSR (N=73) HER-2/FISH : RR = 1,9 (95 % IC : 0,8 - 4,3 ; p = 0,139) HER-2/IHC : RR = 1,1 (95 % IC : 0,6 - 2,3 ; p = 0,74) uPA/PAI-1 : RR = 5,4 (95 % IC : 1,9 - 14,8 ; p = 0,001)  Analyse multivariée / SG (N=71) HER-2/FISH : RR = 3,7 (95 % IC : 1,5 - 9,2 ; p = 0,004) HER-2/IHC : RR = 3,4 (95 % IC : 1,4 - 8,7 ; p = 0,009) uPA/PAI-1 : p ns
<b>Meo <i>et al.</i> 2004 [69]</b>  <b>Étude rétrospective</b>	Secondaire (avec VEGF)  Suivi 65 mois	N-, sans ttt adj., 60 ans, post-ménopausées (70,4 %), pT1 (57,1 %), ER+ (77 %), PgR+ (71,4 %)  196 incluses dont 23,5 % de rechute 176 évaluées (uPA) 178 évaluées (PAI-1)	SSR  OUI	Spearman Multivariée (Cox proportionnel)  pT, interaction (uPA/PAI-1) TS, RH, grade  NON	Corrélation uPA versus PAI-1 ; p < 0,001  Analyse multivariée pT : p = 0,0057 PAI-1 : p = 0,0063

<sup>d</sup> les tumeurs sont considérées amplifiées en termes de HER-2-neu lorsqu'au moins 20 cellules présentent au moins 5 signaux / cellule ; <sup>e</sup> les tumeurs sont considérées positives lorsque plus de 2,5 % des cellules sont positives ; \* étudiés en analyse multivariée et/ou univariée ; ER : récepteurs à l'oestrogène ; FISH: florescent *in situ* hybridization ; 95 % IC : intervalle de confiance à 95 % ; IHC: immunohistochimie ; N : statut ganglionnaire ; n : nombres de patientes ; na : non applicable ; ns : non statistiquement significatif ; PgR : récepteurs à la progestérone ; pT : statut T pathologique ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'oestrogène ou à la progestérone) ; RR : risque relatif ; SBR : classification *Scarff Bloom Richardson* ; SG : survie globale ; SSR : survie sans récidence ; TS : taille de la tumeur.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
Descote <i>et al.</i> 2008 [72]  Étude prospective	Principal (PAI-1)  Suivi 51 mois	56 ans ; post-ménopausées(68,7 %) ; pT1(59,5 %) ; lobulaire(12,8 %), canalaire(n = 615, 84 %) ; N-(57 %) ; grade-SBR-canalaire-1(24 %) ; ER+(77 %) ; PgR+(72,5 %) ; HER-2+(22 %) ; TP53 muté(25 %) ; HT(40,8 %) ; CT(9,2 %) ; HT+CT(35,3 %) ; RT(100 %)  732 patientes incluses PAI-1 : 732 patientes évaluables uPA : 712 patientes évaluables	SSMd  OUI	Univariée Multivariée (Cox proportionnel)  <u>Modèle de base :</u> N, TS, grade SBR, ER  Oui (âge, centre)	Multivariée/population globale/canalaire (n = 587) <u>Modèle de base + log uPA</u> HR (uPA) = 1,6 (95 % IC : 0,7 - 3,4 ; p = 0,232) <u>Modèle de base + PAI-1</u> HR (PAI-1) = 2,4 (95 % IC : 1,4 - 4 ; p < 0,001) <u>Modèle de base + log uPA + PAI-1</u> HR (uPA) = 1 (95 % IC : 0,4 - 2,3 ; p = 0,957) HR (PAI-1) = 2,4 (95 % IC : 1,4 - 4,1 ; p = 0,002) Multivariée/sous-groupe N-/canalaire (n = 329) <u>Modèle de base + log uPA</u> HR (uPA) = 1,5 (95 % IC : 0,5 - 4,6 ; p = 0,499) <u>Modèle de base + PAI-1</u> HR (PAI-1) = 3,3 (95 % IC : 1,6 - 6,8 ; p = 0,002) <u>Modèle de base + log uPA + PAI-1</u> HR (uPA) = 1 (95 % IC : 0,3 - 3 ; p = 0,936) HR (PAI-1) = 3,2 (95 % IC : 1,5 - 6,9 ; p = 0,003) Multivariée/sous-groupe N+/canalaire (n = 258) <u>Modèle de base + log uPA</u> HR (uPA) = 1,8 (95 % IC : 0,6 - 5,4 ; p = 0,256) <u>Modèle de base + PAI-1</u> HR (PAI-1) = 1,8 (95 % IC : 0,9 - 3,6 ; p = 0,12) <u>Modèle de base + log uPA + PAI-1</u> HR (uPA) = 1,3 (95 % IC : 0,4 - 4,5 ; p = 0,689) HR (PAI-1) = 1,6 (95 % IC : 0,7 - 3,7 ; p = 0,262)

\* étudiés (analyse multivariée et/ou univariée ; ER : récepteurs à l'oestrogène ; FISH: florescent *in situ* hybridization ; HT: hormo,othérapie; HR: hazard ratio; 95 % IC : intervalle de confiance à 95 % ; IHC: immunohistochimie ; N : statut ganglionnaire ; n : nombres de patientes ; na : non applicable ; ns : non statistiquement significatif ; PgR : récepteurs à la progestérone ; pT : statut T pathologique ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'oestrogène ou à la progestérone) ; RR : risque relatif ; RT : radiothérapie ; SBR : classification *Scarff Bloom Richardson* ; SSMd : survie sans métastases à distance ; SSR : survie sans récive ; TS : taille de la tumeur.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
<b>Offersen <i>et al.</i> 2008 [73]</b>  <b>DBCG</b> <b>Étude rétrospective</b>	Secondaire (PAI-1, HER-2, TP53, angiogenèse, prolifération)  > 10 ans	57 ans ; T1(37 %), T2(55 %) ; post-ménopausées (68 %) ; canalaire(86 %) ; grade-I (22 %), grade-II (41 %) ; ER+(71 %) ; N-(47 %) ; RT (100 %) ; ttt systémique (selon [127])  408 patientes incluses et évaluées 401 patientes évaluées (prolifération) 41 % décès	SS à 10 ans  OUI	Spearman Univariée Multivariée (Cox proportionnel)  âge, statut ménopausique, TS, GH, ER, N, angiogenèse, prolifération, HER-2, TP53  NON	Corrélation de PAI-1 significative avec : <u>Population globale</u> : GH (p < 0,0001), ER (p < 0,0001), prolifération (p = 0,002), TP53 (p = 0,003) <u>Population N-</u> : GH (p = 0,001), ER (p=0,002), angiogenèse (p = 0,03), prolifération (p = 0,04), TP53 (p = 0,005) <u>Population N+</u> : GH (p = 0,01), ER (p = 0,02) Analyse multivariée <u>Population globale</u> : RR (PAI-1) = 1,04 (95 % IC : 1,01 - 1,07 ; p = 0,009) GH (p = 0,04) ; N- vs N 1-3 (p = 0,04) ; N- vs >3 (p < 0,0001) ; HER-2 (p < 0,0001) ; TP53 (p < 0,002) <u>Population N-</u> : RR (PAI-1) = 1,06 (95 % IC : 1,03 - 1,09 ; p < 0,0001) HER-2 (p = 0,001) ; TP53 (p = 0,006) <u>Population N+</u> : RR (PAI-1) = 0,90 (95 % IC : 0,80 - 1,01 ; p = 0,07) GH canalaire I vs II (p = 0,05) ; GH canalaire I vs III (p = 0,03) ; HER-2 (p = 0,006) ; TP53 (p = 0,008)

\* étudiés (analyse multivariée et/ou univariée ; ER : récepteurs à l'oestrogène ; GH : grade histologique ; 95 % IC : intervalle de confiance à 95 % ; N : statut ganglionnaire ; n : nombres de patientes ; RH : statut des récepteurs hormonaux (à l'oestrogène ou à la progestérone) ; RR : risque relatif ; RT : radiothérapie ; SS : survie spécifique du cancer du sein ; TS : taille de la tumeur.

## ANNEXE 8. UPA/PAI-1 / DONNÉES CLINIQUES, MESURES PAR RT-PCR

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
<p><b>Spyratos <i>et al.</i> 2002 [63]</b></p> <p>Étude rétrospective monocentrique exploratoire</p>	<p>Principal</p> <p>Suivi 8,1 ans</p>	<p>âge &gt; 50 ans : 39/130 pT &gt; 3 cm : 34/130 GH-I (SBR) : 17/130 N- : 49/130 ; ER+<sup>a</sup> : 89/130 ; PgR+<sup>a</sup> : 77/130</p> <p>130 patientes évaluées par RT-PCR 21 patientes évaluées par RT-PCR et ELISA</p>	<p>SSR</p> <p>OUI</p>	<p>Univariée et multivariée (Cox proportionnel)</p> <p>VC : âge, TS, GH (SBR), N, ER, PgR</p> <p>NON</p>	<p>Corrélation ARNm et taux protéiques uPA : r = 0,35 ; p = 0,12 PAI-1 : r = 0,56 ; p = 0,008</p> <p>Analyse multivariée/modèle VC + uPA/ARNm <u>uPA/ARNm (intermédiaire et élevé vs faible)</u> RR = 2,01 (95 % IC : 1,04 - 3,88 ; p = 0,03) <u>statut ganglionnaire (1-3 vs 0)</u> RR = 1,49 (95 % IC : 1,01 - 2,20 ; p = 0,04) <u>statut ganglionnaire (&gt;3 vs 0)</u> RR = 2,23 (95 % IC : 1,03 - 4,83 ; p = 0,04)</p> <p>Analyse multivariée/modèle VC + PA-1/ARNm <u>PAI-1/ARNm (intermédiaire et élevé vs faible)</u> RR = 2,14 (95 % IC : 1,03 - 4,43 ; p = 0,04)</p>
<p><b>Castello <i>et al.</i> 2002 [60]</b></p> <p>Série de cas</p>	<p>Secondaire (uPA/PAI-1/TIMP-1)</p>	<p>58 ans ; canalaire (n = 44) ; pTNM-1 (n = 20) ; pTNM-2 (n = 21) ; pTNM-3 (n = 13) ; N- (n = 30) ; N+ (n = 24)</p> <p>54 patientes évaluées</p>	<p>Agressivité de la tumeur (grade I, IIA et IIB)</p> <p>NON</p>	<p>Pearson</p> <p>Régression linéaire multiple</p> <p>NA</p> <p>NA</p>	<p>Corrélation avec l'agressivité de la tumeur PAI-1/ARNm : r = 0,29 ; p &lt; 0,05 uPA/ARNm : r = 0,29 ; p &lt; 0,05 PAI-1/antigène : r = 0,57 ; p &lt; 0,001 uPA/antigène : r = 0,49 ; p &lt; 0,005 uPA/fonctionnel : r = 0,27 ; p &lt; 0,05</p> <p>Corrélation uPA/PAI-1 (ARNm vs antigène) Positive mais non significative</p>

\* étudiés en analyse multivariée et/ou univariée ; ER: récepteurs à l'oestrogène; GH : grade histologique ; n nombre de patientes ; N : statut ganglionnaire ; NA : non applicable ; PgR : récepteur à la progestérone; pT : statut T pathologique; RR: risque relatif ; SBR : classification *Scarff Bloom Richardson* ; SSR : survie sans récurrence ; TS : taille de la tumeur ; VC : variables classiques.

REFERENCE	OBJECTIF DU MARQUEUR SUIVI (MEDIANE)	POPULATION EFFECTIF	CRITERES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISES ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RESULTAT	RESULTATS
Leissner <i>et al.</i> 2006 [70]  Étude rétrospective monocentrique	Principal  79 mois	54 ans ; ER+ <sup>a</sup> (96 %) ; PgR+ <sup>a</sup> (92 %) ; N+ (100 %) ; Biopsies chirurgicales obtenues avant toute thérapie (RT ; CT adj. ; HT) ; canalaire (90 %) ; SBR I (14 %) ; SBR II (54 %) ; TS1 (13 %) ; TS2 (72 %)  87 incluses dont 30 rechutes distantes et 22 décès du cancer du sein	SSMd SSCS  OUI	Univariée et multivariée (Cox proportionnel)  TS, N, âge, type histologique, GH  NON	Analyse univariée PAI-1 élevé ; SSM et SSCS réduite (p < 0,0001) uPA faible non associé avec SSM augmentée (p = 0,41) ni à SSCS (p = 0,19) Analyse multivariée/SSM PAI-1 : HR = 10,12 (95 % IC : 3,03 - 33,76 ; p = 0,0002) uPA : HR = 1,31 (95 % IC : 0,44 - 3,93 ; p = 0,62) TS (p = 0,01) et âge (p = 0,04) Analyse multivariée/SSCS PAI-1 : HR = 13,17 (95 % IC : 3,26 - 53,17 ; p = 0,0003) uPA : HR = 2,57 (95 % IC : 0,74 - 8,9 ; p = 0,13) TS (p = 0,05) et âge (p = 0,04)
Biermann <i>et al.</i> 2008 [71]  Série de cas	Principal  NA	Cohorte 1/extrats cytosoliques/ 107 incluses 58 ans; RT(64,8 %) ; N+(41,9 %)  Cohorte 2 /extrats membranaires/ 74 incluses	NA  NA	Spearman  Cohorte 1 Statut ménopausique, N, TS, grade, ER, PgR, âge  NA	Corrélation ELISA (cytosoles) / RT-qPCR r(uPA)=0,35 ; p < 0,001 r(PAI-1)=0,20 ; p = 0,045 Corrélation ELISA (Triton) / RT-qPCR r(uPA) = 0,48 ; p<0,001 r(PAI-1) = 0,06 ; p = 0,613 Différences significatives des taux ARNm uPA : N (p = 0,020) PAI-1 : aucune variable Différences significatives des taux protéiques uPA : ER (p = 0,015) PAI-1 : ER (p = 0,009) ; PgR (p = 0,001)

<sup>a</sup> seuil de 15 fmol/mg de protéine, technique EIA, anticorps monoclonal (Abbott, USA), laboratoire participant à des programmes de contrôle de qualité de l'EORTC [126] ;  
\* étudiés en analyse multivariée et/ou univariée ; ER : récepteurs à l'oestrogène ; GH : grade histologique ; HR : hazard ratio ; n nombre de patientes ; N : statut ganglionnaire ; NA : non applicable ; PgR : récepteur à la progestérone ; pT : statut T pathologique ; RR: risque relatif ; SBR : classification *Scarff Bloom Richardson* ; SSCS: survie spécifique du cancer du sein ; SSMd : survie sans métastases à distance ; TS : taille de la tumeur.

## ANNEXE 9. UPA/PAI1 : CONCLUSION

TABLEAU 22. uPA/PAI1 - Valeur pronostique, mesures par ELISA - synthèse des résultats

	POPULATION	SSR	SSM	SG	SS
<b>uPA</b>	Globale	Dazzi <i>et al.</i> 2003 [66] Luqmani <i>et al.</i> 2002 [62]*, Cufer <i>et al.</i> 2003 [65]*, Hansen <i>et al.</i> 2003 [67]*, Konecny <i>et al.</i> 2001 [57]*	Look <i>et al.</i> 2003 [55] Descote <i>et al.</i> 2008 [72]*, Konecny <i>et al.</i> 2001 [57]	Luqmani <i>et al.</i> 2002 [62]*, Hansen <i>et al.</i> 2003 [67]*	Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64]*
	N-	Meo <i>et al.</i> 2004 (MEO2004) Look <i>et al.</i> 2002 [21]	Descote <i>et al.</i> 2008 [72]*,	Look <i>et al.</i> 2002 [21]	Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64]*
	N+	Look <i>et al.</i> 2002 [21]		Look <i>et al.</i> 2002 [21]	Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64]*
<b>PAI-1</b>	Globale	Harbeck <i>et al.</i> 2001 [56] HANSEN2003, Cufer <i>et al.</i> 2003 [65] Borstnar <i>et al.</i> 2002 [58] Borstnar <i>et al.</i> 2002a BORSTNAR2002A Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64] Dazzi <i>et al.</i> 2003 [66]* Luqmani <i>et al.</i> 2002 [62]*, Konecny <i>et al.</i> 2001 [57]*	Look <i>et al.</i> 2003 [55] Descote <i>et al.</i> 2008 [72] Konecny <i>et al.</i> 2001 [57]*	Harbeck <i>et al.</i> 2001 [56] Hansen <i>et al.</i> 2003 [67]*, Luqmani <i>et al.</i> 2002 [62]*,	Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64]* Offersen <i>et al.</i> 2008 [73]*
	N-	Harbeck <i>et al.</i> 2001 [56], Look <i>et al.</i> 2002 [21] Meo <i>et al.</i> 2004 [69], Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64]	Descote <i>et al.</i> 2008 [72]	Harbeck <i>et al.</i> 2001 [56], Look <i>et al.</i> 2002 [21]	Offersen <i>et al.</i> 2008 [73] Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64]
	N+	Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64] Look <i>et al.</i> 2002 [21]		Look <i>et al.</i> 2002 [21]	Offersen <i>et al.</i> 2008 [73]* Bouchet <i>et al.</i> 2003 [64]*
<b>uPA et/ou PAI-1</b>	Globale	Harbeck <i>et al.</i> 2002 [39] Konecny <i>et al.</i> 2001 [57] Look <i>et al.</i> 2002 [21]	DESCOTES2008 KONECNY2001 Look <i>et al.</i> 2003 [55]	Harbeck <i>et al.</i> 2002 [39] Look <i>et al.</i> 2002 [21]	
	N-	Meo <i>et al.</i> 2004 [69], Harbeck <i>et al.</i> 2002 [39] Zemzoum <i>et al.</i> 2003 [68], Look <i>et al.</i> 2002 [21], Janicke <i>et al.</i> 2001 [20]	Descote <i>et al.</i> 2008 [72]	Harbeck <i>et al.</i> 2002 [39] Look <i>et al.</i> 2002 [21] Zemzoum <i>et al.</i> 2003 [68]*	
	N+	Look <i>et al.</i> 2002 [21]		Look <i>et al.</i> 2002 [21]	

\* études dont les résultats sont négatifs pour le marqueur et pour la population considérés ; N+ : avec envahissement ganglionnaire ; N- : sans envahissement ganglionnaire ; SSR : survie sans récidive ; SG : survie globale ; SSM : survie sans métastases ; SS : survie spécifique du cancer du sein.

**TABLEAU 23.** uPA/PAI1 - Valeur pronostique, mesures par RT-PCR - synthèse des résultats

	POPULATION	SSR	SSM	SG	SS
<b>uPA</b>	Globale	Spyratos <i>et al.</i> 2002 [63]	Urban <i>et al.</i> 2006 [128]		
	N-				
	N+		Leissner <i>et al.</i> 2006 [70]*		Leissner <i>et al.</i> 2006 [70]
<b>PAI-1</b>	Globale	Spyratos <i>et al.</i> 2002 [63]			
	N-				
	N+		Leissner <i>et al.</i> 2006 [70]		Leissner <i>et al.</i> 2006 [70]
<b>uPA/PAI-1</b>	Globale				
	N-				
	N+				

\* études dont les résultats sont négatifs pour le marqueur et pour la population considérés ; N+ : avec envahissement ganglionnaire ; N- : sans envahissement ganglionnaire ; SSR : survie sans récidive ; SG : survie globale ; SSM : survie sans métastases ; SS : survie spécifique du cancer du sein.

**TABLEAU 24.** uPA/PAI1 - Valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie (CMF) - synthèse des résultats

	POPULATION	SSR	SSM	SG	SS
<b>uPA</b>	Globale				
	N-				
	N+				
<b>PAI-1</b>	Globale				
	N-				
	N+				
<b>uPA/PAI-1</b>	Globale	Harbeck <i>et al.</i> 2002a [61]			
	N-	Janicke <i>et al.</i> 2001 [20] Harbeck <i>et al.</i> 2002 [39] Harbeck <i>et al.</i> 2002a [61]			
	N+				

N+ : avec envahissement ganglionnaire ; N- : sans envahissement ganglionnaire ; SSR : survie sans récidive ; SG : survie globale ; SSM : survie sans métastases ; SS : survie spécifique du cancer du sein.

## ANNEXE 10. ONCOTYPE DX™ / DONNÉES ANALYTIQUES COMMUNES A TOUTES LES ÉTUDES

TECHNIQUE	APPARTENANCE	ÉCHANTILLON SOURCE	CONDITION DE RECUEIL	CONSERVATION	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	LECTURE DES RÉSULTATS	SEUIL
RT-PCR selon la méthode décrite par Cronin <i>et al.</i> 2004 [80]	Transcriptome	Solide-entier, échantillon fixé, coupes histologiques	Traçabilité de collecte et de stockage décrite	Fixation histologique Type et durée de fixation non précisés	RS ou « Recurrence Score » de 1 à 100	Quantitative, automatisée, chiffrée, discontinue, algorithme décrit par Paik <i>et al.</i> 2004 [83]	RS < 18 : risque faible 18 ≤ RS < 31 : risque intermédiaire RS ≥ 31 : risque élevé

RT-PCR : Real time - Polymerase chain reaction ; RS : Recurrence score.

## ANNEXE 11. ONCOTYPE DX™ / DONNÉES ANALYTIQUES DISPONIBLES PAR ÉTUDE

RÉFÉRENCE	CONDITIONS DE MISE EN ŒUVRE	SENSIBILITÉ DE LA TECHNIQUE	REPRODUCTIBILITÉ DE LA TECHNIQUE	ÉTALONNAGE EXTERNE	CONTROLE QUALITÉ
Paik <i>et al.</i> 2004 [83]	Triple mesure de chaque gène	NP	intra-coupe et inter-coupes variabilité de la performance du RS en fonction de la variation de la détermination du grade inter-pathologistes	étalonnage interne 5 gènes de référence	Contrôle de la pureté des ARN extraits
Esteva <i>et al.</i> 2005 [85]	Par Genomic Health	NP	triple mesure	étalonnage interne 5 gènes de référence	cf. Cronin <i>et al.</i> [80]
Cobleight <i>et al.</i> 2005 [84]	Contrôle de la pureté de l'ARN extrait	NP	NP		
Paik <i>et al.</i> 2006 [87]	Quantification de l'expression des gènes par Genomic Health Extraction des ARN : NP	voir CRONIN2004	voir CRONIN2004	Par Genomic Health	Par Genomic Health
Habel <i>et al.</i> 2006 [86]	NP	NP	NP	NP	Contrôle de la pureté des ARN extraits
Badve <i>et al.</i> 2008 [89]	Cf. CRONIN2007	non définie	Celle de CRONIN2007	étalonnage interne 5 gènes de référence	NP
Wolf <i>et al.</i> 2008 [91]	NP	non définie	non définie	NON	Non
Goldstein <i>et al.</i> 2008 [92]	NP	NP	NP	étalonnage interne 5 gènes de référence	Contrôle de la pureté des ARN extraits

NP : non précisé; SOP : *Standard operating procedures* du laboratoire.

## ANNEXE 12. ONCOTYPE DX™ / DONNÉES CLINIQUES DISPONIBLES PAR ÉTUDE

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF  SUIVI	POPULATION	CRITÈRES DE JUGEMENT  SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	TYPE D'ANALYSE  FACTEURS PRONOSTIQUES*  AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	RÉSULTATS
Paik <i>et al.</i> 2004 [83]  Validation et développement du test Étude rétrospective	Principal  NP	Du NSABP-B14 < 50 ans (29 %), 50-60 (26 %), > 60 (45 %) N- (100 %), ER+ (100 %) tamoxifène (100 %) CT (0 %) TS < 2 cm (62 %)  2617 incluses 675 évaluable 668 évaluées	<u>principal</u> : SSMD à 10 ans  <u>secondaires</u> : intervalle sans rechute (locale et régionale) sur 10 ans SG à 10 ans  OUI	multivariée : modèle de Cox proportionnel  âge, TS, TG ER / PgR HER-2 (ADN)  NON	Analyse multivariée 1 (métastases à distance) <u>âge</u> : HR = 0,71 (95 % IC : 0,48 - 1,05; p = 0,08) <u>TS</u> : HR = 1,26 (95 % IC : 0,86 - 1,86; p = 0,23) <u>RS</u> : HR = 3,21 (95 % IC : 2,23 - 4,16; p < 0,001)  Analyse multivariée 2 (métastases à distance) <u>âge</u> , <u>TS</u> , <u>HER-2</u> , <u>ER</u> : NS <u>TG</u> faiblement différencié : HR = 5,14 (95 % IC : 2,89 - 9,15; p < 0,001) <u>RS</u> : HR=2,81 (95 % IC : 1,70 - 4,64; p < 0,001)
Cobleigh <i>et al.</i> 2005 [84]  Validation rétrospective monocentrique de la valeur pronostique du test	Principal  18 ans	58±11,5 ans ; N- pré-ménopausées (81,9 %) post-ménopausées (18,1 %) pas de thérapie adjuvante TS : 2,3±1,1 cm ER+ (69,1 %) PgR+ (33,6 %) HER-2 + (16,8 %)  220 incluses/149 évaluées	SSMD à 10 ans  OUI	algorithme décrit dans PAIK2004 modèle de Cox normal Méthode de Cohen pour la corrélation RT-PCR et IHC  NA  NON	Pas de corrélation significative entre le RS et la survie sans récurrence à distance. Pas de différence significative entre les 3 catégories (faible, intermédiaire et fort) en termes de RS ou de survie sans récurrence à distance.  récurrence à distance à 10 ans (95 % IC) RS < 18 : 18 % (7 - 30) / 18 < RS < 31 : 38 % (15 - 61) / RS ≥ 31 : 28 % (13 - 32)
Esteva <i>et al.</i> 2005 [85]  Développement de la signature Etude rétrospective	Principal  15,1 ans	57±13 ans ; Tam : 54 % ; CT : 80 % <u>atteinte ganglionnaire</u> ≥ 10 0-9 (0 %) ; 10-15 (51 %) ; 15-20 (23 %) ; 20-30 (15 %) ; >30 (10 %) TS (cm) : 0-2 (33 %) ; 2-5 (36 %) ; >5 (31 %) ; TG : 1 (29 %) ; 3 (36 %)  78 évaluable	SSMD  NON	univariée et multivariée (modèle de Cox normal)  NA  NON	14 des 16 gènes spécifiques du cancer analysés dans l'algorithme RS sont en corrélation avec la récurrence du cancer du sein.

\*étudiés en analyse multivariée ; CT : chimiothérapie ; ER : statut du récepteur à l'œstrogène ; NA : non applicable ; NSP : « ne sait pas » ; PgR : statut du récepteur à la progestérone ; RS : *Recurrence score* ; SSMD : survie sans métastase à distance; TG : grade de la tumeur TS : taille de la tumeur.

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF SUIVI	POPULATION	CRITÈRES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	RÉSULTATS
Paik <i>et al.</i> 2006 [87]  Validation de la valeur prédictive du test Etude rétrospective	Principal  NP	patientes du NSABP B-20 sans atteinte ganglionnaire ER+ Tam ou Tam+CT  651 évaluables	SSMD  NON	analyse multivariée, modèle de Cox normal  âge, TS, ER, PgR, GR†  OUI	Tam seul ( % ptes) / Kaplan-Meier (95 % IC) RS < 18 (20,6 %) / 96,8 % (93,7 - 99,9) 18 < RS < 31 (7 %) / 90,9 % (82,5 - 99,4) RS ≥ 31 (7,2 %) / 60,5 % (46,2 - 74,8)  Tam+CT ( % ptes) / Kaplan-Meier (95 % IC) RS < 18 (33,5 %) / 95,6 % (92,7 - 98,6) RS < 31 (13,7 %) / 89,1 % (82,4 - 95,9) RS ≥ 31 (18 %) / 88,1 % (82,0 - 94,2)  RR du bénéfice de la CT (95 % IC) RS < 18 : RR = 1,31 (0,46 - 3,78) RS < 31 : RR = 0,61 (0,24 - 1,59) RS ≥ 31 : RR = 0,26 (0,31 - 0,53) Interaction RS/CT est statistiquement significative (p = 0,038), même après ajustement aux autres variables (p = 0,035 à 0,068). Cette interaction est plus élevée que celle de la CT avec les autres variables cliniques.
Habel <i>et al.</i> [86]  Etude de cas-témoins, confirmatoire monocentrique	Principal  NP	Registre KAISER : Cas (n=220)/Témoins (n=570), N- âge < 40 : 8 % / 4 % 40-49 : 19 % / 22 % 50-59 : 29 % / 27 % 60-74 : 44 % / 47 % Sans Tam adjuvant : 71 % / 69 % ER+ : 76 % / 90 % ; ER- : 24 % / 10 % TS ≤ 1 : 22 % / 34 % 1,1 - 2 : 42 % / 45 % 2,1 - 4 : 33 % / 20 % > 4 : 3 % / 1 % TG élevé : 11 % / 31 % moyen : 42 % / 46 % faible : 47 % / 23 % RS < 18 : 26 % / 56 % 18 < RS < 31 : 25 % / 19 % ≥ 31 : 50 % / 25 %	risque de décès spécifique du cancer du sein à 10 ans  NSP	NA  âge, TS, TG, ER, Tam  NON	ER+ traitées par du Tam : RR (95 % IC) RS < 18 : 2,8 % (1,7 - 3,9) 18 < RS < 31 : 10,7 % (6,3 - 14,9) RS ≥ 31 : 15,5 % (7,6 - 22,8)  ER+ non traitées par du Tam : RR (95 % IC) RS < 18 : 6,2 % (4,5 - 7,9) 18 < RS < 31 : 17,8 % (11,8 - 23,3) RS ≥ 31 : 19,9 % (14,2 - 25,2)

\* étudiés en analyse multivariée ; CT : chimiothérapie ; NA : non applicable ; NSP : « ne sait pas » ; ptes : patientes ; RS : *Recurrence score* ; SSMD : survie sans métastase à distance ; Tam : tamoxifène ; TG : grade de la tumeur ; TS : taille de la tumeur.

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF SUIVI	POPULATION	CRITÈRES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	RÉSULTATS
Sparano <i>et al.</i> 2008 [90]  Revue non systématique : ajustement du cut-off	Principal  NP	Données du NSABP décrites dans PAIK2006 ré-évaluées sur la base des nouveaux seuils tels que définis dans l'essai TAILORx  651 évaluées	SSMD à 10 ans SSR locale à 10 ans  NON	NA  NA  NON	SSMD à 10 ans RS<11 (27 %) : 98 % (tam) vs 95 % (tam+CT) HR=1,788 (95 % IC : 0,360 - 8,868 ; p=0,471) 11≤RS≤25 (43 %) : 95 % (tam) vs 94 % (tam+CT) HR=0,755 (95 % IC : 0,313 - 1,824 ; p=0,531) RS>25 (30 %) : 63 % (tam) vs 88 % (tam+CT) HR=0,284 (95 % IC : 0,148 - 0,551 ; p<0,0001)  SSR locale à 10 ans RS<11 (27 %) : 77 % (tam) vs 85 % (tam+CT) HR=0,605 (95 % IC : 0,317 - 1,153 ; p=0,124) 11≤RS≤25 (43 %) : 81 % (tam) vs 76 % (tam+CT) HR=1,106 (95 % IC : 0,671 - 1,823 ; p=0,691) RS>25 (30 %) : 53 % (tam) vs 75 % (tam+CT) HR=0,446 (95 % IC : 0,270 - 0,738 ; p=0,0012)

\* étudiés en analyse multivariée ; a. Intervalle sans récurrence : Temps depuis l'inclusion dans l'essai jusqu'à la première récurrence, incluant la récurrence locale, régionale et distante du sein ipsilatéral mais excluant les cancers primaires du sein opposé [129]. AC : chimiothérapie à base de doxorubicine+cyclophosphamide ; AT : chimiothérapie à base de doxorubicine+docetaxel ; AUC : aire sous la courbe ROC ; CT : chimiothérapie ; HT : hormonothérapie ; NS : non significatif ; NSP : « ne sait pas » ; SSMD : survie sans métastase à distance ; SSR : survie sans récurrence ; TG : grade de la tumeur ; TS : taille de la tumeur ; vs : versus.

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF SUIVI	POPULATION	CRITÈRES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	RÉSULTATS
Goldstein <i>et al.</i> 2008 [92]  Validation du test Etude de cas-témoins (ECOG-E2197)	Principal  6 ans	opérable, RH+ HER-2/neu+ : 21,9 %, HER-2/neu- : 44,9 %, HER-2 non connu : 34,1 % N (0-3) ; TS ≥ 1,1 cm CT : AT ou AC  récidive après CT-HT (n=99) sans récidive après CT-HT (n=366) ≤45 ans : 23 %±1,1 % 46-65 ans : 63,7 %±2,3 >65 ans : 12,7 %±1,6 % pré-ménopausées : 41,4 %±2,4 post-ménopausées : 58,6 %±2,4 % RS<18 : 46 % / 18≤RS<30 : 30 % / RS≥31 : 24 %  465 patientes	principal : intervalle sans récidive <sup>a</sup>  NSP	multivariée courbes ROC  Ajustement : TS, TG HER-2 âge, envahissement ganglionnaire  OUI	Récidive à 5 ans RS < 18, N (0-1) : 3,3 % (95 % IC : 2,2 % - 5,0 %) RS<18, N (2-3) : 7,9 % (95 % IC : 4,3 % - 14,1 %)  Analyse 1 : N2-3, âge jeune, TG central RS : HR (écart de 50 points) = 2,12 (95 % IC : 0,97 - 4,65 ; p = 0,06)  Analyse 2 : N2-3, âge jeune, TG local RS : HR = 3,13 (95 % IC : 1,60 - 6,14 ; p = 0,0009)  Analyse 3 : N2-3, âge jeune, TG local ou central et HER-2/neu négatif : RS non pronostique ; p NS  Concordance RS/Intégrateur/ grade localement mesuré : 36 % ; grade centralement mesuré : 38 %  Analyse multivariée, grade localement mesuré RS : HR = 2,64 (95 % IC : 1,80 - 3,87 ; p < 0,001) Intégrateur : HR = 1,34 (95 % IC : 0,94 - 1,91 ; p = 0,11)  Analyse multivariée, grade centralement mesuré RS : HR = 2,51 (95 % IC : 1,71 - 3,70 ; p < 0,001) Intégrateur : HR = 1,51 (95 % IC : 1,07 - 2,13 ; p = 0,02) AUC = 0,69 (RS) vs 0,56 (intégrateur, grade local) vs 0,61 (intégrateur, grade central)

\* étudiés en analyse multivariée ; a. Intervalle sans récidive : Temps depuis l'inclusion dans l'essai jusqu'à la première récidive, incluant la récidive locale, régionale et distante du sein ipsilatéral mais excluant les cancers primaires du sein opposé [129]. AC : chimiothérapie à base de doxorubicine+cyclophosphamide ; AT : chimiothérapie à base de doxorubicine+docetaxel ; AUC : aire sous la courbe ROC ; CT : chimiothérapie ; HT : hormonothérapie ; NS : non significatif ; NSP : « ne sait pas » ; SSMD : survie sans métastase à distance ; SSR : survie sans récidive ; TG : grade de la tumeur ; TS : taille de la tumeur ; vs : versus.

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF SUIVI	POPULATION EFFECTIF	CRITÈRES DE JUGEMENT	TYPE D'ANALYSE	RÉSULTATS
			SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	
Badve <i>et al.</i> 2008 [89]  Étude de cas-témoins confirmatoire monocentrique (ECOG-E2197)	Secondaire  76 mois	HR+ ou HR-, N (0-3) CT et HT (si HR+) cas-contrôles de 776 ptes avec récidive (n = 179) ou sans récidive (n = 597)  N = 2872 patientes	taux de récurrence à 5 ans. Récidive : cancer du sein invasif local, régional ou distant incluant le sein ipsilatéral.  NON	NA  NA  NON	voir dans la synthèse
Flanagan <i>et al.</i> 2008 [93]  Étude de cas rétrospective	Principal  NA	ER+ et N- (sauf 1 pte ER-) âge (58 ans), TS (1,3 cm) GNO = 1 (15 ptes), GNO = 2 (19 ptes), GNO = 3 (8 ptes)  42 patientes	NA  NA	Corrélation de Pearson (r) Corrélation de Spearman (r <sub>s</sub> )  caractéristiques clinicopathologiques : âge, TS, GN, formation tubulaire, nombre de figures mitotiques, ER et PgR (IHC), HER-2/neu, GNO  NON	Analyse univariée, corrélation / RS âge : r = -0,12 ; p = 0,46 TS : r = 0,06 ; p = 0,69 Formation tubulaire : r <sub>s</sub> = 0,32 ; p = 0,04 GN : r <sub>s</sub> = 0,52 ; p < 0,01 Nombre de figures mitotiques : r <sub>s</sub> = 0,52 ; p < 0,01 ER (IHC) : r = -0,58 ; p < 0,01 PgR (IHC) : r = -0,44 ; p < 0,01 HER-2/neu : r <sub>s</sub> = 0,37 ; p = 0,02 Score de Nottingham (1-9) : r = 0,56 ; p < 0,01 Grade de Nottingham (1-3) : r = 0,59 ; p < 0,01  Modèle de régression multiple RS = 13,424 + 5,420 (grade nucléaire) + 5,538 (indexe mitotique) - 0,045 (ER par IHC) - 0,030 (PgR par IHC) + 9,486 (HER-2/neu)

\* étudiés en analyse multivariée ; CT : chimiothérapie ; ECOG-E2197 (Eastern cooperative Oncology Group) ; ER : statut du récepteur à l'œstrogène ; GNO : grade de Nottingham ; HT : hormonothérapie ; IHC : immunohistochimie ; ptes : patientes ; NA : non applicable ; NP : non précisé ; PgR : statut du récepteur à la progestérone ; TS : taille de la tumeur.

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF	POPULATION	CRITÈRES DE JUGEMENT	TYPE D'ANALYSE	RÉSULTATS
	SUIVI	EFFECTIF	SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	
<b>Wolf <i>et al.</i> 2008 [91]</b>  <b>Etude rétrospective</b>	Principal  NA	RS obtenu entre octobre 2004 et octobre 2006 dans 16 centres différents  A voir représentativité de la population / celle vue en pratique clinique (table 1)  300 évaluables	SSR  NA	Corrélation de Pearson  caractéristiques clinicopathologiques âge, TS, TG envahissement ganglionnaire ER / PgR HER-2 statut histologique  NCCN St Gallen Adjuvant! Online  NON	RS < 18 : (N = 109, 36 %) 18 ≤ RS < 30 : (N = 134, 45 %) RS ≥ 31 : (N = 57, 19 %) Corrélation RS / TS : r = 0,2; p = 0,0001 Corrélation RS / âge : r = 0,03; p = 0,6 NCCN : (faible %/intermédiaire %/élevé %), N = 286 CT non nécessaire : 7 / 4 / 0 CT serait à considérer : 11 / 16 / 11 CT serait à administrer : 82 / 80 / 89 ; p = 0,17 St-Gallen : (faible %/intermédiaire %/élevé %), N = 296 risque faible : 34 / 18 / 2 risque moyen : 66 / 82 / 98 ; p < 0,0001 Adjuvant!, HT (faible %/intermédiaire %/élevé %), N = 296 SSR à 10 ans, bénéfice < 10 ans : 83 / 75 / 39 SSR à 10 ans, bénéfice > 10 ans : 17 / 25 / 61 ; p < 0,001 Adjuvant!, CT (faible %/intermédiaire %/élevé %), N = 296 SSR à 10 ans, bénéfice < 5 ans : 37 / 40 / 37 SSR à 10 ans, bénéfice > 5 ans : 63 / 60 / 63 ; p = 0,7

\* étudiés en analyse multivariée ; NA : non applicable ; CT : chimiothérapie ; ER : statut du récepteur à l'œstrogène ; PgR : statut du récepteur à la progestérone ; SSR : survie sans récurrence ; TG : grade de la tumeur ; TS : taille tumorale.

## ANNEXE 13. ONCOTYPE DX™ : CONCLUSION

TABLEAU 25. Oncotype DX™ - Valeur pronostique - synthèse des résultats

POPULATION	SSM	SS	SSR
ER+/N-	Paik <i>et al.</i> 2004 [83]	Habel <i>et al.</i> 2006 [86]	Badve <i>et al.</i> 2008 [89] Goldstein <i>et al.</i> 2008 [92]
ER+/N+			Badve <i>et al.</i> 2008 [89] Goldstein <i>et al.</i> 2008 [92]
ER + ou - / N-	Esteva <i>et al.</i> 2005 [85]*		

\* résultats négatifs pour la population et le critère de jugement considérés ; SS : survie spécifique du cancer du sein ; SSM : survie sans métastases ; SSR : survie sans récurrence.

TABLEAU 26. Oncotype DX™ - Valeur prédictive de réponse à la CT (HT concomitante) - synthèse des résultats

POPULATION	SSM	SG	SSR
ER+/N-	Paik <i>et al.</i> 2006 [87]	Paik <i>et al.</i> 2006 [87]	Paik <i>et al.</i> 2006 [87] Sparano <i>et al.</i> 2008 [90]
ER+/N+			Goldstein <i>et al.</i> 2008 [92]
ER (+ OU -) / N (+ OU -)			Wolf <i>et al.</i> 2008 [91]

CT : chimiothérapie ; HT : hormonothérapie ; SG : survie globale ; SSM : survie sans métastases ; SSR : survie sans récurrence.

TABLEAU 27. Oncotype DX™ - Valeur prédictive de réponse au tamoxifène - synthèse des résultats

POPULATION	SSR
ER+/N-	
ER+/N+	
ER (+ ou -) / N (+ ou -)	Wolf <i>et al.</i> 2008 [91]

SSR : survie sans récurrence

## ANNEXE 14. MAMMAPRINT® / DONNÉES ANALYTIQUES COMMUNES A TOUTES LES ÉTUDES

TECHNIQUE	APPARTENANCE	ÉCHANTILLON SOURCE	RÉACTIFS	CONDITION DE RECUEIL	CONSERVATION	TYPES OU UNITÉS D'EXPRESSION DES RÉSULTATS	LECTURE DES RÉSULTATS
« <i>microarray</i> »	Transcriptome	Tissu tumoral congelé dans « RNARetain <sup>a</sup> »	parfaitement caractérisé non propre à l'équipe label, test commercialisé par Agendia	Traçabilité de collecte et de stockage décrite	Cryoconservation	Coefficient de corrélation <sup>b</sup>	Quantitative, automatisée, chiffrée, discontinue, répétée

<sup>a</sup> solution fournie dans le kit ; elle permet de stabiliser l'échantillon et de préserver l'intégrité des ARN sur une période de 7 jours à température ambiante ; <sup>b</sup> taux d'ARN-test marqué/taux d'ARN-référence marqué.

## ANNEXE 15. MAMMAPRINT® / DONNÉES ANALYTIQUES DISPONIBLES PAR ÉTUDE

RÉFÉRENCE	CONDITIONS DE MISE EN OEUVRE	SENSIBILITÉ	REPRODUCTIBILITÉ	ÉTALONNAGE EXTERNE	CONTRÔLE QUALITÉ	SEUIL EMPLOYÉ DANS L'ÉTUDE
van't Veer <i>et al.</i> 2002 [103]	NP	non définie	non définie	NP	NP	dichotomique (+/-) propre à l'équipe 0,4 = déterminé dans le cadre de cette étude
van de Vijver <i>et al.</i> 2002 [105]	NP	non définie	non définie	étalonnage interne 1281 sondes contrôles	contrôle de qualité dans le cadre de cette étude de validation qui suit l'étude de développement [103]	dichotomique (+/-) propre à l'équipe 0,4 (nouvelle cohorte de 234 ptes) 0,55 (ancienne cohorte de 61 ptes)
Glas <i>et al.</i> 2006 [107]	Contrôle de qualité inter-manipulations, effectué spécifiquement dans le cadre de cette étude : objectifs de l'étude	non définie	définie analyse de variance intra-laboratoire démontrée dans le cadre de cette étude	OUI = objectif de l'étude	Oui objectif de l'étude	dichotomique (+/-) propre à l'équipe seuil = celui de Vant'veer2002
Buyse <i>et al.</i> 2006 [106]	Contrôle de qualité inter-laboratoires, effectué spécifiquement dans le cadre de cette étude	définie objectif de l'étude	non définie	même référence a été reproduite par Agendia en de milliers d'exemplaires	NP	dichotomique (+/-) seuil de Vant'veer2002 = 0,4
Thomassen <i>et al.</i> 2006 [114]	NP	définie	non définie	NP	NP	dichotomique (+/-) 0,5 : établi d'une manière conventionnelle
Mook <i>et al.</i> 2008 [109]	Contrôle de qualité défini Agendia et labo CLIA	non définie	NP	OUI AGENDIA et Labo CLIA	Oui Agendia et labo CLIA	dichotomique (+/-) 0,4 (celui de Vant'veer, Van de Vijver, Glas et Buyse)
Wittner <i>et al.</i> 2008 [111]	pas d'analyse de la qualité de l'ARN extrait	définie études précédentes	définie études précédentes	OUI selon la méthode et le protocole standardisés décrits dans GLAS2006	selon la méthode et le protocole standardisés décrits dans Glas <i>et al.</i> 2006 [107]	dichotomique (+/-) 0,4 (Van't veer2002)

CLIA : *Clinical laboratory improvement amendments* ; NP : non précisé.

## ANNEXE 16. MAMMAPRINT® / DONNÉES CLINIQUES PAR ÉTUDE

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF SUIVI	POPULATION	EFFECTIF EVALUÉ	CRITÈRES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	RÉSULTATS
van't Veer <i>et al.</i> 2002 [103]  Développement de la signature	Principal suivi 5 ans	< 55 ans, TS < 5 cm ER+ : 79,2 % ; PgR+ : 57,7 % ; N- : 100 % Tamoxifène : 4 % ; CT (protocole non précisé) : 4 % mastectomie radicale (n = 35) traitement conservateur (n = 62) diagnostiquées entre 1983 et 1996	N = 97  expérimental (n = 78)  test (n = 19)	Métastase à distance à 5 ans  OUI	analyse multivariée (régression logistique)  TG, TS invasion angiogénique, âge, ER  NON	Identification de la signature "70-gènes"  Population expérimentale univariée OR = 15 (95 % IC : 4 - 56) ; p = 0,0000041 multivariée OR = 18 (95 % IC : 3,3 - 94) ; p = 0,00014 65 / 78 ptes avec 5 ptes de mauvais pronostic et 8 de bon pronostic assignées à la catégorie opposée.  Population test 17 / 19 prédictions correctes avec 1 bon pronostic classé dans le mauvais et un 1 mauvais pronostic classé dans le bon.
van de Vijver <i>et al.</i> 2002 [105]  Développement de l'essai	Principal suivi 5 ans	< 52 ans, TS < 5 cm, pT1 ou pT2, mastectomie radicale ou chirurgie conservatrice suivie de RT (si indiquée) 151 N- vs 144 N+ CT (protocole non précisé), tamoxifène ou les deux chez 10 N- et 144 N+ 69 ER- vs 226 ER+ pronostic favorable (n = 115) > seuil pronostic péjoratif (n = 180) < seuil diagnostiquées entre 1984 et 1995	N = 295 dont 61 patientes provenant de la cohorte de Vant'Veer 2002)	Métastases à distance à 5 ans  OUI	modèle de Cox normal  extension de l'invasion vasculaire N- vs 1-3 ou N- vs ≥4 TS, TG âge, ER CT, HT mastectomie (vs chirurgie conservatrice)  NON	Métastases distantes à 5 ans OR (N-, n=67) : 15,3 (95 % IC : 1,8 - 127) ; p = 0,003 OR (N+, n=113) : 13,7 (95 % IC : 3,1 - 61) ; p < 0,001 OR (ttes ptes, n=180) : 14,6 (95 % IC : 4,3 - 50) ; p < 0,001  Analyse univariée HR (ttes ptes) : 5,1 (95 % IC : 2,9 - 9,0) ; p < 0,001 HR (N-, n = 151) : 5,5 (95 % IC : 2,5 - 12,2) ; p < 0,001 HR (N+, n = 144) : 4,5 (95 % IC : 2 - 10,2) ; p < 0,001  Analyse multivariée HT (ttes ptes) : 4,6 (95 % IC : 2,3 - 9,2) ; p < 0,001

\* étudiés en analyse multivariée ; CT : chimiothérapie ; ER : statut du récepteur à l'œstrogène ; HR : Hazard ratio ; OR : Odds ratio ; PgR : statut du récepteur à la progestérone ; ptes : patientes ; TG : grade tumoral ; TS : taille tumorale ; ttes : toutes.

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF  SUIVI	POPULATION	EFFECTIF EVALUÉ	CRITÈRES DE JUGEMENT  SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	RÉSULTATS
<p>Glas <i>et al.</i> 2006 [107]</p> <p>Développement de l'essai</p> <p>Etude rétrospective confirmatoire monocentrique de standardisation</p>	Principal  suivi NP	<p>cohorte de Vant'veer (toutes les patientes)</p> <p>cohorte de Vand'vijver (145 N-)</p> <p>cohorte MammaPrint® (162 N-), &lt; 55 ans, n'ayant pas reçu de traitement adjuvant et faisant partie des 2 premières cohortes).</p>	<p>78 patientes (Vant'veer)</p> <p>145 patientes (Vand'vijver)</p>	<p>Métastase à distance à 5 ans</p> <p>OUI</p>	NA	<p>Comparaison aux premières données</p> <p>Vant'veer : OR = 15 (95 % IC : 2,1 - 19)</p> <p>MammaPrint® : OR = 13 (95 % IC : 3,9 - 44)</p> <p>dont 7 cas discordants incluant :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 ptes n'ayant pas développé de métastases, classées en mauvais pronostic dans la série de Vant'veer mais correctement classées en bon pronostic par le test MammaPrint®</li> <li>- 1 pte qui a développé des métastases classée en bon pronostic alors que le test MammaPrint® la classe correctement en mauvais pronostic.</li> </ul> <p>Reproductibilité (cf. synthèse)</p> <p>Validation clinique</p> <p>Les données sont hautement similaires</p> <p>coefficient de corrélation (MammaPrint® vs 145 ptes N- de la cohorte de Van de Vijver) = 0,88, <math>p &lt; 0,0001</math></p> <p>HR (MammaPrint®) : 5,6 (95 % IC : 2,4 - 7,3) ; <math>p &lt; 0,0001</math></p> <p>HR (Van de Vijver) : 5,5 (95 % IC : 2,5 - 12,2) ; <math>p &lt; 0,001</math></p>

\* étudiés en analyse multivariée ; HR : *Hazard ratio* ; NA : non applicable ; NP : non précisé ; OR : *Odds ratio*.

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF SUIVI	POPULATION	EFFECTIF ÉVALUÉ	CRITÈRES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	RÉSULTATS
<p><b>Buyse <i>et al.</i> 2006 [106]</b></p> <p><b>Validation de l'essai</b></p> <p><b>Etude rétrospective confirmatoire multicentrique</b></p>	<p>Principal</p> <p>Suivi NP</p>	<p><u>Série de validation</u> : &lt; 61 ans, diagnostiquées entre 1980 et 1998, N-, T1-T2 (≤ 5 cm) / Tamoxifène : 0 % ; CT : 0 %</p> <p><u>Série de Van de Vijver</u> : 151 ptes, N- <u>Risque Adjuvant! Online/ Risque « 70-gènes »</u> (Marchionni <i>et al.</i> 2008) :</p> <p>faible/faible (n = 52) : ER+, 100 % ; TS 2 cm, 67 % ; TG bon, 43 % ; TG mauvais, 0 %</p> <p>faible/élevé (n = 28) : ER+, 100 % ; TS 2 cm, 59 % ; TG bon, 43 % ; TG mauvais, 0 %</p> <p>élevé/faible (n = 59) : ER+, 91 % ; TS 2 cm, 29 % ; TG bon, 12 % ; TG mauvais, 18 %</p> <p>élevé/élevé (n = 163) : ER+, 48 % ; TS 2 cm, 25 % ; TG bon, 3 % ; TG mauvais, 69 %</p>	302 patientes évaluées / 326 incluses	<p>métastases à distance à 5 ans/10 ans/au-delà</p> <p>survie sans récurrence</p> <p>survie globale</p> <p>OUI</p>	<p>Estimation du HR par stratification</p> <p>Caractéristiques clinico-pathologiques (Adjuvant! Online)</p> <p>OUI</p>	<p>HR ajusté par Adjuvant! Online : temps de métastases à distance : 2,13 (95 % IC : 1,19 - 3,82)</p> <p>Survie sans récurrence : 1,36 (95 % IC : 0,91 - 2,03)</p> <p>Survie globale : 2,63 (95 % IC : 1,45 - 4,79)</p> <p>Développement de métastases à distance à 5 ans : Sensibilité de MammaPrint® : 0,90 (95 % IC : 0,78 - 0,95)</p> <p>Sensibilité de Adjuvant! Online : 0,87 (95 % IC : 0,75 - 0,94)</p> <p>Spécificité de MammaPrint® : 0,42 (95 % IC : 0,36 - 0,48)</p> <p>Spécificité de Adjuvant! Online : 0,29 (95 % IC : 0,24 - 0,35)</p> <p>AUC, temps de métastases à distance : MammaPrint® : 0,681</p> <p>Adjuvant! Online : 0,648</p> <p>AUC, survie globale MammaPrint® : 0,659</p> <p>Adjuvant! Online : 0,576</p>
<p><b>Thomassen <i>et al.</i> 2006 [114]</b></p> <p><b>Sensibilité et spécificité de la signature</b></p> <p><b>Etude rétrospective monocentrique</b></p>	<p>Secondaire</p> <p>suivi 12,3 ans</p>	<p>Echantillon expérimental (N = 61) risque faible ou T1 (n=29), critères du DBCG : N-, T ≤ 2 cm, grade = 1 (carcinome canalaire), R+, &gt; 35 ans</p> <p>risque intermédiaire ou T2 (n = 52): N-, T ≤ 50, grade = 1 (carcinome canalaire), R+, &gt; 35 ans</p> <p>HT : 0 % , CT : 0 %</p> <p>Echantillon de validation (N = 180)</p>	61 patientes évaluées	<p>Métastases à distance à 10 ans</p> <p>OUI</p>	<p>algorithme de Vant'veer (coefficient de corrélation) vs procédure SVM</p> <p>NA</p> <p>OUI</p>	<p>Échantillon expérimental <u>méthode de corrélation</u> (algorithme de Vant'veer) : sensibilité : 77 % - spécificité : 50 %</p> <p><u>méthode SVM</u> : sensibilité : 73 % - spécificité : 77 %</p> <p>Échantillon de validation <u>Méthode de corrélation</u> (algorithme de Vant'veer) : sensibilité : 86 % - spécificité : 58 %</p> <p><u>méthode SVM</u> : sensibilité : 83 % - spécificité : 60 %</p>

\* étudiés en analyse multivariée ; AUC : aire sous la courbe ROC ; CT : chimiothérapie ; DBCG : *Danish breast cancer cooperative group* ; ER : statut du récepteur à l'œstrogène ; HR : *Hazard* ; SVM : *Support Vector Machines* ; TG : grade tumoral ; TS : taille tumorale ; vs : *versus*.

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF	POPULATION	EFFECTIF EVALUÉ	CRITÈRES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	RÉSULTATS
Mook <i>et al.</i> [109]  Validation rétrospective indépendante	Principal  Cohorte 1 : suivi 7,8 ans  Cohorte 2 : suivi 10,3 ans	Cohorte 1 (données de 2 centres) < 71 ans ; T1-2 ou T3 opérable  N+ (1-3) : N+ si 0,2 mm < T ≤ 2,0 mm pas de ttt néo-adjuvant mastectomie ou chirurgie conservatrice suivies de RT ou ttt adjuvant si indiqué diagnostiquées entre 1994 et 2001  Cohorte 2 N+ (1-3) de la cohorte de van de Vijver (N = 106) en aveugle en termes de leur profil d'expression de la signature "70-gènes"	<u>Cohorte 1</u> (n = 241) 41 % de bon pronostic 59 % de mauvais pronostic  <u>Cohorte 2</u> (n = 106) 40 % de bon pronostic 59 % de mauvais pronostic	Survie sans métastases à distance à 5 ans/10 ans (DMFS)  Survie spécifique du cancer du sein (BCSS) à 5 ans/10 ans  OUI	analyse multivariée (222 ptes) régression de Cox proportionnelle  âge, nombre de ganglions, TS, TG, ER+ et PgR+  HER-2/neu chirurgie, CT, HT  OUI	<u>Cohorte 1</u> DMFS à 5 ans / 10 ans 98 % ± 2 % / 91 % ± 4 % (bon pronostic) vs 80 % ± 4 % / 76 % ± 4 % (mauvais pronostic) HR = 4,13 (95 % IC : 1,72 - 9,96 ; p = 0,002) BCSS cohorte 1 à 5 ans / 10 ans 99 % ± 1 % / 96 % ± 2 % (bon pronostic) vs 88 % ± 3 % / 76 % ± 4 % (mauvais pronostic) Signature de mauvais pronostic associée à une survie spécifique plus courte : HR = 5,70 (95 % IC : 2,01 - 16,23 ; p = 0,001) En analyse multivariée / BCSS la signature est le facteur pronostique indépendant le plus puissant avec HR = 7,17 (95 % IC : 1,81 - 28,43 ; p = 0,005) En analyse multivariée / DMFS uniquement la thérapie endocrine se présente comme facteur pronostique indépendant avec HR = 0,31 (95 % IC : 0,12 - 0,80 ; p = 0,02) alors que la signature tend vers la significativité avec HR = 2,99 (95 % IC : 0,996 - 8,99 ; p = 0,051)  <u>Cohorte 2</u> BCSS à 10 ans 98 % ± 2 (bon pronostic) vs 64 % ± 6 % (mauvais pronostic) signature de mauvais pronostic associée à une courte BCSS avec HR = 6,60 (95 % IC : 1,97 - 22,10 ; p = 0,002) Analyse multivariée / BCSS HR = 3,63 (95 % IC : 0,88 - 14,96 ; p = 0,07)

\* étudiés en analyse multivariée ; CT : chimiothérapie ; ER : statut du récepteur à l'œstrogène ; HR : Hazard ratio ; HT : hormonothérapie ; PgR : statut du récepteur à la progestérone ; ptes : patientes ; RT : radiothérapie ; TG : grade tumoral ; TS : taille tumorale ; ttt : traitement ; vs : versus ;

RÉFÉRENCE	MARQUEUR EN OBJECTIF SUIVI	POPULATION	EFFECTIF EVALUÉ	CRITÈRES DE JUGEMENT SONT-ILS OBJECTIFS ET NON BIAISÉS ?	TYPE D'ANALYSE FACTEURS PRONOSTIQUES* AJUSTEMENT DU RÉSULTAT	RÉSULTATS
<b>Wittner <i>et al.</i> 2008 [111]</b>  <b>Validation rétrospective multicentrique de l'essai</b>	Principal suivi média : 11,3 ans	patientes issues d'un seul centre diagnostiquées entre 1985 et 1997 N- âge médian : 62,5 ans mastectomie ou chirurgie conservatrice ±RT CT, HT ou les deux : 45 %  <u>COMPARAISON</u> avec la cohorte NKI de 151 ptes N- (Van de Vijver) dont 61 N-décrits dans van't Veer <i>et al.</i> 2002 [103]	100 évaluées	métastases à distance  OUI	Test Mantel-Haenszel  NA  NON	cohorte de l'étude / cohorte du NKI  <u>VPN</u> : 100 % (95 % IC : 87 % - 100 %) / 88 % (95 % IC : 77 % - 95 %)  <u>VPP</u> : 12 % (95 % IC : 6 % - 22 %) / 52 % (95 % IC : 41 % - 62 %)

\* étudiés en analyse multivariée ; CT : chimiothérapie ; ER : Récepteur à l'œstrogène ; HT : hormonothérapie ; NKI : *National cancer institute* ; PgR : Récepteur à la progestérone ; ptes : patientes ; RT : radiothérapie ; VPN : valeur prédictive négative ; VPP : valeur prédictive positive.

## ANNEXE 17. MAMMAPRINT® : CONCLUSION

TABLEAU 28. MammaPrint® - Valeur pronostique - synthèse des résultats

POPULATION	SSM	SG	SS
N-	van't Veer <i>et al.</i> 2002 [103] van de Vijver <i>et al.</i> 2002 [105] Glas <i>et al.</i> 2006 [107] Buyse <i>et al.</i> 2006 [106]	Buyse <i>et al.</i> 2006 [106]	
N+	Mook <i>et al.</i> 2008 [109]*		Mook <i>et al.</i> 2008 [109]
<b>Patientes âgées / N-</b>	Wittner <i>et al.</i> 2008 [111]**		

\* résultats négatifs pour la population et pour le critère de jugement considérés ; \*\* valeur indépendante non prouvée ; SG : survie globale ; SSM : survie sans métastases ; SS : survie spécifique du cancer du sein.

## ANNEXE 18. DONNÉES RÉGLEMENTAIRES

	UPA/PAI-1	ONCOTYPE DX™	MAMMAPRINT®
<b>Approbation FDA<sup>‡‡</sup></b>	Test <i>American Diagnostica</i> Femtelle®	Pas d'approbation FDA <sup>§§</sup>	Autorisation de mise sur le marché, fournie par la FDA le 6 février 2007 et mise à jour le 21/7/2008 ***
<b>Type de plateformes</b>	Multiplateformes, approuvé pour le diagnostic in vitro FDA	Plateforme unique	Plateforme unique
<b>Contrôle de qualité</b>	Approbation et surveillance assurée sur le plan européen par le laboratoire de Nijmegen	Oui	Oui <sup>†††</sup>
<b>Nomenclature française</b>	Enregistré au n° 1825-1826	Non	Non
<b>Coût</b>	B300	3820 dollars <sup>†††</sup> au 09/04/2009	4200 dollars <sup>§§§</sup> au 20/04/2009
<b>Type de prélèvement</b>	Tissu minimum 50 mg, contrôlé sur le plan morphologique et cryopréservation <sup>****</sup>	Coupes fixées dans de la paraffine	Tissu congelé
<b>Utilisation clinique internationale</b>	Pratiqué actuellement en Allemagne chez 50 % des patientes, essentiellement de grade II	Oui	Oui

<sup>‡‡</sup> La FDA a récemment élaboré un guide dans lequel ont été développées les conditions d'autorisation de mise sur le marché des tests moléculaires comme MammaPrint® et Oncotype DX™.

<http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071457.pdf>

<sup>§§</sup> Genomic Health commercialise actuellement Oncotype DX™ sous la couverture de certaines règles locales ("home brew rules") qui ne nécessitent pas l'approbation de la FDA puisque les échantillons sont testés au niveau d'une plateforme unique. Le laboratoire est accrédité CLIA-1988 (« Clinical Laboratory Improvement Amendments ») et a été qualifié comme laboratoire fournissant des tests cliniques de grande complexité.

<http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/IVDRegulatoryAssistance/ucm124105.htm>

<sup>\*\*\*</sup> [http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/K080252.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K080252.pdf)

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfivd/index.cfm?db=pmn&id=K080252>

<sup>†††</sup> Contrôle de qualité possible au sein de la plateforme d'Agendia mais absence d'études prospectives de contrôle de qualité et de standardisation du test.

<sup>‡‡‡</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Oncotype\\_DX](http://en.wikipedia.org/wiki/Oncotype_DX)

<sup>§§§</sup> <http://en.wikipedia.org/wiki/MammaPrint>

<sup>\*\*\*\*</sup> Des prélèvements de 30 à 40 mg sont acceptables pour l'essai en cours NNBC-3 et dans des plateformes bien entraînées.

## ANNEXE 19. DESCRIPTION DES ESSAIS CLINIQUES

### **uPA/PAI-1, Essai européen NNBC-3**

Essai prioritaire INCa : [http://www.e-cancer.fr/Les-Essais-cliniques/Registre-des-essais-cliniques/op\\_com\\_etudecliniquev2-it\\_738-ta\\_detailec1-idec\\_388-la\\_1-ve\\_1.html](http://www.e-cancer.fr/Les-Essais-cliniques/Registre-des-essais-cliniques/op_com_etudecliniquev2-it_738-ta_detailec1-idec_388-la_1-ve_1.html)

Promoteur : Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO, Allemagne)

Collaboration scientifique :

Laboratoire de transfert d'oncologie biologie - UFR Médecine - Marseille

Centre d'Investigation Clinique - Hôpital Nord - Marseille

European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)

Centres - France : Brest, Bordeaux, Montpellier, Tours, Clermont-Ferrand, Rouen, La Roche-sur-Yon, Limoges

Centres - Allemagne : Aalen, Amberg, Aschaffenburg, Augsburg, Aurich, Bergisch Gladbach, Berlin, Bielefeld, Bietigheim-Bissingen, Böblingen, Bonn, Bonn-Venusberg, Bottrop, Bremen (x3), Bremerhaven, Buchholz, Celle, Chemnitz, Darmstadt, Deggendorf, Dortmund, Duisburg, Düsseldorf (x2), Ebersberg, Erkelenz, Essen, Esslingen, Frankenthal, Frankfurt, Frankfurt Höchst, Fürth, Gelnhäusen, Gerharden, Gifhorn, Goerlitz, Greifswald, Halle, Halle/Saale, Hamburg (x4), Hanau, Hannover (x3), Heide, Heppenheim, Hilden, Hildesheim, Ildede, Itzehoe, Jena, Kassel (x2), Kaufbeuren, Karlsruhe (x2), Koblenz, Köln (x3), Landsberg a. Lech, Landshut (x2), Limburg/Lahn, Ludwigsburg, Magdeburg (x2), Mannheim, Mainz (x2), Marktredwitz, Meiningen, Memmingen, Minden, Multangen, München (x2), Neubrandenburg, Neumarkt, Neuss, Neuwid, Nordhausen, Nürnberg, Offenbach (x2), Olpe, Ostfildern, Paderborn, Passau, Pforzheim, Pinneberg, Püttlingen, Regensburg, Remagen, Remscheid, Reutlingen, Rheinfelden, Rostock, Rottweil, Saarlouis (x2), Salzwedel, Schweinfurt, Schwerin, Siegen (x2), Simmern, Solingen, Stade, Stendal, Stralsund, Suhl, Troidorf, Tübingen, Ulm, Weiden i.d.Opf, Weinheim, Wernigerode, Wiesbaden (x3).

### **Oncotype DX™, Essai international TAILORx (Trial Assigning Individualized Options for Treatment Sparano *et al.* 2006 [81])**

<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/ECOG-PACCT-1>

Centres - Etats-Unis : Alabama, Alaska, Arkansas, Californie, Colorado, Connecticut, Delaware, District of Columbia, Floride, Georgie, Hawaï, Idaho, Illinois, Indiana, Iowa, Kansas, Kentucky, Louisiane, Maine, Maryland, Massachusetts, Michigan, Minnesota, Mississippi, Missouri, Montana, Nebraska, Nevada, New Hampshire, New Jersey, New Mexico, New York, North Carolina, North Dakota, Ohio, Oklahoma, Oregon, Pennsylvanie, Rhode Island, Caroline du sud, Dakota du sud, Tennessee, Texas, Utah, Virginie, Washington, West Virginia, Wisconsin.

Centres - Canada : Alberta, British Columbia, New Brunswick, Ontario, Québec, Saskatchewan

Centres - Autres : Irlande, Pérou, Porto Rico

MammaPrint®, Essai européen MINDACT («microarray» In Node-negative Disease may Avoid ChemoTherapy)

[http://www.e-cancer.fr/Les-Essais-cliniques/Registre-des-essais-cliniques/op\\_com\\_etudecliniquev2-it\\_738-ta\\_detailec1-idec\\_417-la\\_1-ve\\_1.html](http://www.e-cancer.fr/Les-Essais-cliniques/Registre-des-essais-cliniques/op_com_etudecliniquev2-it_738-ta_detailec1-idec_417-la_1-ve_1.html)  
<http://www.eortc.be/protoc/Details.asp?Protocol=10041>

Centres - France : Nice, Marseille, Caen, Dijon, Toulouse, Bordeaux, Rennes, Saint-Herblain, Angers, Reims, Clermont-Ferrand, Strasbourg, Mulhouse, Lyon, Vandoeuvre-Les-Nancy, Paris, Rouen, Saint-Cloud, Villejuif, Pontoise, Mulhouse (x2)

Centres - Belgique : Brussels, Antwerpen, Edegem, Brussels, Yvoir, Brussels, Haine St Paul, Roeselare, Namur, Kortrijk

Centres - Allemagne : Moenchengladbach, Muenster, Witten, Koeln, Boeblingen, Dortmund

Centres - Italie : Reggio Emilia, Rimini

Centres - Slovénie : Ljubljana, Maribor

Centres - Espagne : Girona, Barcelona (x2), Palma De Mallorca, Madrid, Barcelona, Valencia, Barcelona, Palma De Mallorca

Centres - Pays-bas : 'S Hertogenbosch, Utrecht, Alkmaar, Almelo, Amersfoort, Amsterdam (x2), Hoofddorp, Leiden, Den Haag, Heerlen, Leiderdorp, Deventer, Arnhem, Leeuwarden, Purmerend, Drachten

Centres - Autres : Scotland, United Kingdom et Lausanne, Switzerland

## ANNEXE 20. ABRÉVIATIONS

AC : Chimiothérapie à base de doxorubicine+cyclophosphamide

AT : Chimiothérapie à base de doxorubicine+docetaxel

AUC : Aire sous la courbe ROC

CMF : Cyclophosphamide, méthotrexate et fluorouracile

DBCG : *Danish Breast Cancer Cooperative Group*

ECOG : *Eastern Cooperative Oncology Group*

EIA : *Enzyme Immuno Assay*

ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ER : Récepteur à l'oestrogène

FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization*

HR : Récepteur hormonal

IHC : Immunohistochimie

LOE : *Level Of Evidence*

N- : Cancer du sein sans atteinte ganglionnaire

N+ : Cancer du sein avec atteinte ganglionnaire

PgR : Récepteur à la progestérone

RT-PCR : *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*

SBR : *Scarff Bloom Richardson* (classification)

SOP : *Standard Operating Procedure*

SS ou SSCS : Survie spécifique du cancer du sein

SSM : Survie sans métastases

SSMD : Survie sans métastases à distance

SSP : Survie sans progression

SSR : Survie sans récurrence

t-PA : *Tissue-type plasminogen activator*

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rican S, Jouglu E, Kerseho D, Gourdon G, Salem G. La mortalité par cancer en France métropolitaine. Tendances récentes (2000-2003). *Oncologie* 2006; 8 : 911-26
2. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 2007; 18 : 1133-44
3. Eifel P, Axelson JA, Costa J, *et al.* National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93 : 979-89
4. STPAULDEVENCE. *Recommandations pour la pratique clinique « Cancers du sein »* [online]. 2005. Available: URL: <http://www.sor-cancer.fr/index.php?tg=fileman&idx=get&inl=1&id=2&gr=Y&path=Sein%2Fcancer+du+sein+infiltrant&file=recommandationsSPdV2005.pdf>
5. STPAULDEVENCE. *Recommandations pour la Pratique Clinique : Saint Paul de Vence 2007 « cancers du sein »* [online]. 2007. Available: URL: <http://www.sor-cancer.fr/index.php?tg=fileman&idx=get&inl=1&id=2&gr=Y&path=Sein%2Fcancer+du+sein+infiltrant&file=texte-integralstpaul2007.pdf>
6. EBCTCG. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998; 352 : 930-42
7. EBCTCG. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998; 351 : 1451-67
8. COCHRANE. *Multi-agent chemotherapy for early breast cancer.* [online]. Cochrane Database Syst Rev, ed. 2002
9. EBCTCG, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. 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 : 1687-717
10. Sundquist M, Thorstenson S, Brudin L, Wingren S, Nordenskjold B. Incidence and prognosis in early onset breast cancer. *Breast* 2002; 11 : 30-5
11. Hery M, Delozier T, Ramaioli A, *et al.* Natural history of node-negative breast cancer: are conventional prognostic factors predictors of time to relapse? *Breast* 2002; 11 : 442-8
12. Hayes DF. Do we need prognostic factors in nodal-negative breast cancer? *Arbiter. Eur J Cancer* 2000; 36 : 302-6
13. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004; 9 : 606-16
14. Subramaniam DS, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6 : 147-59
15. Hayes DF. Prognostic and predictive factors for breast cancer: translating technology to oncology. *J Clin Oncol* 2005; 23 : 1596-7
16. 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 : 1456-66
17. Harris L, Fritsche H, Mennel R, *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25 : 5287-312
18. Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52 : 305-19
19. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, *et al.* National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem* 2008; 54 : e11-e79
20. 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 : 913-20
21. 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 : 116-28
22. Vetter M, Thomssen C, Geurts-Moespot A, *et al.* Feasibility of determination of ASCO recommended prognostic factors UPA/PAI-1 in clinical routine and the node-negative NNBC 3-Europe therapy trial. Feasibility of determination of ASCO recommended prognostic factors UPA/PAI-1 in clinical routine and the node-negative NNBC 3-Europe therapy trial.; ASCO 2008
  23. Thomssen C, Vetter M, Geurts-Moespot A, *et al.* Determination of ASCO recommended prognostic factors uPA and PAI-1 in daily clinical routine and the node-negative NNBC 3-Europe trial. San Antonio Breast Cancer Symposium; 12 November 2008. USA, San Antonio: 2008
  24. Schmidt M, Victor A, Bratzel D, *et al.* Long-term outcome prediction by clinicopathological risk classification algorithms in node-negative breast cancer--comparison between Adjuvant!, St Gallen, and a novel risk algorithm used in the prospective randomized Node-Negative-Breast Cancer-3 (NNBC-3) trial. *Ann Oncol* 2009; 20 : 258-64
  25. Anneck K, Schmitt M, Euler U, *et al.* uPA and PAI-1 in breast cancer: review of their clinical utility and current validation in the prospective NNBC-3 trial. *Adv Clin Chem* 2008; 45 : 31-45
  26. Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44 : 139-266
  27. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315 : 1650-9
  28. Hekman CM, Loskutoff DJ. Fibrinolytic pathways and the endothelium. *Semin Thromb Hemost* 1987; 13 : 514-27
  29. Martin PM, Ouafik L. John Libbey Eurotext, ed. Les cibles du stroma et du système angiogénique. 2008
  30. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997; 72 : 1-22
  31. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, *et al.* Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 1997; 78 : 285-96
  32. Stephens RW, Brunner N, Janicke F, Schmitt M. The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52 : 99-111
  33. Duffy MJ, Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem* 2004; 37 : 541-8
  34. Jankun J, Merrick HW, Goldblatt PJ. Expression and localization of elements of the plasminogen activation system in benign breast disease and breast cancers. *J Cell Biochem* 1993; 53 : 135-44
  35. Christensen L, Wiborg Simonsen AC, Heegaard CW, Moestrup SK, Andersen JA, Andreasen PA. Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator, type-1 plasminogen-activator inhibitor, urokinase receptor and alpha(2)-macroglobulin receptor in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 66 : 441-52
  36. Umeda T, Eguchi Y, Okino K, Kodama M, Hattori T. Cellular localization of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors, and their mRNAs in breast cancer tissues. *J Pathol* 1997; 183 : 388-97
  37. Andreasen PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN. Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 68 : 1-19
  38. Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, *et al.* Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up. *Br J Cancer* 1999; 80 : 419-26
  39. Harbeck N, Kates RE, Schmitt M. Clinical relevance of invasion factors urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 for individualized therapy decisions in primary breast cancer is greatest when used in combination. *J Clin Oncol* 2002; 20 : 1000-7
  40. Rosenberg S. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer and other pathological conditions: introduction and perspective. *Curr Pharm Des* 2003; 9 : 4p
  41. Croucher DR, Saunders DN, Lobov S, Ranson M. Revisiting the biological roles of PAI2 (SERPINB2) in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8 : 535-45

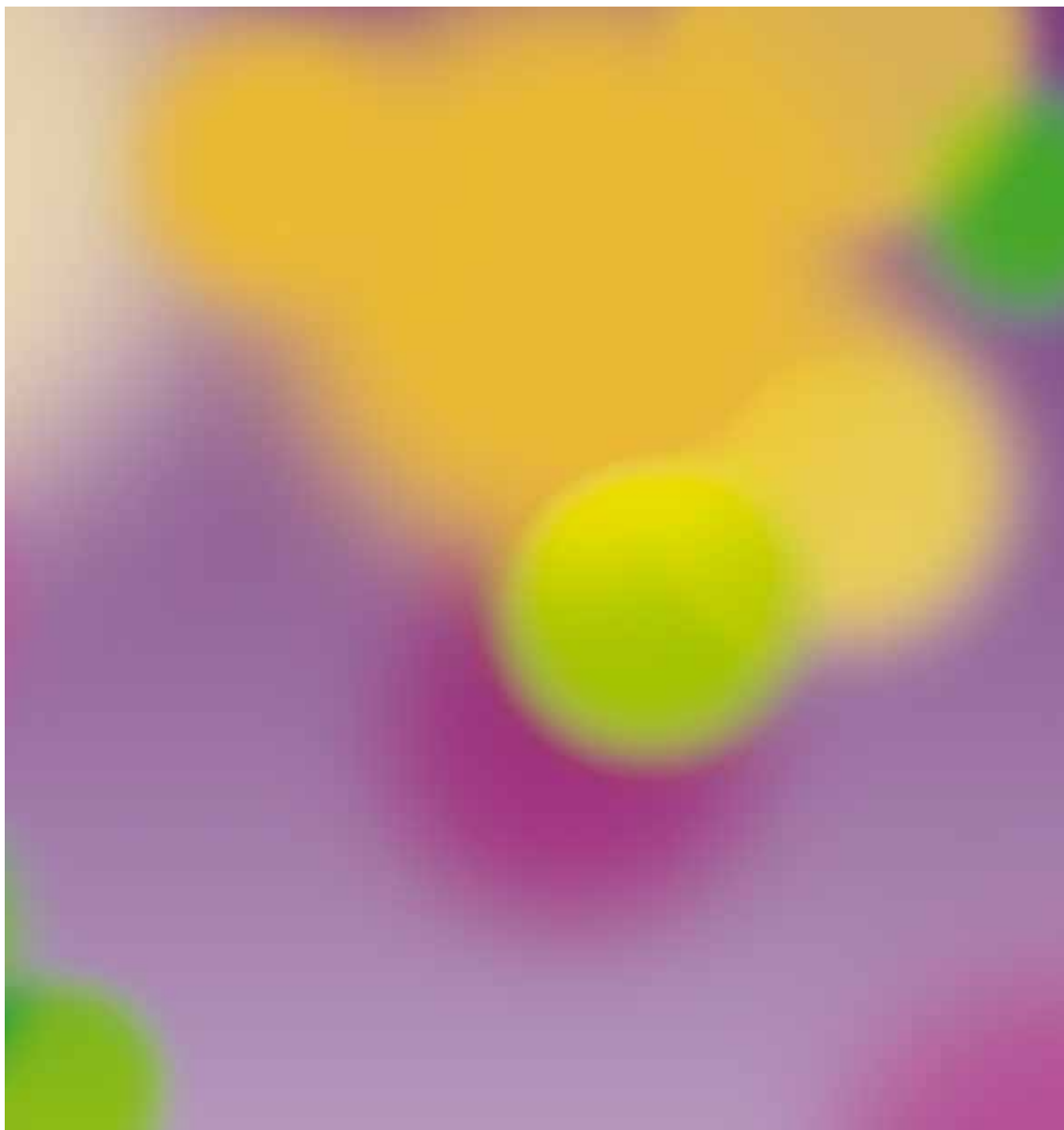
42. Bajou K, Peng H, Laug WE, *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer Cell* 2008; 14 : 324-34
43. Ferno M, Bendahl PO, Borg A, *et al.* Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosols with a luminometric immunoassay. *Eur J Cancer* 1996; 32A : 793-801
44. Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Briand P, *et al.* Plasminogen activator inhibitor type 1 in cytosolic tumor extracts predicts prognosis in low-risk breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1997; 3 : 233-9
45. Duffy MJ, Duggan C, Mulcahy HE, McDermott EW, O'Higgins NJ. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in breast cancer including patients with axillary node-negative disease. *Clin Chem* 1998; 44 : 1177-83
46. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppli JM, *et al.* Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998; 16 : 3129-36
47. Peyrat JP, Vanlemmens L, Fournier J, Huet G, Revillion F, Bonnetterre J. Prognostic value of p53 and urokinase-type plasminogen activator in node-negative human breast cancers. *Clin Cancer Res* 1998; 4 : 189-96
48. Bouchet C, Hacene K, Martin PM, *et al.* Dissemination risk index based on plasminogen activator system components in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17 : 3048-57
49. Broet P, Spyrtos F, Romain S, *et al.* Prognostic value of uPA and p53 accumulation measured by quantitative biochemical assays in 1245 primary breast cancer patients: a multicentre study. *Br J Cancer* 1999; 80 : 536-45
50. Harbeck N, Thomssen C, Berger U, *et al.* Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 54 : 147-57
51. Foekens JA, Peters HA, Look MP, *et al.* The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60 : 636-43
52. Pedersen AN, Christensen IJ, Stephens RW, *et al.* The complex between urokinase and its type-1 inhibitor in primary breast cancer: relation to survival. *Cancer Res* 2000; 60 : 6927-34
53. Malmstrom P, Bendahl PO, Boiesen P, *et al.* S-phase fraction and urokinase plasminogen activator are better markers for distant recurrences than Nottingham Prognostic Index and histologic grade in a prospective study of premenopausal lymph node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19 : 2010-9
54. Sweep CG, Geurts-Moespot J, Grebenschikov N, *et al.* External quality assessment of trans-European multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts. *Br J Cancer* 1998; 78 : 1434-41
55. Look M, van PW, Duffy M, *et al.* Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in breast cancer patients. *Thromb Haemost* 2003; 90 : 538-48
56. Harbeck N, Alt U, Berger U, *et al.* Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, and cathepsins B, D, and L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7 : 2757-64
57. Konecny G, Untch M, Arboleda J, *et al.* Her-2/neu and urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7 : 2448-57
58. Borstnar S, Vrhovec I, Svetic B, Cufer T. Prognostic value of the urokinase-type plasminogen activator, and its inhibitors and receptor in breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* 2002; 3 : 138-46
59. Borstnar S, Vrhovec I, Cufer T. Prognostic value of plasminogen activator inhibitors in breast cancer. *Int J Biol Markers* 2002; 17 : 96-103
60. Castello R, Estelles A, Vazquez C, *et al.* Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in primary breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48 : 1288-95
61. Harbeck N, Kates RE, Look MP, *et al.* Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-

- type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res* 2002; 62 : 4617-22
62. Luqmani YA, Temmim L, Parkar AH, Mathew M. Clinical implications of urokinase and tissue type plasminogen activators and their inhibitor (PAI-1) in breast cancer tissue. *Oncol Rep* 2002; 9 : 645-51
  63. Spyrtos F, Bouchet C, Tozlu S, *et al.* Prognostic value of uPA, PAI-1 and PAI-2 mRNA expression in primary breast cancer. *Anticancer Res* 2002; 22 : 2997-3003
  64. Bouchet C, Ferrero-Pous M, Hacene K, Becette V, Spyrtos F. Limited prognostic value of c-erbB-2 compared to uPA and PAI-1 in primary breast carcinoma. *Int J Biol Markers* 2003; 18 : 207-17
  65. Cufer T, Borstnar S, Vrhovec I. Prognostic and predictive value of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitors PAI-1 and PAI-2 in operable breast cancer. *Int J Biol Markers* 2003; 18 : 106-15
  66. Dazzi C, Cariello A, Maioli P, *et al.* A high cytosol value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) may be predictive of early relapse in primary breast cancer. *Cancer Invest* 2003; 21 : 208-16
  67. Hansen S, Overgaard J, Rose C, *et al.* Independent prognostic value of angiogenesis and the level of plasminogen activator inhibitor type 1 in breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003; 88 : 102-8
  68. Zemzoum I, Kates RE, Ross JS, *et al.* Invasion factors uPA/PAI-1 and HER2 status provide independent and complementary information on patient outcome in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21 : 1022-8
  69. Meo S, Dittadi R, Peloso L, Gion M. The prognostic value of vascular endothelial growth factor, urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in node-negative breast cancer. *Int J Biol Markers* 2004; 19 : 282-8
  70. Leissner P, Verjat T, Bachelot T, *et al.* Prognostic significance of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in lymph node- and hormone receptor-positive breast cancer. *BMC Cancer* 2006; 31 : 216
  71. Biermann JC, Holzscheiter L, Kotzsch M, *et al.* Quantitative RT-PCR assays for the determination of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in primary tumor tissue of breast cancer patients: comparison to antigen quantification by ELISA. *Int J Mol Med* 2008; 21 : 251-9
  72. Descotes F, Riche S, Saez S, *et al.* Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 is the Most Significant of the Usual Tissue Prognostic Factors in Node-Negative Breast Ductal Adenocarcinoma Independent of Urokinase-Type Plasminogen Activator. *Clin Breast Cancer* 2008; 8 : 168-77
  73. Offersen BV, Alsner J, Ege OK, *et al.* A comparison among HER2, TP53, PAI-1, angiogenesis, and proliferation activity as prognostic variables in tumours from 408 patients diagnosed with early breast cancer. *Acta Oncol* 2008; 47 : 618-32
  74. Benraad TJ, Geurts-Moespot J, Grondahl-Hansen J, *et al.* Immunoassays (ELISA) of urokinase-type plasminogen activator (uPA): report of an EORTC/BIOMED-1 workshop. *Eur J Cancer* 1996; 32A : 1371-81
  75. Pechtl A, Harbeck N, Thomssen C, *et al.* Tumor-biological factors uPA and PAI-1 as stratification criteria of a multicenter adjuvant chemotherapy trial in node-negative breast cancer. *Int J Biol Markers* 2000; 15 : 73-8
  76. Harbeck N, Kates RE, Gauger K, *et al.* Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost* 2004; 91 : 450-6
  77. Fisher B, Costantino J, Redmond C, *et al.* A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med* 1989; 320 : 479-84
  78. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, *et al.* Tamoxifen and chemotherapy for lymph node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89 : 1673-82
  79. Fisher B, Jeong JH, Bryant J, *et al.* Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet* 2004; 364 : 858-68
  80. Cronin M, Pho M, Dutta D, *et al.* Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol* 2004; 164 : 35-42

81. Sparano JA. TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx). *Clin Breast Cancer* 2006; 7 : 347-50
82. Marchionni L, Wilson RF, Wolff AC, *et al.* Systematic review: gene expression profiling assays in early-stage breast cancer. *Ann Intern Med* 2008; 148 : 358-69
83. 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 : 2817-26
84. Cobleigh MA, Tabesh B, Bitterman P, *et al.* Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes. *Clin Cancer Res* 2005; 11 : 8623-31
85. 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 : 3315-9
86. Habel LA, Shak S, Jacobs MK, *et al.* A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 2006; 8 : R25
87. 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 : 3726-34
88. Cronin M, Sangli C, Liu ML, *et al.* Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Chem* 2007; 53 : 1084-91
89. Badve SS, Baehner FL, Gray RP, *et al.* Estrogen- and progesterone-receptor status in ECOG 2197: comparison of immunohistochemistry by local and central laboratories and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction by central laboratory. *J Clin Oncol* 2008; 26 : 2473-81
90. Sparano JA, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2008; 26 : 721-8
91. Wolf I, Ben-Baruch N, Shapira-Frommer R, *et al.* Association between standard clinical and pathologic characteristics and the 21-gene recurrence score in breast cancer patients: a population-based study. *Cancer* 2008; 112 : 731-6
92. Goldstein LJ, Gray R, Badve S, *et al.* Prognostic utility of the 21-gene assay in hormone receptor-positive operable breast cancer compared with classical clinicopathologic features. *J Clin Oncol* 2008; 26 : 4063-71
93. Flanagan MB, Dabbs DJ, Brufsky AM, Beriwal S, Bhargava R. Histopathologic variables predict Oncotype DX recurrence score. *Mod Pathol* 2008; 21 : 1255-61
94. Esteban J, Baker J, Cronin M, *et al.* Tumor gene expression and prognosis in breast cancer: Multi-gene RT-PCR assay of paraffin-embedded tissue. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 2003; 20 March 2003; 2003 (abstr 3416)
95. Cobleigh MA, Bitterman P, Baker J, *et al.* Tumor gene expression predicts distant disease-free survival (DDFS) in breast cancer patients with 10 or more positive nodes: High throughput RT-PCR assay of paraffin-embedded tumor tissues. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 2003; 2003; 2003 (abstr 3415)
96. Paik S, Shak S, Tang G, *et al.* Multi-gene RT-PCR assay for predicting recurrence in node negative breast cancer patients-NSABP studies B-20 and B-14. 26th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; 2003 (abstr 82:A16)
97. NCCN. NCCN invasive Breast Cancer Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2007; 5 : 246
98. Albain K, Barlow W, Shak S, *et al.* Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal, node-positive (N+), ER-positive (ER+) breast cancer. SWOG 8814, TBCI 0100. San Antonio Breast Cancer Symposium; 12 January 2007; San Antonio (USA). San Antonio (USA): 2007
99. Goldstein LJ, Gray R, Childs BH, *et al.* Prognostic Utility of 21-Gene Assay in Hormone Receptor (HR) Positive Operable Breast Cancer and 0-3 Positive Axillary Nodes Treated with Adjuvant Chemohormonal Therapy (CHT): An Analysis of Intergroup Trial E2197. *J Clin Oncol, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part 1* 2007; 25 : 526
100. Ramaswamy S, Golub TR. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 2002; 20 : 1932-41
101. Ramaswamy S, Perou CM. DNA microarrays in breast cancer: the promise of

- personalised medicine. *Lancet* 2003; 361 : 1576-7
102. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003; 33 : 49-54
  103. Vantveer LJ, Dai H, van d, V, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415 : 530-6
  104. Bogaerts J, Cardoso F, Buyse M, *et al.* Gene signature evaluation as a prognostic tool: challenges in the design of the MINDACT trial. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3 : 540-51
  105. 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
  106. Buyse M, Loi S, van't VL, *et al.* Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98 : 1183-92
  107. Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, *et al.* Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics* 2006; 7 : 278
  108. Ach RA, Floore A, Curry B, *et al.* Robust interlaboratory reproducibility of a gene expression signature measurement consistent with the needs of a new generation of diagnostic tools. *BMC Genomics* 2007; 7 : 148
  109. Mook S, Schmidt MK, Viale G, *et al.* The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat* 2008;
  110. Thomassen M, Tan Q, Eiriksdottir F, Bak M, Cold S, Kruse TA. Prediction of metastasis from low-malignant breast cancer by gene expression profiling. *Int J Cancer* 2007; 120 : 1070-5
  111. Wittner BS, Sgroi DC, Ryan PD, *et al.* Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort. *Clin Cancer Res* 2008; 14 : 2988-93
  112. Ravdin PM, Siminoff LA, Davis GJ, *et al.* Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19 : 980-91
  113. Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, *et al.* Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23 : 2716-25
  114. Thomassen M, Tan Q, Eiriksdottir F, Bak M, Cold S, Kruse TA. Prediction of metastasis from low-malignant breast cancer by gene expression profiling. *Int J Cancer* 2006; 120 : 1070-5
  115. Janicke F, Schmitt M, Pache L, *et al.* Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 24 : 195-208
  116. Grebenshikov N, Geurts-Moespot A, De WH, *et al.* A sensitive and robust assay for urokinase and tissue-type plasminogen activators (uPA and tPA) and their inhibitor type I (PAI-1) in breast tumor cytosols. *Int J Biol Markers* 1997; 12 : 6-14
  117. Bieche I, Onody P, Laurendeau I, *et al.* Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem* 1999; 45 : 1148-56
  118. Bieche I, Laurendeau I, Tozlu S, *et al.* Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay. *Cancer Res* 1999; 59 : 2759-65
  119. Spyrtos F, Andrieu C, Vidaud D, *et al.* CCND1 mRNA overexpression is highly related to estrogen receptor positivity but not to proliferative markers in primary breast cancer. *Int J Biol Markers* 2000; 15 : 210-4
  120. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6 : 995-1001
  121. Knoop A, Andreassen PA, Andersen JA, *et al.* Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1998; 77 : 932-40
  122. EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer Breast Vancer-Cooperative Group. Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer; report of the second E.O.R.T.C. Workshop, held on 16-17 March, 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Eur J Cancer* 1980; 16 : 1513-5
  123. Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, *et al.* High levels of

- urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 1993; 53 : 2513-21
124. Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, Sweep CG. Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer. *Oncogene* 2003; 22 : 4898-904
125. Luther T, Kotzsch M, Meye A, *et al.* Identification of a novel urokinase receptor splice variant and its prognostic relevance in breast cancer. *Thromb Haemost* 2003; 89 : 705-17
126. Geurts-Moespot J, Leake R, Benraad TJ, Sweep CG. Twenty years of experience with the steroid receptor external quality assessment program - the paradigm for tumour biomarker EQA studies. On behalf of the EORTC Receptor and Biomarker Study Group. *Int J Oncol* 2000; 17 : 13-22
127. Offersten BV, Sorensen FB, Yilmaz M, Knoop A, Overgaard J. Chalkley estimates of angiogenesis in early breast cancer--relevance to prognosis. *Acta Oncol* 2002; 41 : 695-703
128. Urban P, Vuaroqueaux V, Labuhn M, *et al.* Increased expression of urokinase-type plasminogen activator mRNA determines adverse prognosis in ErbB2-positive primary breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24 : 4245-53
129. Hudis CA, Barlow WE, Costantino JP, *et al.* Proposal for standardized definitions for efficacy end points in adjuvant breast cancer trials: the STEEP system. *J Clin Oncol* 2007; 25 : 2127-32



Édité par l'Institut National du Cancer (INCa)

Tous droits réservés - Siren : 185 512 777

Conception/Réalisation : INCa

ISSN 1760-7748

Dépôt légal : Novembre 2009

Pour plus d'informations

[www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)

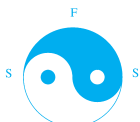


Ce document a été publié avec le soutien financier de la Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer.

Ref. : RAPBIOSEIN09

Institut National du Cancer  
52, avenue André Morizet  
92100 Boulogne-Billancourt

Tél. : 01 41 10 50 00  
Fax : 01 41 10 50 20  
[diffusion@institutcancer.fr](mailto:diffusion@institutcancer.fr)



SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE SÉNOLOGIE  
ET DE PATHOLOGIE MAMMAIRE

