

*COLLÈGE NATIONAL  
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS  
Président : Professeur B. Hédon*

Cinquième partie  
**Pathologies mammaires  
et cancer du sein**



*38<sup>es</sup> JOURNÉES NATIONALES  
Paris, 2014*

# Quand et pourquoi biopsier les rechutes : impacts thérapeutiques

N. RADOSEVIC-ROBIN  
(Clermont-Ferrand)

## Résumé

*Le cancer du sein (CS) de rechute ou métastatique, dit « post-primitif », se développe dans des tissus très différents du tissu de sa localisation initiale, soit parce qu'il s'agit d'un tout autre organe, soit parce que le lit du CS post-primitif a été exposé aux agents anti-cancéreux, soit pour les deux raisons. Influencée par le micro-environnement spécifique de chaque localisation, la pathobiologie du CS peut varier selon les endroits où se trouve la prolifération néoplasique.*

*Néanmoins, la réévaluation des trois seuls marqueurs thérapeutiques et pronostiques (théranostiques) actuels du CS (expression tumorale des récepteurs aux œstrogènes (RCE), à la progestérone (RP) et la présence de surexpression de la protéine ou l'amplification du gène HER2) n'est pas la procédure de routine dans le cadre de rechute ou métastatique. D'autre part, de nombreux travaux ont démontré l'existence des discordances*

Laboratoire de biologie médicale OncoGenAuvergne - Unité de pathologie - Centre Jean Perrin (Centre de lutte contre le cancer d'Auvergne) - 58 rue Montalembert - 63011 Clermont-Ferrand  
ERTICa - Équipe de recherche sur les traitements individualisés des cancers - EA4677 - Université d'Auvergne - 63000 Clermont-Ferrand

Correspondance : [nina.robin@cjp.fr](mailto:nina.robin@cjp.fr) ; [nina.radosevic.robin@gmail.com](mailto:nina.radosevic.robin@gmail.com)

entre le CS primitif (CS-p) et le post-primitif (CS-post-p) au niveau d'expression de ces 3 marqueurs.

Globalement, la fréquence de la discordance entre le CS-p et le CS-post-p est de 18-56 % pour les récepteurs hormonaux, de 10 % pour l'expression de la protéine HER2 et de 5 % pour l'amplification du gène HER2.

L'acquisition du statut « triple négatif » (RCE-/RP-/HER2-) du CS-post-p est le plus péjoratif pour la survie des patientes, car souvent associé à une résistance au traitement. C'est pour cela que dans chaque situation de résistance développée sous traitement anti-hormonal ou anti-HER2, la biopsie de la tumeur traitée ou de celle nouvellement apparue est indiquée afin de reconnaître le plus tôt possible le statut HER2- ou triple négatif.

Nous proposons que chaque CS apparu après le primitif devrait être biopsié sauf dans les cas risqués ou d'une inutilité flagrante de l'acte de la biopsie tels que les métastases viscérales profondes résecables in toto. Un effort doit être déployé pour que l'échantillon du CS-p et celui du CS-post-p soient soumis aux techniques dans les mêmes conditions et simultanément. Pour les cas compliqués, il est souhaitable d'envoyer les deux échantillons dans une institution spécialisée pour l'évaluation des biomarqueurs.

*Mots clés* : cancer, sein, rechutes, métastatique, récepteurs, œstrogène, HER2, discordance, réévaluation

### **Déclaration publique d'intérêt**

Je n'ai aucun lien d'intérêt à déclarer.

## INTRODUCTION

La rechute d'un cancer est définie comme l'apparition des structures néoplasiques ressemblant à la tumeur observée au moment du diagnostic de la malignité, mais après une période de la maladie absente ou maladie stabilisée [1]. Au niveau du site d'apparition, les rechutes peuvent être classifiées comme : a) locales (RL) (dans l'organe même où le cancer primitif a été diagnostiqué ou dans sa proximité, notamment dans les ganglions lymphatiques (GGL) la drainant) ou b) distantes (RD) (établies dans les parties corporelles éloignées du site du cancer primitif). Les rechutes distantes sont connues aussi sous le nom de métastases, lesquelles sont formées par les cellules de la tumeur primitive capables d'établir les structures tumorales en dehors du site de la naissance du néoplasme. Comme déjà mentionné, les rechutes apparaissent à différents moments après la tumeur initiale, mais il ne faut pas oublier qu'il est possible, déjà au moment du diagnostic de la tumeur primaire/primitive, de détecter les structures tumorales, ressemblant fortement à celle-ci, mais localisées à proximité ou à distance. Ces structures sont souvent appelées « les métastases synchrones », et en fait elles sont considérées comme l'extension de la maladie primitive et non comme ses rechutes [2]. Les vraies rechutes sont observées souvent plusieurs mois après le diagnostic de la malignité initiale : on les appelle aussi les métastases asynchrones.

Pendant très longtemps il a été considéré que les rechutes des cancers représentent seulement les « graines » de la tumeur primitive, lesquelles sont pratiquement identiques comme leurs « parents ». Oui, les enfants ressemblent à leurs parents, c'est inévitable, mais ils ont leurs propres caractéristiques aussi ! Parce qu'ils naissent « un bon moment » après les parents, ils vivent « dans une autre époque », et souvent à un endroit très différent de celui où « les parents » sont nés ! Alors il est logique de supposer que, aussi, les rechutes des tumeurs ne sont pas complètement identiques à leurs « sources »... Dans le cas du cancer du sein (CS), les tumeurs initiales se forment dans un organe très spécialisé, fortement soumis aux influences hormonales, tandis que les rechutes peuvent se trouver dans les organes/tissus très différents des glandes mammaires. De plus, les recherches menées pendant la dernière décennie ont démontré que le CS peut être considéré comme une maladie systémique, capable à la fois de répondre à et de changer son micro- et macro-environnement (le corps humain). Sous cet éclairage, chaque structure cancéreuse, primitive ou métastatique est une mosaïque complexe, composée d'éléments tumoraux et d'éléments

(non tumoraux !) de l'hôte. Or, ces associations peuvent bien être hautement spécifiques pour chaque localisation tumorale en dehors du sein [3].

L'évaluation des paramètres influant les décisions thérapeutiques pour le cancer du sein est actuellement principalement focalisée sur la cellule tumorale et ses caractéristiques pathobiologiques. Il s'agit notamment des paramètres connus comme « classiques histologiques » (taille tumorale, type et grade histologique, niveau de prolifération reflété par le compte de mitoses, invasion lympho-vasculaire) et des paramètres « moléculaires fondamentaux », comme l'expression tumorale des récepteurs aux œstrogènes (RCE), à la progestérone (RP), du HER-2 (*Human Epidermoid factor Receptor-2* : le récepteur au facteur humain épidermal de croissance 2) et la fraction proliférative ou l'indice Ki67, déterminée par le pourcentage des cellules tumorales exprimant l'antigène Ki67. Seuls RCE, RP et HER-2 sont considérés aujourd'hui comme les « vrais marqueurs théranostiques » du CS. Les techniques pour leur évaluation sont standardisées au niveau mondial [4-5].

La confirmation histopathologique des rechutes du CS et la réévaluation des marqueurs théranostiques ne sont pas encore introduites en pratique clinique de routine de certaines institutions/praticiens. Néanmoins, de nombreuses études menées pendant ces 30 dernières années ont démontré que l'expression des RCE, RP ou HER-2 peut être discordante entre les CS primitifs (CS-p) et ses rechutes/métastases (CS-r/m). Ainsi, le choix du traitement des CS-r/m basé sur l'expression des RCE, RP ou HER-2 chez le CS-p peut être erroné.

La rechute d'un cancer est une nouvelle dramatique à la fois pour les patientes et pour les soignants. Dans ce contexte arrive la question de réaliser une procédure supposée désagréable, la biopsie de la rechute, et avec cela la question : « Pourquoi encore une souffrance ? »...

Mais quand nous savons qu'il y a aujourd'hui des traitements hautement spécifiques qui peuvent prolonger la vie de nos patients de façon significative, et quand nous disposons des technologies qui peuvent nous indiquer quels/quelles patient(e)s bénéficieront de ces thérapies, connues sous le nom de « thérapies ciblées », le besoin de réévaluer les caractéristiques pathobiologiques des rechutes du cancer du sein s'impose logiquement...

Car, ils ne sont pas toujours identiques, les CS-p et les CS-r/m...

Dans cette synthèse de littérature et la présentation qui la suivra, nous allons vous exposer les données qui le confirment et les dernières recommandations relatives à la réévaluation des biomarqueurs dans le cadre de rechutes du cancer du sein.

La plus grande méta-analyse des discordances d'expression des RCE, RP et HER-2 a été publiée cette année par l'équipe de l'Institut européen d'oncologie à Milan [6]. Cette étude a analysé tous les travaux publiés entre 1983 et 2011 au sujet des changements d'expression de 3 marqueurs théranostiques chez les CS-r/m par rapport au CS-p. Au total, 48 articles ont été analysés, la plupart présentant des études rétrospectives. Les discordances d'expression des RCE, RP ou HER-2 ont été analysées chez 4 200, 2 739 et 2 987 cancers mammaires, respectivement. La fréquence de la discordance a été de 20 % pour les RCE (intervalle de confiance de 95 % IC : 16-35 %), 33 % pour les RP (IC : 29-39 %) et 8 % (IC : 6-10 %) pour HER-2. Les fractions des tumeurs qui ont changé de statut de positif (POS) en négatif (NEG) et de NEG en POS ont été de 24 % et 14 % respectivement pour les RCE ( $p = 0,0183$ ), 46 % et 15 % respectivement pour les RP ( $p < 0,0001$ ) et 13 % et 5 % pour le HER-2 ( $p = 0,0004$ ).

Des auteurs français ont également réalisé une méta-analyse similaire, laquelle a évalué les études des discordances des RCE, RP et HER-2 publiées avant la fin de 2010 (un an de moins que l'étude précédemment mentionnée). Cette analyse a démontré les résultats comparables à ceux obtenus par les chercheurs de Milan : la discordance d'expression des RCE entre le CS-p et le CS-r/m a été observée chez 4-54 % de cas, des RP chez 4-44 % et de HER-2 chez 0-40 % [7].

Nos résultats de l'analyse des différences du statut de HER-2 entre le CS-p et le CS-r/m, comparant 50 études publiées *in extenso* ou sous forme d'abstract (plus de 2 000 patients) jusqu'à fin avril 2011, ont démontré que chez environ 10 % des patientes atteintes de CS le statut de HER-2 variait au cours de la progression de la maladie [8].

Également, la plus grande étude française non bibliographique a comparé les tissus du CS-p et du CS-r/m chez 235 patientes et trouvé 17 %, 29 % et 4 % de la discordance globale d'expression des RCE ( $p = 0,004$ ), RP ( $p = 0,0004$ ) ou HER-2 ( $p = 0,16$ ) [9].

À part les analyses globales des discordances, certaines études se sont occupées plus en détail des 3 aspects particuliers :

- a) différences du statut des RCE, RP ou de HER-2 entre le CS-p et CS-r/m par rapport au site de la rechute (rechutes locales - rechutes distantes) et/ou par rapport au moment de la métastase (métastases synchrones - métastases asynchrones/métachrones) ;
- b) influence des traitements appliqués aux CS-p sur le statut des RCE, RP ou de HER-2 des CS post-primitifs (CS-r/m) ;

- c) changements des décisions thérapeutiques sur la base des discordances du statut des Rœ, RP ou de HER-2 entre le CS-p et CS-r/m.

Dans le texte qui suit, nous allons présenter quelques travaux importants qui ont élaboré les éléments mentionnés sous a), b) et c).

**a) Deux grandes études prospectives** réalisées sur un total de 231 tissus tumoraux de patientes incluses dans les études BRITS (*Breast Recurrence in Tissues Study group*) [10] et DESTINY [11] ont démontré des taux comparables de discordances globales des statuts des Rœ, RP et HER2 entre le CS-p et les rechutes locorégionales et distantes (48,1 % et 51,9 %, respectivement). Les taux de la discordance globale des Rœ, RP ou HER2 entre les CS-p et les CS-r/m ont été également comparables aux études précédentes (12,6 %, 31,2 % et 5,5 %, respectivement, pour tous  $p < 0,001$ ). Néanmoins, il est à noter que les plus grands taux de discordances ont été observés entre le CS-p et les rechutes locorégionales ipsilatérales (44,5 %, étude BRITS), ainsi qu'entre les CS-p et les rechutes distantes osseuses/médullaires (24,5 %, étude DESTINY) ou dans les emplacements différents comme os, foie, poumon ou peau (21 %, étude BRITS).

Une méta-analyse du changement du statut de HER-2 lors de l'évolution du CS qui a analysé les résultats obtenus chez 2 520 patientes, incluses dans 26 études jusqu'à fin de 2010, a retrouvé la discordance globale du statut de HER-2 entre les CS-p et CS-r/m dans 5,5 % (3,6-8,5 %) de cas : ces discordances ont été plus fréquentes entre les CS-p et les CS-r/m distantes (11,5 % ; diapason 6,9-18,6 %) qu'entre les CS-p et les CS-r/m locorégionales (4,1 % ; diapason 2,4-7,2 %) [12].

Peu d'études comportant un grand nombre de patientes ont été publiées relativement aux discordances de statuts des Rœ, RP et/ou HER-2 entre le CS-p et les sites spécifiques du CS-r/m. Aurilio *et coll.* ont analysé, de façon rétrospective, les métastases osseuses et les tumeurs primitives du CS, et observé 20,5 %, 43,9 % et 6,9 % de cas ayant le statut différent des Rœ, RP ou HER-2, respectivement, chez le CS-r/m par rapport au CS-p. En général, la direction du changement a été POS  $\rightarrow$  NEG, du CS-p vers CS-r/m [13].

Curigliano *et coll.* ont retrouvé, chez les tumeurs de 255 patientes, des taux de discordance de 14,5 %, 48,6 % et 13,9 % pour les Rœ, RP ou HER-2, respectivement, quand les CS-p et les CS-r/m hépatiques ont été comparés. Dans cette étude, la direction du changement du statut a été aussi POS  $\rightarrow$  NEG, depuis le CS-p vers le CS-r/m, sauf pour les Rœ qui ont démontré une plus grande expression dans les métastases hépatiques que dans les tumeurs primitives [14].

Localisées dans un « sanctuaire » corporel ayant en plus un micro-environnement très particulier, les métastases cérébrales du CS démontrent souvent l'absence d'expression des marqueurs en question, le plus souvent de HER-2 ou de tous les trois (statut « triple négatif ») [15-16]. Néanmoins, les études des discordances de l'expression des RCE, RP ou HER-2 entre les métastases cérébrales et le cancer primitif du sein sont rares car les prélèvements du tissu métastatique doivent se faire par une biopsie stéréotaxique ou lors d'une autopsie, les deux approches restant encore relativement rares dans la pratique de routine.

Pourtant, l'équipe de pathologistes du *Johns Hopkins Hospital* (Baltimore, États-Unis) a réalisé, depuis 2008, plusieurs comparaisons des profils biologiques comprenant l'expression des RCE, RP et HER-2, des métastases du CS retrouvés dans le même patient, lors d'une autopsie dite « rapide » (1-4 h après le décès). Ces chercheurs ont démontré une hétérogénéité significative au niveau du profil biologique entre les CS-p et ses métastases, mais aussi parmi les différentes métastases du même patient. L'expression des RCE et RP a été fréquemment diminuée dans les CS-m par rapport au CS-p. L'expression de la protéine HER-2 a été différente dans diverses métastases chez 8 des 10 patients analysés, tandis que le niveau de l'amplification du gène HER-2 s'est révélé relativement uniforme entre les différentes métastases du même patient [17].

La plus grande étude comparative des statuts des RCE, RP ou HER-2 entre le CS-p et ses métastases distantes a analysé 233 métastases du CS apparues dans différents sites (76 cutanées, 63 hépatiques, 43 pulmonaires, 44 cérébrales et 7 gastro-intestinales). Quand le seuil de positivité pour les RCE ou RP était de 10 % des cellules tumorales positives, le changement du statut des RCE et RP, dans les CS-m par rapport au CS-p, a été observé chez 10,3 % et 30,0 % des patients, respectivement. Chez 10,7 % des patients le statut RCE+ ou RP+ a changé en RCE-/RP- et chez 3,4 % des patientes le statut a changé de RCE-/RP- en RCE+ ou RP+. Quand le seuil de positivité était de 1 % des cellules tumorales positives, les taux de changement du statut des RCE ou RP ont été de 15,1 % ou 32,6 %, respectivement. La conversion du statut RCE+ ou RP+ en RCE-/RP- a été observée chez 12,4 % et du statut RCE-/RP- en RCE+ ou RP+ chez 8,2 % des patientes. La conversion du statut de HER-2 a été observée chez 5,2 % des patientes. Parmi les 12 tumeurs qui ont démontré le changement du statut de HER-2 au niveau de l'expression protéique (évaluée par l'IHC), 5 ont eu le changement du statut confirmé aussi par l'hybridation *in situ*. Les changements des statuts ont été, pour les RCE et les RP, de positif dans



le CS-p vers négatif dans le CS-m, tandis que pour HER-2, les 2 directions du changement ont été observées. Le changement du statut des RP s'est produit significativement plus fréquemment dans les métastases cérébrales, hépatiques et celles localisées dans le système gastro-intestinal. De plus, la différence du statut des RCE, RP ou HER-2 entre les métastases de la même CS-p a été observée chez 10 %, 30 % et 3,6 % des patients, respectivement. Le statut de HER-2, quand il a été évalué par l'HIS, n'a pas été différent parmi les différentes métastases issues de la même tumeur [18].

Concernant les différences de l'expression des marqueurs thérapeutiques entre le CS-p et le CS-r/m, par rapport au moment de la survenue de la rechute/métastase, les données de la littérature, en général, démontrent une plus grande discordance des statuts entre le CS-p et les CS-r/m asynchrones/métachrones. En analysant de façon prospective une série de 119 cas, Santinelli *et coll.* ont rapporté les variations du statut de HER-2 chez 28,6 % des cas avec les métastases asynchrones et seulement chez 7 % des cas avec les métastases synchrones [19]. Une équipe suédoise qui s'est penchée sur le changement de sous-type moléculaire entre les CS-p et les CS-r/m a observé, dans une série de 524 CS-p, leurs 147 métastases ganglionnaires synchrones et 36 asynchrones, que le sous-type luminal A du CS-p avait évolué en non luminal dans le CS-r/m chez 31 % des patientes, tandis que le changement opposé (luminal B vers luminal A) a été observé chez 18 % des patientes. Par contraste avec les autres auteurs, cette étude a démontré que le changement du statut HER-2 (par l'IHC) a été plus fréquemment NEG → POS, notamment chez 32 % des métastases ganglionnaires synchrones et 50 % des CS-r/m asynchrones. Cette direction a été confirmée par l'HIS : chez 11 % des CS-r/m synchrones et 27 % des CS-r/m asynchrones, il a été observé une amplification du gène HER-2, tandis qu'elle n'a pas été détectée chez le CS-p [20].

**b) Trois grands types de traitements du CS** peuvent influencer la différence entre l'expression des RCE, RP et/ou HER-2 entre les CS-p et les CS-r/m : i) l'hormonothérapie, ciblant les RCE ou RP, ii) les agents ciblant HER-2 (comme le trastuzumab, l'anticorps contre HER-2 ou le lapatinib, l'inhibiteur de l'activité de kinase de HER-2) et iii) les cytotoxiques « classiques ».

Le cadre de l'hormonothérapie est adjuvant, à long terme (plusieurs années), et le changement du statut des RCE et/ou RP peut s'observer pour des métastases apparues pendant ou après le traitement. Dans les deux cas la conversion la plus fréquemment observée est le statut négatif des métastases par rapport au statut positif de la

tumeur primitive, comme démontré dans plusieurs études, mentionnées précédemment.

Dans la plus grande étude publiée (182 patientes) qui a évalué les discordances du statut de HER-2 entre le CS-p et le CS-r/m, Niikura *et coll.* ont observé la perte de la positivité pour HER-2 chez 24 % des patientes, par l'IHC, et chez 11 %, par l'His. Le traitement par le trastuzumab avant la survenue de métastases n'a pas influencé la fréquence de la discordance du statut de HER-2, mais la thérapie par les cytotoxiques a eu une conséquence : chez 27 % des patientes qui ont reçu une chimiothérapie avec, ou sans, du trastuzumab, le statut de HER-2 a été différent dans le CS-r/m par rapport au CS-p, tandis que cela a été observé chez seulement 10 % des patientes qui n'avaient pas reçu de chimiothérapie [21]. Une tendance similaire a été rapportée par Guarneri *et coll.* : la perte de l'expression de HER-2 a été détectée chez 40 % des patientes traitées par la chimiothérapie seule, et seulement chez 14,7 % des patientes ayant reçu une chimiothérapie combinée avec le trastuzumab [22].

Contrairement aux études américaines, la plus grande étude française (269 patients) des discordances du statut des RCE, RP ou HER-2 n'a pas trouvé d'influence de la chimiothérapie sur le changement du statut de HER-2. Par contre, le traitement contenant des anthracyclines a été associé aux changements du statut des RCE [9].

Notre équipe a analysé les changements de sous-type moléculaire du CS traité par une chimiothérapie néoadjuvante (CTNA) dans une série de 123 CS de type luminal A, 67 de type luminal B, 21 HER2+ et 71 CS de type dit triple négatif (TN). Le traitement administré aux patientes contenait, dans la plupart des cas, une combinaison d'anthracyclines et de taxanes. Même si cette étude n'a pas exactement évalué les différences entre le CS-p et le CS-r/m, elle démontre que le sous-type moléculaire du résidu tumoral (RT) de la CS-p change après une CTNA dans un nombre non négligeable des cas : 8 % des CS de type luminal A sont devenus luminal B après la CTNA, tandis que 29 % des luminaux B sont devenus luminaux A. Parmi les CS de type TN avant la CTNA, 35 % sont devenus non TN après le traitement, tandis que 5 % des tumeurs initialement non TN sont devenus TN après la CTNA [23]. En sachant que les métastases sont souvent engendrées par les cellules du RT, nous pouvons nous attendre à un statut des marqueurs théranostiques du CS-r/m différent par rapport au CS-p, si ce dernier a été traité par une CTNA contenant des cytotoxiques.

Une synthèse montrant les types dominants du changement du statut des RCE, RP ou HER-2 par rapport au site métastatique et au moment de la survenue de métastase est présentée par le tableau I.

Tableau I - Synthèse des données de la littérature, présentant les changements dominants de statut des RCE, RP et HER-2 chez les CS-r/m par rapport au CS-p

	Discordance dominante entre le CS primitif et le post-primitif			
	RCE	RP	HER2 protéine expression	HER2 gène amplification
<b>Sans traitement</b>				
Métastase locale synchrone	=	=	↑	↑
Rechute locale asynchrone	=	↓	↑	↑
Métastase à distance asynchrone	↓ foie ↑ ↓	↓	↑ cerveau ↓	↑ cerveau ↓
<b>Traitement par les agents cytotoxiques</b>				
Métastase locale synchrone	=	=	=	=
Rechute locale asynchrone	=	↓	↓	↓
Métastase à distance asynchrone	↓	↓	↓	↓
<b>Traitement par les agents anti-hormonaux</b>				
Métastase locale synchrone	=	=	données insuffisantes	
Rechute locale asynchrone	↓	↓	données insuffisantes	
Métastase à distance asynchrone	↓	↓	données insuffisantes	
<b>Traitement par les agents anti-HER2</b>				
Métastase locale synchrone	=	=	↓	↓
Rechute locale asynchrone	=	=	↓	↓
Métastase à distance asynchrone	↓	↓	↓	↓

résultats compilés des PubMed ID : 17973263, 21105765, 20628810, 20939012, 22267852, 22124109, 22212746, 23002281, 23723333, 23807420, 24013581, 24114857, 23327413

c) **Plusieurs auteurs ont analysé** l'influence de la conversion du statut des RCE, RP et/ou HER-2 dans les CS-r/m sur la survie des patientes. L'équipe du MD Anderson Center a démontré que la perte d'expression de ces récepteurs est le facteur péjoratif majeur pour la survie : les patientes dont la tumeur est devenue « triple négative » ont eu la survie globale la plus courte (médiane de 59,3 mois) tandis que les patientes sans changement d'expression des récepteurs dans les CS-r/m ont eu une survie globale 2 fois plus longue (médiane de 119,2 mois) [21]. De façon similaire, Guarneri *et coll.* ont rapporté que les patientes ayant perdu l'expression de HER-2 dans les CS-r/m après une CTNA contenant du trastuzumab avaient un risque de rechute significativement plus élevé (HR 2,41 ; p = 0,063) [22]. Également, l'étude de Macfarlane *et coll.* a démontré que les patientes dont le CS-p a été RCE+ et le CS-r/m RCE- avaient significativement la survie

sans rechute la plus courte (1,3 année) par rapport aux patientes qui n'avaient pas eu de changement du statut des RCE (4,2 ans) [24]. Dans notre propre série de CS-p traités par une CTNA, la survie globale des patientes dont le RT après la CTNA est devenu « triple négatif » a été significativement plus courte que celle des patientes avec le RT non TN (49 % et 74 % de survie à 10 ans, respectivement,  $p = 0,000026$ ) [23]. Cela indique que le statut TN des CS-r/m est très péjoratif pour la survie sans rechute et la survie globale des patientes souffrant d'un CS.

Les raisons des différences d'expression des biomarqueurs entre les CS-p et les CS-r/m peuvent être regroupées en i) techniques et ii) biologiques.

### *i) Techniques*

Quand on estime la fréquence globale de variation du statut d'un ou plusieurs biomarqueurs, il faut être conscient, avant tout, que le nombre de patientes analysées va déterminer ces fréquences. En parcourant les données de la littérature publiées jusqu'à juin 2011, nous avons remarqué que l'inclusion de plus de 100 cas dans l'étude a réduit du simple au double le taux de discordance du statut HER-2 [8]. À part la taille de l'étude, les facteurs techniques influant le niveau des discordances étaient aussi les variations dans le concept et la réalisation technique de l'étude (hétérogénéité des sites métastatiques inclus, erreur d'échantillonnage) [25, 26].

En ce qui concerne les techniques de conditionnement des tissus, ainsi que la réalisation et interprétation des marquages, les discordances d'expression des RCE, RP et/ou HER-2 entre le CS-p et le CS-r/m peuvent être provoquées aux trois étapes cruciales : pré-analytique, analytique et post-analytique.

Comme l'His, l'IHC est connue pour sa plus grande variabilité technique par rapport aux techniques d'analyse du statut génique. Les variations dans les résultats de l'IHC peuvent provenir de différences dans la fixation des tissus et/ou du taux de récupération de l'antigène [27]. Le temps d'ischémie froide, le type et la durée de fixation, les anticorps ainsi que les méthodes de visualisation utilisées diffèrent selon les laboratoires et sont les raisons principales des discordances d'expression des biomarqueurs quand l'échantillon du CS-p et celui du CS-r/m ne sont pas réalisés dans le même laboratoire [28]. Le besoin de standardisation stricte des techniques IHC de détection des RCE, RP et HER-2 a été souligné dans les dernières recommandations du Collège américain des pathologistes (CAP) et ses directives doivent,

entre autres, réduire sinon éliminer l'impact des techniques de marquage des protéines tissulaires sur la détection des biomarqueurs protéiques [29, 30]. D'autre part, le développement de méthodes d'IHC quantitatives peut permettre d'avoir un meilleur aperçu des modifications des marqueurs protéiques durant la progression tumorale : c'est ce qu'indique une des études dans laquelle l'expression de la protéine HER-2 a été démontrée globalement deux fois plus élevée dans les métastases ganglionnaires que dans le site primaire par la méthode AQUA (*Automated QUantitative Analysis*) [31].

L'HIS s'est montrée plus précise et quantitative pour déterminer et comparer les statuts HER-2 [32] mais elle comporte aussi des risques, notamment de fausse négativité, dans l'estimation du niveau d'amplification. Elle peut être, par exemple, provoquée par les endommagements de l'ADN pendant la décalcification des échantillons d'infiltrats osseux [33]. Également, le score HER2/CEP aurait pu être mal calculé. Récemment, il a été démontré que dans le CS, la région du centromère du chromosome 17 pouvait être amplifiée en l'absence d'une authentique polysomie du même chromosome [34-36]. Ainsi le diviseur du score HER2/CEP peut être faussement grand, rendant le score faussement petit. L'estimation simultanée (« multiplex ») du niveau d'expression génique de HER-2 et des gènes dans la région du centromère du chromosome 17, par la PCR quantitative, a démontré dans l'étude de Fabi *et coll.* qu'une augmentation significative du nombre de copies du gène HER2 pouvait exister dans environ 10 % de métastases du CS [37].

## ii) *Biologiques*

Les raisons biologiques des discordances d'expression des biomarqueurs entre le CS-p et le CS-r/m sont l'hétérogénéité intratumorale et la sélection de clones sous la pression thérapeutique ou micro-environnementale [7, 28].

L'hétérogénéité a été observée dans 5 à 50 % des cas de CS, principalement dans ceux avec une expression faible de HER-2 [38, 39]. Dans ces cas, l'existence de polysomie et/ou aneuploïdie du chromosome 17, en absence d'amplification de HER2, engendre des statuts HER2 faussement positifs et, en conséquence, des calculs erronés de comparaison des statuts entre les sites primaires et métastatiques. Pour pallier le problème de l'hétérogénéité intratumorale, il est recommandé, si le statut HER2 est déterminé sur la biopsie du CS, de le déterminer à nouveau sur plusieurs échantillons de la tumeur entière (pièce opératoire) [40]. L'existence de l'oligoclonalité et de l'hétérogénéité, notamment de l'expression de HER-2, expliquerait également

la conversion de statut du récepteur dans les métastases apparaissant après traitement. Chez les patientes traitées par le trastuzumab en situation adjuvante et néoadjuvante, il est possible d'avoir une métastase HER-2-négative, soit par l'expansion des clones initialement HER-2-négatives et ainsi non affectées par le traitement, soit par des cellules HER-2-positives résistant au médicament, capables de subir une transformation épithélio-mésenchymateuse et donc de devenir HER-2 négatives [41-43]. Certaines données précliniques indiquent que la perte de l'antigène HER-2 (protéine HER-2 sur la surface cellulaire) peut survenir sous l'effet de la pression immunitaire. Ainsi, les lymphocytes T sécréteurs d'interféron-gamma HER-2-spécifique ont été démontrés induire une perte d'antigène HER-2 ou une régulation négative du récepteur, cette dernière pouvant faciliter l'émergence d'une variante tumorale invasive HER2-négative [44]. L'influence des facteurs environnementaux sur l'expression de HER-2 de certains infiltrats métastatiques du CS a été récemment évoquée [45].

Il reste à déterminer l'importance de la grande discordance du statut HER-2 observée entre les CS-p et les cellules tumorales circulantes (CTC). Une standardisation d'estimation du statut de HER-2 des CTC s'impose car, fréquemment, les cas discordants publiés avaient soit le statut HER-2 ou le nombre de CTC proches de la limite basse de la définition de positivité [46, 47]. Étant vraisemblablement influencé par le traitement reçu, la quantité des CTC et leur statut de HER-2 devraient être déterminés de façon cinétique (avant et à plusieurs délais après le traitement). Les nouvelles méthodes de détection des CTC apportent l'espoir que l'analyse biopathologique de ces cellules pourrait devenir une « biopsie liquide » facilement réalisable en temps réel, et que leur statut HER-2 indiquerait, au moins partiellement, le risque la survenue des métastases ainsi que leur statut des biomarqueurs [48].

L'ensemble des données publiées au sujet des discordances du statut des biomarqueurs théranostiques actuels du cancer du sein (RĈ, RP et HER2) indique que dans 10 % à 20 % des cas de CS-r/m, la décision thérapeutique a pu être changée si les CS-r/m ont été biopsiés et l'expression des biomarqueurs réévaluée.

L'acquisition du statut « triple négatif » (RĈ-/RP-/HER2-) du CS-p lors d'un traitement ciblé (anti-hormonal ou anti-HER2) ou bien du CS-r/m survenu après est le plus péjoratif pour la survie des patientes car associé, dans la plupart des cas, à une résistance au traitement ciblé utilisé auparavant. C'est pour cela que dans chaque

situation de résistance développée « sous traitement », la biopsie de la tumeur traitée ou de celle nouvellement apparue est indiquée afin de reconnaître le plus tôt possible le statut HER2- ou TN. Comme la perte d'expression des RCE est associée à la résistance aux agents anti-hormonaux, l'une des indications les plus importantes de re-biopsie est le développement précoce de la résistance aux anti-œstrogènes ou l'apparition de la maladie métastatique lorsque la patiente est encore sous traitement anti-hormonal [49].

La décision de biopsier ou pas une rechute ou une métastase du CS est basée sur la balance entre risque que cette intervention peut provoquer à la patiente et le bénéfice que le traitement adapté à la rechute/métastase peut rapporter. Deux études récentes prospectives ont démontré que les biopsies du CS-r/m peuvent être réalisées sans danger dans un très grand nombre de cas et que les patientes même recommandent les unes aux autres d'accepter les biopsies dites « de recherche » [50, 51].

À notre avis, il existe suffisamment de données pour soutenir la recommandation de biopsier tous les CS-r/m et de réévaluer le statut des biomarqueurs. Néanmoins, la re-biopsie devrait être évitée quand la procédure est visiblement plus risquée qu'utile, comme par exemple dans le cas des métastases viscérales profondes qui vont subir une exérèse chirurgicale (ainsi les caractéristiques biopathologiques de la métastase peuvent être évaluées sur la tumeur entière) [52].

En ce qui concerne l'organisation des prélèvements et de leur préparation pour l'analyse biopathologique, l'effort doit être déployé pour obtenir un échantillon de la tumeur primitive au moment de réévaluation des biomarqueurs à cause de la tumeur récurrente et/ou métastatique. Cela doit être appliqué en particulier quand le diagnostic du CS-p et du CS-r/m n'a pas été fait dans le même établissement. Dans les cas compliqués, les techniques pour la détection des marqueurs ainsi que leur interprétation peuvent être réalisées, sous demande d'avis, dans une institution spécialisée, qui analyse un grand nombre de cas par an. Cela engendre, sans doute, un coût supplémentaire, mais il sera largement compensé par le bénéfice des traitements adaptés aux tumeurs récurrentes/métastatiques. Enfin, les études prospectives comparant les tissus des cancers du sein primitifs et de leurs rechutes/métastases sont indispensables non seulement pour une meilleure compréhension des altérations phénotypiques et génotypiques de la cellule tumorale, mais aussi du rapport entre la tumeur et son microenvironnement. Ce dernier a été évoqué, dans plusieurs études récentes, comme le contrôleur majeur de la progression tumorale et du développement de la résistance aux traitements anticancéreux [53].

## CONCLUSION

Les études rétrospectives et prospectives ont démontré des différences substantielles de statut des RCE, RP et HER2 entre le cancer du sein primitif et récurrent/métastatique. Sur cette base, nous recommandons en concordance avec les recommandations internationales récemment publiées [54] que les cancers du sein récurrents ou métastatiques doivent être re-biopsiés et l'expression des biomarqueurs réévaluée en routine.

La collecte en routine d'échantillons tissulaires des tumeurs métastatiques permettrait aussi l'établissement de bio-banques des métastases, une action qui a déjà commencé dans certains pays [55]. Dans l'avenir, l'avancement du développement des thérapies ciblées et des approches personnalisées aux malades sera largement dépendant de la disponibilité des tissus des cancers métastatiques pour la recherche translationnelle, laquelle mènera vers la création de médicaments spécifiques pour le cancer progressif et/ou métastatique [56].

### ***Remerciements***

*À Madame le Docteur Jocelyne Jacquemier, pour son expérience qu'elle m'a généreusement transmise lors de mes études de pathologie moléculaire, à l'Institut Paoli-Calmettes de Marseille (2010-2011).*

*À Madame le Professeur Frédérique Penault-Llorca pour m'avoir confié le sujet du présent cours.*



## Bibliographie

- [1] Tomin R, Donegan WL. Screening for recurrent breast cancer. Its effectiveness and prognostic value. *J Clin Oncol* 1987;5:62-7.
- [2] Güth U, Magaton I, Huang DJ, Fisher R, Schötzau A, Vetter M. Primary and secondary distant metastatic breast cancer: two sides of the same coin. *Breast* 2014;23:26-32.
- [3] Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med* 2013;274:113-26.
- [4] Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Vischer D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:e48-72.
- [5] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:241-56.
- [6] Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, Bagnardi V, Viale G, Curigliano G, Adamoli L, Munzone E, Scandivasci A, De Vita F, Goldhirsch A, Nolè F. A meta-analysis of estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer* 2014;50:277-89.
- [7] Jacot W, Poudroux S, Bibeau F, Leaha C, Chateau MC, Chapelle A, Romieu G. Hormone receptors and HER-2 changes during breast cancer progression: clinical implications. *Bull Cancer* 2011;98:1059-70 [French].
- [8] Radosevic-Robin N. Les modifications possibles du statut de HER2 des cancers du sein au cours de l'évolution métastatique. Mémoire de validation du Diplôme InterUniversitaire en pathologie moléculaire. Superviseur : Dr Jocelyne Jacquemier. Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine, Marseille, 2011.
- [9] Curtit E, Nerich V, Mansi L, Chaigneau L, Cals L, Villanueva C, Bazan F, Montcuquet P, Meneveau N, Perrin S, Algros MP, Pivot X. Discordances in estrogen receptor status, progesterone receptor status, and HER2 status between primary breast cancer and metastasis. *Oncologist* 2013;18:667-74.
- [10] Thompson AM, Jordan LB, Quinlan P, Anderson E, Skene A, Dewar JA, Purdie CA; Breast Recurrence in Tissues Study Group. Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the Breast Recurrence In Tissues Study (BRITS). *Breast Cancer Res* 2010;2:R92.
- [11] Amir E, Miller N, Geddie W, Freedman O, Kassam F, Simmons C, Oldfield M, Dranitsaris G, Tomlinson G, Laupacis A, Tannock IF, Clemons M. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:587-92.
- [12] Houssami N, Macaskill P, Balleine RL, Bilous M, Pegram MD. HER2 discordance between primary breast cancer and its paired metastasis: tumor biology or test artifact? Insights through meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2011;129:659-74.
- [13] Aurilio G, Monfardini L, Rizzo S, Scandivasci A, Preda L, Bagnardi V, Disalvatore D, Pruneri G, Munzone E, Della Vigna P, Renne G, Bellomi M, Curigliano G, Goldhirsch A, Nolè F. Discordant hormone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 status in bone metastases compared to primary breast cancer. *Acta Oncol* 2013;52:1649-56.

- [14] Curigliano G, Bagnardi V, Viale G, Fumagalli L, Rotmensz N, Aurilio G, Locatelli M, Pruneri G, Giudici S, Bellomi M, Della Vigna P, Monfardini L, Orsi F, Nolè F, Munzone E, Goldhirsch A. Should liver metastases of breast cancer be biopsied to improve treatment choice? *Ann Oncol* 2011;22:2227-33.
- [15] Fuchs IB, Loebebecke M, Buhler H, Stoltenburg-Didinger G, Heine B, Lichtenecker W, Schaller G. HER2 in brain metastases: issues of concordance, survival, and treatment. *J Clin Oncol* 2002;20:4130-3.
- [16] Lear-Kaul KC, Yoon HR, Kleinschmidt-DeMasters BK, McGavran L, Singh M. Her-2/neu status in breast cancer metastases to the central nervous system. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1451-7.
- [17] Wu JM, Fackler MJ, Halushka MK, Molavi DW, Taylor ME, Teo WW, Griffin C, Fetting J, Davidson NE, De Marzo AM, Hicks JL, Chitale D, Ladanyi M, Sukumar S, Argani P. Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clin Cancer Res* 2008;14:1938-46.
- [18] Hoefnagel LD, van de Vijver MJ, van Slooten HJ, Wesseling P, Wesseling J, Westenend PJ, Bart J, Seldenrijk CA, Nagtegaal ID, Oudejans J, van der Valk P, van der Groep P, de Vries EG, van der Wall E, van Diest PJ. Receptor conversion in distant breast cancer metastases. *Breast Cancer Res* 2010;12:R75.
- [19] Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer* 2008;122:999-1004.
- [20] Falck AK, Bendahl PO, Chebil G, Olsson H, Ferno M, Ryden L. Biomarker expression and St Gallen molecular subtype classification in primary tumours, synchronous lymph node metastases and asynchronous relapses in primary breast cancer patients with 10 years' follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2013;140:93-104.
- [21] Niikura N, Liu J, Hayashi N, Mittendorf EA, Gong Y, Palla SL, Tokuda Y, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Ueno NT. Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol* 2012;30:593-9.
- [22] Guarneri V, Dieci MV, Barbieri E, Piacentini F, Omarini C, Ficarra G, Bettelli S, Conte PF. Loss of HER2 positivity and prognosis after neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer patients. *Ann Oncol* 2013;24:2990-4.
- [23] Penault-Llorca F, Abrial C, Wang-Lopez Q, Dauplat MM, Cayre A, Radosevich-Robin N, Mouret-Reynier MA, Chollet P, Nabholz JM. Changes in the immunohistochemically-defined molecular subtypes of breast cancer during neoadjuvant chemotherapy: impact on prognosis of 282 patients in a 10-year follow-up study. United States and Canada Academy of Pathology (USCAP) Annual Meeting, March 1-7, 2014, San Diego, USA. *Lab Invest* 2014;94(1):75A, abstract 291.
- [24] Macfarlane R, Seal M, Speers C, Woods R, Masoudi H, Aparicio S, Chia SK. Molecular alteration between the primary breast cancer and the subsequent locoregional/metastatic tumor. *Oncologist* 2012;17:172-8.
- [25] Pusztai L, Viale G, Kelly CM, Hudis CA. Estrogen and HER-2 receptor discordance between primary breast cancer and metastasis. *Oncologist* 2010;5:1164-8.
- [26] Arslan C, Sari E, Aksoy S, Altundag K. Variation in hormone receptor and HER-2 status between primary and metastatic breast cancer: review of the literature. *Expert Opin Ther Targets* 2011;15:21-30.
- [27] Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008;21(2):S8-S15.
- [28] Gong Y. Significance of biomarker discordance in breast cancer from the pathologist's perspective. *Cancer Biomark* 2013;12:207-18.
- [29] Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torklakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of

estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:e48-72.

[30] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med* 2014 Feb;138(2):241-56.

[31] Aitken SJ, Thomas JS, Langdon SP, Harrison DJ, Faratian D. Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases. *Ann Oncol* 2010;21:1254-61.

[32] Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. *Am J Clin Pathol* 2008;129:263-73.

[33] Regitnig P, Schippinger W, Lindbauer M, Samonigg H, Lax SF. Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas. *J Pathol* 2004;203:918-26.

[34] Marchiò C, Lambros MB, Gugliotta P, Di Cantogno LV, Botta C, Pasini B, Tan DS, Mackay A, Fenwick K, Tamber N, Bussolati G, Ashworth A, Reis-Filho JS, Sapino A. Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis. *J Pathol* 2009;219:16-24.

[35] Yeh IT, Martin MA, Robetorye RS, Bolla AR, McCaskill C, Shah RK, Gorre ME, Mohammed MS, Gunn SR. Clinical validation of an array CGH test for HER2 status in breast cancer reveals that polysomy 17 is a rare event. *Mod Pathol* 2009;22:1169-75.

[36] Moelans CB, de Weger RA, van Diest PJ. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect HER2 amplification in breast cancer: new insights in optimal cut-off value. *Cell Oncol* 2010;32:311-2.

[37] Fabi A, Di Benedetto A, Metro G, Perracchi L, Nisticò C, Di Filippo F, Ercolani C, Ferretti G, Melucci E, Buglioni S, Sperduti I, Papaldo P, Cognetti F, Mottolese M. HER2

Protein and Gene Variation between Primary and Metastatic Breast Cancer: Significance and Impact on Patient Care. *Clin Cancer Res* 2011;17:2055-64.

[38] Moeder CB, Giltman JM, Harigopal M, Molinaro A, Robinson A, Gelmon K, Huntsman D, Camp RL, Rimm DL; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Quantitative justification of the change from 10 % to 30 % for human epidermal growth factor receptor 2 scoring in the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines: tumor heterogeneity in breast cancer and its implications for tissue microarray based assessment of outcome. *J Clin Oncol* 2007;25: 5418-25.

[39] Brunelli M, Manfrin E, Martignoni G, Miller K, Remo A, Reghellin D, Bersani S, Gobbo S, Eccher A, Chilosì M, Bonetti F. Genotypic intratumoral heterogeneity in breast carcinoma with HER2/neu amplification: evaluation according to ASCO/CAP criteria. *Am J Clin Pathol* 2009;131:678-82.

[40] Wu JM, Halushka MK, Argani P. Intratumoral heterogeneity of HER-2 gene amplification and protein overexpression in breast cancer. *Hum Pathol* 2010;41:914-7.

[41] Cottu PH, Asselah J, Lae M, Pierga JY, Diéras V, Mignot L, Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer. *Ann Oncol* 2008;19:595-7.

[42] Freudenberg JA, Wang Q, Katsumata M, Drebin J, Nagatomo I, Greene MI. The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies. *Exp Mol Pathol* 2009;87:1-11.

[43] Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, Cook K, Meth J, Kendall J, Riggs M, Eberling Y, Troge J, Gruber V, Levy D, Lundin P, Månér S, Zetterberg A, Hicks J, Wigler M. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome Res* 2010 Jan;20(1):68-80.

[44] Kmiecik M, Knutson KL, Dumur CL, Manjili MH. HER-2/neu antigen loss and relapse of mammary carcinoma are actively induced by T cell-mediated anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol* 2007;37:675-85.

[45] Magnifico A, Albano L, Campaner S, Delia D, Castiglioni F, Gasparini P, Sozzi G,

Fontanella E, Menard S, Tagliabue E. Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clin Cancer Res* 2009;15:2010-21.

[46] Pestrin M, Bessi S, Galardi F, Truglia M, Biggeri A, Biagioni C, Cappadona S, Biganzoli L, Giannini A, Di Leo A. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009;118:523-30.

[47] Somlo G, Lau SK, Frankel P, Hsieh HB, Liu X, Yang L, Krivacic R, Bruce RH. Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage IV breast cancer, using a novel detection technology. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128:155-63.

[48] Criscitiello C, Sotiriou C, Ignatiadis M. Circulating tumor cells and emerging blood biomarkers in breast cancer. *Curr Opin Oncol* 2010;22:552-8

[49] Sharma A, Crook T, Thompson A, Palmieri C. Surgical oncology: why biopsying metastatic breast cancer should be routine. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:72-4.

[50] Amir E, Miller N, Geddie W, Freedman O, Kassam F, Simmons C, Oldfield M, Dranitsaris G, Tomlinson G, Laupacis A, Tannock IF, Clemons M. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:587-92.

[51] Vaz-Luis I, Zeghibe CA, Frank ES, Sohl J, Washington KE, Silverman SG, Fonte JM,

Mayer EL, Overmoyer BA, Richardson AL, Krop IE, Winer EP, Lin NU. Prospective clinical experience with research biopsies in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2013;142:203-9.

[52] Foukakis T, Åström G, Lindström L, Hatschek T, Bergh J. When to order a biopsy to characterise a metastatic relapse in breast cancer. *Ann Oncol* 2012;23(10):349-53.

[53] Correia AL, Bissell MJ : The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resist Updat* 2012;15:39-49.

[54] Penault-Llorca F, Coudry RA, Hanna WM, Osamura RY, Riischoff J, Viale G. Experts' opinion: Recommendations for retesting breast cancer metastases for HER2 and hormone receptor status. *Breast* 2013;22:200-2.

[55] Diaz Z, Aguilar-Mahecha A, Paquet ER, Basik M, Orain M, Camlioglu E, Constantin A, Benlimame N, Bachvarov D, Jannot G, Simard MJ, Chabot B, Gologan A, Klinck R, Gagnon-Kugler T, Lespérance B, Samson B, Kavan P, Alcindor T, Dalfen R, Lan C, Chabot C, Buchanan M, Przybytkowski E, Qureshi S, Rousseau C, Spatz A, Têtu B, Batist G. Next-generation biobanking of metastases to enable multidimensional molecular profiling in personalized medicine. *Mod Pathol* 2013 Nov;26(11):1413-24.

[56] Criscitiello C, André F, Thompson AM, De Laurentis M, Esposito A, Gelao L, Fumagalli L, Locatelli M, Minchella I, Orsi F, Goldhirsch A, Curigliano G. Biopsy confirmation of metastatic sites in breast cancer patients: clinical impact and future perspectives. *Breast Cancer Res* 2014;16(2):205.