



HAL
open science

Le cancer du sein chez les femmes jeunes : Etude de facteurs pronostiques chez des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif : Etude de la ménopause chimio-induite et de ses conséquences chez les femmes jeunes atteintes d'un cancer du sein non métastatique

Sejdi Lusho

► **To cite this version:**

Sejdi Lusho. Le cancer du sein chez les femmes jeunes : Etude de facteurs pronostiques chez des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif : Etude de la ménopause chimio-induite et de ses conséquences chez les femmes jeunes atteintes d'un cancer du sein non métastatique. Cancer. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC118 . tel-04141566

HAL Id: tel-04141566

<https://theses.hal.science/tel-04141566>

Submitted on 26 Jun 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ - AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT

THÈSE

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne pour obtenir le grade de Docteur d'Université

Mention : Biologie santé

Spécialité : Physiologie, pathologie (oncologie)

Soutenu publiquement le 21/09/2021

Sejdi LUSHO

LE CANCER DU SEIN CHEZ LES FEMMES JEUNES :

- ❖ Etude de facteurs pronostiques chez des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif.
- ❖ Etude de la ménopause chimio-induite et de ses conséquences chez les femmes jeunes atteintes d'un cancer du sein non métastatique.

Rapporteurs : Pr Sylvain LADOIRE, Centre Georges François LECLERC, Dijon
Pr Thierry PETIT, Institut de cancérologie (ICANS), Strasbourg

Directrices de thèse : Dr Catherine ABRIAL, Centre Jean PERRIN, Clermont-Ferrand
Dr Nina RADOSEVIC, Centre Jean PERRIN, Clermont-Ferrand

Membres : Dr Marie-Ange MOURET-REYNIER, CJP, Clermont-Ferrand
Pr Joseph GLIGOROV, Hôpital TENON, Paris (président du jury de soutenance)

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon projet doctoral et qui m'ont aidé et soutenu tout au long de ce parcours.

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de mon jury de thèse, qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail. Je remercie particulièrement le Pr Sylvain LADOIRE et le Pr Thierry PETIT, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Pr Joseph GLIGOROV, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance à mes deux directrices de thèse, Mme Catherine ABRIAL et Mme Nina RADOSEVIC. Merci à toi Catherine, de m'avoir guidé, conseillé et veillé sur moi depuis mon stage de Master 2 et tout au long de ces trois années de thèse. Merci pour ta disponibilité, tes précieux conseils et pour la confiance que tu as toujours eu en moi. Merci aussi de m'avoir appris la recherche clinique et le métier de chef de projet.

Je tiens à remercier également Nina, la maman ourse (des Balkans), pour le temps qu'elle a pris à m'apprendre la recherche scientifique, à répondre à mes questions et à évaluer mon travail. Merci pour tous les conseils et les encouragements. Хвала вам, Нина !

Je remercie le Dr Marie-Ange MOURET-REYNIER, coordonnatrice de l'étude MENOCOR et co-encadrante de mon projet doctoral, d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions et pour ses précieux conseils de clinicienne.

Je remercie le Pr Xavier DURANDO, coordonnateur de l'étude PERCEPTION et Directeur de la Division de Recherche Clinique du Centre Jean PERRIN, pour l'accueil au sein du service, sa confiance et ses conseils. Je tiens à remercier aussi la Pre Frédérique PENAULT-LLORCA, Directrice Générale du Centre Jean PERRIN, de m'avoir conseillé sur mes travaux et mon jury de thèse.

Un merci particulier pour Judith, cheffe de projet et ma tutrice de stage de Master 2, de m'avoir formé dans la recherche clinique et l'essai MENOCOR.

Je remercie particulièrement la Ligue contre le cancer et l'association Clermont en Rose, d'avoir accepté de financer les projets MENOCOR et PERCEPTION.

Je remercie Ioana MOLNAR, biostatisticienne, d'avoir effectué l'analyse statistique dans le cadre de ma recherche et pour sa disponibilité dans la gestion de la base de données et des CRF de mes autres projets. Je remercie également Emilie THIVAT, cheffe de projet, pour tous ses conseils sur la gestion financière de mes projets de thèse.

Un grand merci pour mes deux collègues de bureau, Hugo et Mélanie, pour leur grand soutien, les discussions et les sorties que nous avons eu ensemble.

Je remercie également le reste de l'équipe de la Recherche Clinique : Isa, Ghislaine, Angeline, Alexia, Marie, Rodolphe, Marlène, Hamza, Adeline, Emilie V et Delphine. Je remercie aussi toutes les stagiaires que j'ai pu encadrer tout au long de ma thèse : Juliette BIJOUX, Mouna SADAANI, Clotilde FRAISSE, Khadidja KHELFI et Manon BARAILLE.

Je tiens à remercier toutes les personnes travaillant au Centre Jean PERRIN, avec qui j'ai été amené à collaborer pour mes projets. Un remerciement particulier pour Myriam KOSSAI et Nathalie LACRAMPE, d'avoir travaillé avec moi sur mon projet doctoral et d'avoir réalisé la lecture des TILs. Je tiens à remercier également les ARC et les investigateurs de l'Institut Jean GODINOT et de l'Institut de Cancérologie Lucien NEUWIRTH, avec qui j'ai travaillé sur l'étude MENOCOR.

Enfin, je remercie les personnes les plus proches de moi. Merci à ma grande famille française : Muriel, Evangéline, José, Lewis, Vahiné. Je remercie énormément mes amis : My-Anne, Inès, Alejandro, Thibaud, Benoît et Véronique, pour le soutien et l'encouragement constant.

Tanto grazie al mio migliore amico, Ganjel, per il suo incrollabile supporto sin dal primo giorno che ci siamo incontrati. Grazie anche a Miriana, per la sua amicizia e positività.

Në përfundim, falënderimi më i veçantë i takon familjes sime, për të cilën as të gjitha fjalët e këtij libri nuk do të mjaftonin. Faleminderit mami dhe babi për sakrificat që i bëtë pa u ankuar kurrë. Mbi të gjitha, ju falënderoj për shembullin e përkryer të mirësisë dhe qytetarisë që na keni dhënë, mua dhe Klevit. Faleminderit Klevi që ke qenë vëllai më mbështetës gjatë gjithë këtyre viteve. Faleminderit Jona që u bërë pjesë e familjes sonë dhe për mbështetjen tënde. Dhe në fund, faleminderit Ati Qiellor që je kujdesur për mua në çdo hap dhe që ke bërë çdo gjë të mundur.

RESUME

Le cancer du sein est la maladie cancéreuse la plus fréquente chez la femme dans le monde. Bien qu'il touche principalement les femmes ménopausées, une grande partie des femmes atteintes de cette maladie sont diagnostiquées à un âge relativement jeune. Malgré un système immunitaire très performant, ces femmes ont tendance à présenter un cancer du sein agressif, souvent de sous-type moléculaire triple négatif (CSTN), nécessitant un traitement par chimiothérapie. Ce traitement est accompagné de toxicités importantes pour la fertilité et ne prévient pas toujours les rechutes métastatiques.

Mes travaux de thèse ont porté sur deux axes : le premier sur la recherche de biomarqueurs prédictifs à partir des paramètres de la formule sanguine, dans le CSTN, et le second sur l'étude de la ménopause chimio-induite et ses répercussions sur la qualité de vie des femmes jeunes atteintes de cancer du sein.

L'objectif du premier axe de ma recherche a été de déterminer si les paramètres immunitaires, tels que NLR (*Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio*), PLR (*Platelet-to-Lymphocyte Ratio*), neutrophiles et/ou plaquettes au diagnostic sont des meilleurs biomarqueurs prédictifs et pronostiques que le taux des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) au diagnostic, dans le CSTN. L'analyse a été réalisée sur une population de 120 patientes atteintes de CSTN et traitées par chimiothérapie néoadjuvante (CTNA) de type anthracyclines-taxanes.

Les résultats obtenus ont permis de confirmer le rôle prédictif et pronostique des TILs. En effet, les TILs $\geq 30\%$ et $< 1.5\%$ sont corrélés à un taux élevé de réponse pathologique complète (pCR) et à un taux élevé de rechutes métastatiques, respectivement ($p=0,007$ et $p=0,012$). Toutefois, le critère pCR seul est pas associé au pronostic, mais l'ensemble des patientes pCR + petites tumeurs résiduelles présente moins de risque de développer des métastases et une meilleure survie sans rechute métastatique (MFS) ($p=0.042$, $p=0.024$, respectivement) que le reste des patientes. Dans notre cohorte, le PLR < 133.25 au diagnostic est le seul paramètre issu de la formule sanguine associé à une réponse favorable (pCR + petites tumeurs résiduelles) à la CTNA ($p=0,045$). Ainsi, PLR est un meilleur biomarqueur prédictifs que les TILs concernant la réponse favorable associée à une meilleure MFS et à un moindre risque de rechute métastatique. Il est donc important de valider ces résultats dans des grandes cohortes prospectives. Ainsi, PLR pourrait s'avérer un bon biomarqueur prédictif de la réponse du CSTN à la CTNA et pourrait être utilisé dans la pratique clinique.

En ce qui concerne le deuxième axe de ma thèse, j'ai été chargé de la gestion de l'essai clinique MENOCOR, dont l'objectif principal est d'étudier les répercussions de la ménopause chimio-induite sur la qualité de vie des femmes jeunes atteintes d'un cancer du sein. L'étude n'étant pas terminée, il n'a pas été possible d'analyser les données. Néanmoins, j'ai pu assurer des missions de chef de projet, d'attaché de recherche clinique (ARC) et d'ARC moniteur pour l'étude MENOCOR, ce qui m'a permis de voir les différents aspects et métiers de la recherche clinique.

En conclusion, ces travaux ouvrent plusieurs perspectives de recherches. Nous avons créé et mis en place l'essai PERCEPTION, qui nous permettra de valider les résultats présentés dans ce rapport. En outre, plusieurs paramètres, tels que les TILs, le PLR ou la RCB (*Residual Cancer Burden*), pourraient devenir des outils importants dans la pratique clinique et dans la décision thérapeutique. Enfin, les résultats de l'étude MENOCOR nous permettront de mieux connaître l'impact de la ménopause chimio-induite sur la qualité de vie et proposer des solutions pour améliorer la prise en charge du cancer du sein de la femme jeune.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer among women worldwide. Although it affects mostly post-menopausal women, a large proportion of women with this disease are diagnosed at a relatively young age and the incidence among younger women is increasing. Despite a strong initial immune response to cancer, these women tend to develop aggressive breast cancer, especially triple negative breast cancer (TNBC), which require chemotherapy treatment. This treatment does not always prevent metastatic recurrences and often leads to important toxicities regarding fertility.

Therefore, my PhD thesis focused on two axes: firstly, investigating the predictive and prognostic capacities of different elements of the blood count in TNBC and secondly, investigating the impact of chemotherapy-induced menopause on quality of life in young women with breast cancer.

Regarding the first axis, our goal was to determine whether baseline NLR (*Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio*), PLR (*Platelet-to-Lymphocyte Ratio*), neutrophil and/or platelet counts are better predictive and prognostic biomarkers than baseline tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), in TNBC. One hundred twenty TNBC patients uniformly treated by anthracycline/taxane neoadjuvant chemotherapy (NACT) were retrospectively analyzed.

TILs $\geq 30\%$ and $< 1.5\%$ are better predictive biomarkers of pathologic complete response (pCR) and distant recurrence risk, respectively ($p=0.007$ and $p=0.012$). However, in this cohort, pCR is not significantly associated with the outcome. Instead, only the ensemble of patients with pCR and small residual disease have lower recurrence risk and longer distant recurrence-free survival (DRFS) ($p=0.042$, $p=0.024$, respectively) than the rest of the cohort (larger residual disease). The only parameter which could predict the pCR/small residual disease status is PLR: patients with values lower than 133.25 had significantly higher chance of reaching that status after NACT ($p=0.045$). Thus, PLR is a better predictor of the ensemble of responses (pCR or small residual disease) which had good outcome in terms of less distant recurrences or longer DRFS. It is, however, necessary to validate these results in large prospective cohorts, which would allow for PLR to be used in the clinical practice as a predictive biomarker of favorable TNBC response to NACT.

As for the second axis, I was in charge of the MENOCOR clinical trial, whose main objective is to assess the impact of chemotherapy-induced menopause on quality of life in

young women with breast cancer. Because the trial is still ongoing, the data could not yet be analyzed. In the meantime, I was able to take on assignments as clinical project manager, clinical research associate (CRA) and monitoring CRA for the MENOCOR study. All these responsibilities allowed me to discover several different aspects and features of clinical research.

In conclusion, this work opens up many different research perspectives. Firstly, we have created and started the PERCEPTION clinical trial, which will allow us to validate the results presented in this report. Furthermore, several parameters, such as TILs, PLR or RCB (Residual Cancer Burden), could become important tools for clinical practice and therapeutic decision-making in breast cancer. Finally, the results of the MENOCOR study will allow us to better understand the impact of chemotherapy-induced menopause on quality of life and to propose solutions to improve the management of breast cancer in young women.

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Travaux de recherche (Annexe 1) :

- **Lusho S**, Durando X, Mouret-Reynier M-A, Kossai M, Lacrampe N, Molnar I, Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N, Abrial C. *Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with favorable response to neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer: a study on 120 patients.* (2021), Front. Oncol. 11:678315. doi: 10.3389/fonc.2021.678315
- **Lusho S**, Durando X, Bidet Y, Molnar I, Kossai M, Bernadach M, Lacrampe N, Veyssiere H, Cavaille M, Gay-Bellile M, Radosevic-Robin N, Abrial C. *PERCEPTION Trial protocol: Comparison of predictive and prognostic capacities of neutrophil, lymphocyte, and platelet counts and tumor-infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer.* Medicine (Baltimore). 2020 Dec 11;99(50):e23418. doi: 10.1097/MD.00000000000023418. PMID: 33327268; PMCID: PMC7738079.

Travaux collaboratifs (Annexe 1) :

- Leyrat B, Bernadach M, Ginzac A, **Lusho S**, Durando X. *Sister Mary Joseph Nodules: A Case Report about a Rare Location of Skin Metastasis.* Case Rep Oncol. 2021 Apr 8;14(1):664-670. doi: 10.1159/000515298. PMID: 33976650; PMCID: PMC8077481.
- Veyssi re H, Passildas J, Ginzac A, **Lusho S**, Bidet Y, Molnar I, Bernadach M, Cavaille M, Radosevic-Robin N, Durando X. *XENOBREAST Trial: A prospective study of xenografts establishment from surgical specimens of patients with triple negative or luminal b breast cancer* [version 3; peer review: 2 approved]. F1000Research 2021, 9:1219 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.26873.3>)
- Veyssi re H, **Lusho S**, Molnar I, Kossai M, Bernadach M, Abrial C, Bidet Y, Radosevic-Robin N, Durando X. *INSTIGO trial: Evaluation of a plasma protein profile as a predictive biomarker for metastatic relapse of triple negative breast cancer.* Front Oncol. 2021;11. (<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.653370>)

- Mouret-Reynier MA, Paillard MJ, Uwer L, Molnar I, Kwiatkowski F, **Lusho S**, Dohollou N, Petit T, Hajjaji N, Boudin L, Lorgis V, Jacquin JP, Abrial C, Passildas Jahanmohan J. *National multicentre retrospective study on metastatic breast cancer patients to characterize long responder under eribulin – LORELIN study.* (Abstract accepté à l'ESMO (European Society for Medical Oncology) 2021)

Communications (Annexe 1) :

- Présentations sous forme de poster
 - PERCEPTION Trial: **Correlation between peripheral blood cells and tumour infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer.** *Forum de la cancérologie, CLARA (Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes). Mars 2020 (Poster accepté, forum reporté (contexte COVID))*
 - PERCEPTION Trial: **Correlation between peripheral blood cells and tumour infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer.** *Forum de la cancérologie, CLARA. Mars 2021 (E-Poster)*
- Présentations orales
 - **Etude de l'impact de la ménopause chimio-induite sur la qualité de vie chez les femmes jeunes en âge de procréer et atteintes d'un cancer du sein non métastatique.** *19 mars 2019, Journée de la Recherche de la Ligue contre le cancer.*
 - **Evaluation des globules blancs circulants en tant que biomarqueurs de l'évolution du cancer du sein triple négatif.** *12 mars 2020, Concours de la région Auvergne « Ma thèse en 180 secondes », Clermont-Ferrand.*
 - **Assessment of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes as predictors of triple negative breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy and/or metastatic recurrence.** *14 et 15 octobre 2020, Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE, Clermont-Ferrand.*
 - **PERCEPTION Trial: Correlation between peripheral blood cells and tumour infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer.** *Forum de la cancérologie, CLARA. Mars 2021.*
 - **Etude PERCEPTION : Corrélation entre les éléments figurés du sang et le taux de l'infiltration lymphocytaire tumorale chez les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif.** *22 juin 2021, Journée de la Recherche de la Ligue contre le cancer.*

FINANCEMENTS OBTENUS PENDANT LA THESE

- **Association Clermont en rose**
Année : 2018. Somme : 12 604 €. Projet financé : Etude MENOCOR
- **Comité du Puy-de-Dôme de la Ligue contre le cancer**
Année : 2019 – 2020. Somme : 20 000 €. Projet financé : Etude MENOCOR
- **Comité de la Lozère de la Ligue contre le cancer**
Année : 2020. Somme : 16 000 €. Projet financé : Etude MENOCOR
- **Comités de l'Allier et du Puy-de-Dôme de la Ligue contre le cancer**
Année : 2021 – 2022. Somme : 39 000 €. Projet financé : Etude PERCEPTION

ENSEIGNEMENT

- Septembre 2020, Aspects réglementaires de la recherche clinique, Master 2 Ingénierie de la santé, parcours Diagnostic Biomédical.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – L'anatomie du sein

Figure 2 – Les ganglions lymphatiques

Figure 3 – Les grandes caractéristiques des cellules tumorales

Figure 4 – Apparition et évolution d'un adénocarcinome. (A) Cellules épithéliales normales. (B) Apparition de cellules cancéreuses. (C) Carcinome in situ. (D) Rupture de la membrane basale et envahissement des tissus environnants. On parle de carcinome infiltrant.

Figure 5 – Les différents types d'adénocarcinomes : Les cancers canaux à gauche et les cancers lobulaires à droite.

Figure 6 – Taux d'incidence et de mortalité par cancer du sein en France entre 1990 et 2018.

Figure 7 – Taux d'incidence et de mortalité par cancer du sein en France en 2018 selon les différentes classes d'âge.

Figure 8 – Relation entre l'immunophénotype triple négatif et le sous-type moléculaire basal-like du cancer du sein.

Figure 9 – Arbre décisionnel de la prise en charge du cancer du sein non métastatique.

Figure 10 – Schéma simplifié des mécanismes d'action des différentes hormonothérapies contre le cancer du sein

Figure 11 – Schéma simplifié des mécanismes d'action des différentes thérapies ciblées contre le cancer du sein.

Figure 12 – Schéma thérapeutique de la chimiothérapie néo-adjuvante standard pour le traitement du cancer du sein non métastatique

Figure 13 – Schéma simplifié des mécanismes d'action des différents types de chimiothérapies utilisés dans le traitement du cancer du sein non métastatique

Figure 14 – Les femmes jeunes présentent plus de mutations invisibles pour le système immunitaire

Figure 15 – Dérégulation par les cellules tumorales de la production des neutrophiles et leur implication dans le processus métastatique

Figure 16 – Le rôle des lymphocytes dans le développement du cancer et des métastases

Figure 17 – Taux de risque de la rechute métastatique du cancer du sein triple négatif

Figure 18 – Taux de risque de rechute métastatique du CSTN selon le site de rechute

Figure 19 – (A) Les différents types de données recueillies dans la BD (RT : radiothérapie). (B) Les différents bilans biologiques sanguins saisis dans la BD (RT : radiothérapie ; CTA : chimiothérapie adjuvante ; * si applicable).

Figure 20 – Exemple d'une page de recueil des données sur la réponse aux traitements néoadjuvants

Figure 21 – Flowchart de la sélection des patientes analysées

Figure 22 – Association entre TILs à la biopsie de diagnostic et le pCR. (A) Les patientes pCR présentent un taux plus élevé de TILs à la biopsie ($p=0.043$). (B) La courbe ROC montrant que le seuil de 12.5% de TILs permet de discriminer entre les patientes pCR et non-pCR.

Figure 23 – Association entre TILs à la biopsie de diagnostic et la survenue de la rechute métastatique. (A) Les patientes présentant des rechutes métastatiques ont un faible de taux de TILs au diagnostic ($p=0.021$). (B) La courbe ROC montrant que le seuil de 1.5% de TILs permet de discriminer entre les patientes qui développent des métastases ou non.

Figure 24 – La différence des éléments figures du sang entre le groupe 1 et le groupe 2

Figure 25 – Courbe ROC montrant un seuil de 133.25 de PLR pour discriminer entre les patientes avec bonne (pCR + petites tumeurs résiduelles) et mauvaise réponse

Figure 26 – Probabilité de la survie sans rechute métastatique (MFS) depuis le diagnostic. Les patientes du Groupe 1 présentent une meilleure MFS à 24, 60 et 96 mois que celles du Groupe 2

Figure 27 – Probabilité de la survie sans rechute métastatique (MFS) depuis la chirurgie. Les patientes du Groupe 1 présentent une meilleure MFS à 60 et 96 mois que celles du Groupe 2

Figure 28 – Schéma de l'étude PERCEPTION

Figure 29 – Schéma de l'étude MENOCOR

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** – Cancer du sein : les facteurs de risque et les facteurs protecteurs.
- Tableau 2** – La classification TNM clinique du cancer du sein.
- Tableau 3** – Classification BIRADS™ de la mammographie.
- Tableau 4** – Classification moléculaire des cancers du sein.
- Tableau 5** – Effets secondaire de la radiothérapie du cancer du sein.
- Tableau 6** – Les hormonothérapies utilisées dans le cancer du sein
- Tableau 7** – Les thérapies ciblées utilisées dans le cancer du sein
- Tableau 8** – Systèmes d'évaluation de la réponse pathologique du cancer du sein à la chimiothérapie néo-adjuvante
- Tableau 9** – Les différents types de chimiothérapie contre le cancer du sein non métastatique
- Tableau 10** – Synthèse de plusieurs études évaluant TILs en tant que biomarqueur prédictif et pronostique dans le CSTN
- Tableau 11** – Les principales caractéristiques des patientes analysées
- Tableau 12** – Taux de pCR selon les différents seuils de TILs (12.5% pour variable continue et 30% pour variable binaire)
- Tableau 13** – La survenue de la rechute métastatique
- Tableau 14** – Les objectifs et les critères d'évaluation de l'essai PERCEPTION
- Tableau 15** – Critères d'inclusion et de non inclusion de l'essai clinique PERCEPTION
- Tableau 16** – Les objectifs et les critères d'évaluation de l'essai MENOCOR
- Tableau 17** – Les critères d'inclusion et de non inclusion de l'essai MENOCOR

ABBREVIATIONS

AC	Doxorubicine – cyclophosphamide
ACR	<i>American college of radiology</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNtc	ADN tumoral circulant
AMH	Hormone antimüllérienne
ARC	Attaché de recherche clinique
ARN	Acide ribonucléique
BD	Base de données
BIRADS™	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
BL1	<i>Basal-like 1</i>
BL2	<i>Basal-like 2</i>
BRCA	<i>Breast cancer associated gene</i>
CCIS	Carcinome canalaire <i>in situ</i>
CDK	<i>Cyclin-dependant kinase</i>
CINS	Adénocarcinome invasif non spécifique
CJP	Centre Jean PERRIN
CLIS	Carcinome lobulaire <i>in situ</i>
CNAs	<i>Copy number aberrations</i> (Aberrations du nombre de copies de gènes)
CPP	Comité de Protection des Personnes
CRF	<i>Case report form</i> (cahier d'observation)
CS	Cancer du sein
CSTN	Cancer du sein triple négatif
CTA	Chimiothérapie adjuvante
CTNA	Chimiothérapie néo adjuvante
EC	Epirubicine – cyclophosphamide

EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Facteur de croissance épidermique)
ERBB2	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2</i>
FISH	Hybridation <i>in situ</i>
FSH	Hormone de stimulation de follicules
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
IA	Inhibiteurs de l'aromatase
ICI immunitaire)	<i>Immune checkpoint inhibitor</i> (Inhibiteur du point de contrôle
IHC	Immunohistochimie
IMC	Indice de la masse corporelle
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LAR	Luminal avec récepteurs aux androgènes
LH	Hormone lutéinisante
MCI	Ménopause chimio-induite
MET	Microenvironnement tumoral
MLR	<i>Monocyte-to-lymphocyte ratio</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NFS	Numération de la formule sanguine
NK	<i>Natural Killers</i>
NLR	<i>Neutrophil-to-lymphocyte ratio</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pCR	<i>Pathologic complete response</i> (réponse pathologique complète)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>Programmed Death Protein 1</i>

PDGF plaquettes)	<i>Platelet-derived growth factor</i> (facteurs de croissance dérivés de
QLQ-C30	<i>Quality of life questionnaire – Cancer</i>
PLR	<i>Platelet-to-lymphocyte ratio</i>
RCB	<i>Residual cancer burden</i>
RCP	Réunion de concertation pluridisciplinaire
RO	Récepteur à l'œstrogène
RH	Récepteur aux hormones
RP	Récepteur à la progestérone
RR	Risque relatif
RT	Radiothérapie
SBR	Scarff Bloom et Richardson
SG	Survie globale
SII	Index de l'immunité et de l'inflammation systémique
SNC	Système nerveux central
SSE	Survie sans événement
SSM	Survie sans métastases
SSR	Survie sans rechute
THS	Traitement hormonal substitutif
TILs	<i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i>
TNM	<i>Tumor, Nodes, Metastases</i> (Taille, ganglions, métastases)
TSM	Taux standardisé monde
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

TABLE DES MATIERES

1. Analyse bibliographique.....	4
1.1. Le cancer du sein.....	4
1.1.1. L'anatomie du sein.....	4
1.1.2. Le développement du cancer du sein	6
1.1.3. Epidémiologie.....	12
1.1.4. Facteurs de risque et facteurs protecteurs.....	14
1.1.5. Le diagnostic du cancer du sein	18
1.1.6. Classification moléculaire.....	22
1.1.7. Prise en charge	25
1.1.8. L'immunité et le cancer	42
1.2. Le cancer du sein triple négatif.....	50
1.2.1. Les caractéristiques du CSTN.....	50
1.2.2. Facteurs prédictifs et pronostiques.....	54
2. Recherche de biomarqueurs prédictifs et pronostiques dans le CSTN.....	63
2.1. Les objectifs.....	64
2.2. La base de données du CSTN	64
2.2.1. Données recueillies	65
2.2.2. Mise à jour de la BD et saisie des nouveaux cas	67
2.3. Patients et méthodes	69
2.3.1. Les critères de sélection des patientes.....	69
2.3.2. Les bilans sanguins.....	69
2.3.3. L'analyse histopathologique.....	69
2.3.4. L'évaluation des TILs.....	70
2.3.5. Les analyses statistiques.....	70
2.4. Résultats obtenus	71
2.4.1. Les caractéristiques des patientes.....	72
2.4.2. TILs et leur association avec la pCR	73
2.4.3. TILs bas au diagnostic sont associés à un risque élevé de rechute métastatique ...	74
2.4.4. Le PLR est associé à la réponse à la CTNA	75
2.4.5. Relation entre les paramètres sanguins au diagnostic et la survenue de la rechute métastatique.....	77
2.4.6. Relation entre les paramètres sanguins et les TILs	77
2.4.7. Le groupe 1 (pCR + petites tumeurs) présente un faible risque de rechutes métastatiques.....	77

2.4.8.	Le groupe 1 (pCR + petites tumeurs résiduelles) présente une meilleure survie sans métastases (MFS).....	78
2.5.	Discussion.....	80
2.6.	L'essai clinique PERCEPTION.....	85
2.6.1.	Objectifs de l'étude et critères d'évaluation.....	86
2.6.2.	Critères d'inclusion.....	87
2.6.3.	Déroulement de l'étude.....	87
2.6.4.	Considérations statistiques.....	88
2.6.5.	Etat d'avancement de l'étude.....	88
2.6.6.	Résultats attendus.....	88
2.7.	Conclusion.....	90
3.	Ménopause chimio-induite (Etude MENOCOR).....	92
3.1.	Objectifs de l'étude et critères d'évaluation.....	93
3.2.	Critères d'inclusion.....	95
3.3.	Schéma de l'étude.....	96
3.4.	Considérations statistiques.....	96
3.5.	Etat d'avancement de l'étude.....	97
3.6.	Résultats attendus.....	97
3.7.	Missions confiées.....	97
4.	Conclusions et perspectives.....	100
	Réflexions personnelles.....	103
	Annexes.....	105
	Annexe 1 : Travaux de recherche, travaux collaboratifs et communications.....	105
	Annexe 2 : Le stade clinique du cancer du sein selon la 8 ^{ème} édition de la classification TNM (Source : American Joint Committee on Cancer – Breast Cancer Staging System).....	147
	Annexe 3 : Classification des images mammographiques en fonction du degré de suspicion de leur caractère pathologique – correspondance avec le système BIRADS de l'American College of Radiology (ACR) (Source : Haute Autorité de Santé).....	149
	Annexe 4 : Les différents seuils des paramètres sanguins dans les études montrant une corrélation entre NLR, PLR et le pronostic.....	151
	Annexe 5 : Les caractéristiques des patientes analysées.....	152
	Références bibliographiques.....	157

INTRODUCTION

Le cancer du sein est la maladie cancéreuse la plus fréquente chez la femme dans le monde. En France, cette maladie représente un vrai problème de santé publique et un programme national de dépistage est organisé pour les femmes entre 50 et 74 ans. Or, environ un quart des cancers du sein touche les « femmes jeunes », de moins de 50 ans, et l'incidence dans cette population est en augmentation. La détection précoce et l'amélioration des traitements du cancer du sein ont permis d'en réduire la mortalité. Toutefois, en raison de la grande hétérogénéité de la maladie, le traitement de certains sous-types de cancer du sein reste à ce jour un vrai défi en oncologie.

Le cancer du sein triple négatif (CSTN), nommé ainsi du fait de ses caractéristiques moléculaires, est un sous-type agressif, qui touche principalement les femmes jeunes. Il est doté d'une évolution rapide et présente un taux élevé de rechutes métastatiques survenant dans les cinq ans après la fin du traitement de la première ligne. Néanmoins, toutes les patientes atteintes de ce type de cancer ne développeront pas de métastases à distance et ne bénéficieront pas du même traitement. Afin d'adapter le traitement aux besoins de chaque patiente, il est important de connaître et de pouvoir prédire l'évolution de la maladie.

Le système immunitaire joue un rôle important dans le contrôle de l'évolution du CSTN, en reconnaissant et en détruisant les cellules cancéreuses. Toutefois, certaines cellules malignes développent des mécanismes pour devenir « invisibles » face au système immunitaire. Ce phénomène a été plus particulièrement observé chez les cancers touchant les femmes jeunes (1). En effet, l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires et inflammatoires, aussi bien dans le site tumoral que dans la circulation sanguine, détermine l'évolution de la maladie et l'éventuel développement des métastases. L'identification de biomarqueurs immunitaires tissulaires et/ou circulants prédictifs de la réponse aux traitements cytotoxiques et de la rechute métastatique, pourrait donner aux cliniciens des informations importantes qui orienteraient la prise en charge, afin d'améliorer la survie.

Au-delà des traitements, la qualité de vie pendant et après le cancer du sein est un aspect clinique important aussi bien pour les patientes que pour l'équipe médicale.

Les traitements cytotoxiques anti-cancéreux sont accompagnés de toxicités à court et à long terme. Chez les patientes jeunes, en âge de procréer et atteintes d'un cancer du sein, la chimiothérapie entraîne une aménorrhée, pouvant aller jusqu'à une ménopause précoce définitive. Il semble pertinent d'étudier les répercussions de la ménopause chimio-induite sur les différents aspects de la qualité de vie des femmes, afin de leur proposer des traitements alternatifs et/ou des soins de support.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse, avec un premier axe sur l'évaluation de la valeur prédictive et pronostique des éléments figurés du sang dans le cancer du sein triple négatif et un second axe sur la ménopause chimio-induite et ses conséquences sur la qualité de vie, notamment par la gestion de l'essai clinique MENOCOR.

PARTIE 1
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. LE CANCER DU SEIN

1.1.1. L'ANATOMIE DU SEIN

La fonction biologique du sein est la production du lait par la glande mammaire, afin de nourrir un nouveau-né. Le sein joue également un rôle important dans la féminité et dans l'image corporelle. La glande mammaire est composée de 15 à 20 lobes séparés par du tissu adipeux et conjonctif. Chaque lobe est constitué de lobules et de canaux. Le lait qui est produit dans les lobules sous l'influence de la prolactine, est transporté par les canaux vers le mamelon (**Figure 1**). La glande mammaire fonctionne sous l'influence des hormones sexuelles, l'œstrogène et la progestérone, fabriquées par les ovaires.

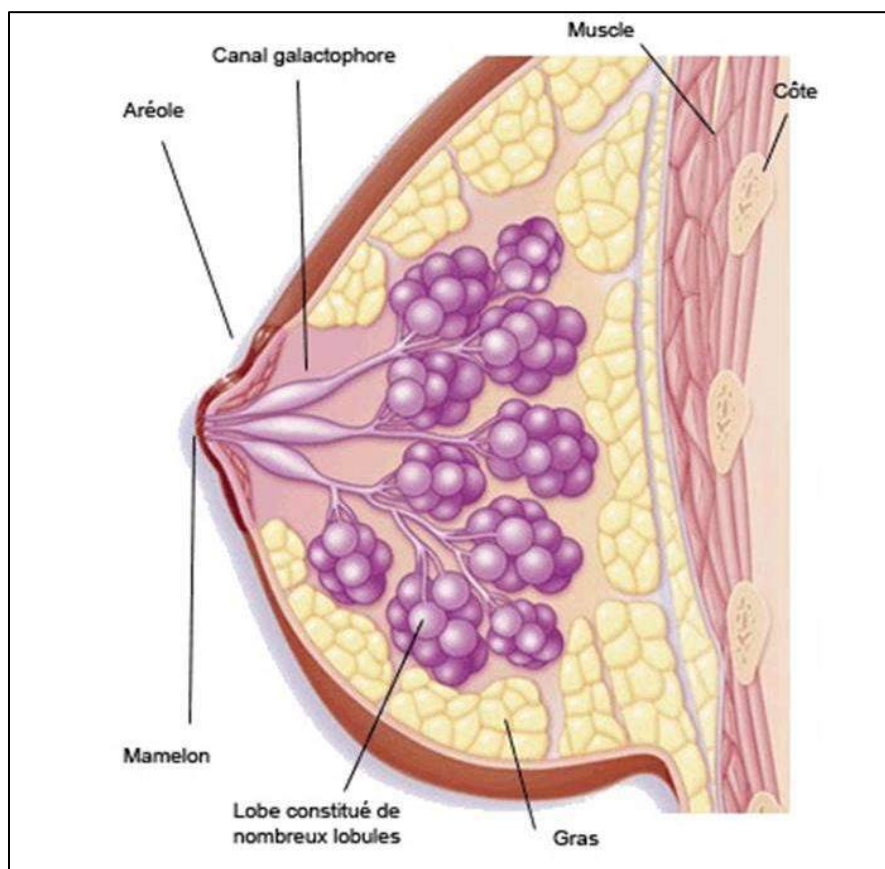


Figure 1 - L'anatomie du sein
(Source : La Ligue contre le Cancer (www.ligue-cancer.net))

La prolactine est une hormone peptidique produite et sécrétée majoritairement par l'hypophyse. En se fixant sur ses récepteurs à la surface des cellules de la glande mammaire, elle agit sur le développement de la glande, ainsi que sur la production et la sécrétion du lait (2). D'autre part, les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes qui agissent en se fixant sur les récepteurs aux œstrogènes (RO). La liaison des deux va agir sur l'ADN et contrôler l'expression génique. Le rôle principal de ces hormones est le développement des caractéristiques sexuelles secondaires comme le développement des seins lors de la puberté. Ils sont également impliqués dans l'assouplissement des tissus et l'augmentation du volume sanguin lors de la grossesse (3,4).

La progestérone, quant à elle, est reconnue par les récepteurs spécifiques aux progestérones (RP) et son mode d'action est similaire à celui des œstrogènes. Elle est impliquée notamment dans la différenciation des cellules du sein, ainsi que l'implantation de l'ovocyte fécondé (2), la densification et la vascularisation du mucus de l'utérus, jouant ainsi un rôle important dans la grossesse et la régulation des cycles menstruels (3,4).

Le sein est parcouru de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques (**Figure 2**). Ces derniers relient les ganglions lymphatiques entre eux pour former le système lymphatique, dont le rôle est de filtrer la lymphe et de stocker des lymphocytes, afin de combattre les infections. Les ganglions lymphatiques se situent au niveau de l'aisselle (ganglions axillaires), de part et d'autre de la clavicule (ganglions sous- et sus-claviculaires) et à l'intérieur du thorax (ganglions internes) (4,5).

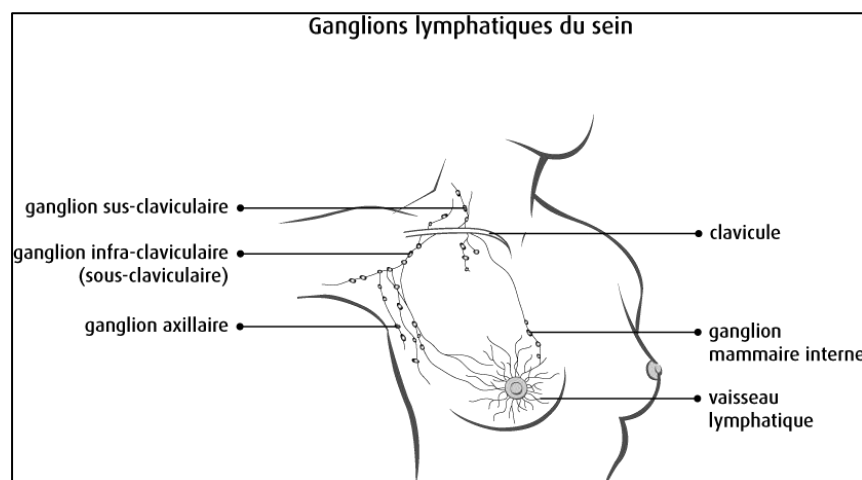


Figure 2 – Les ganglions lymphatiques
(Source : Société canadienne du cancer (www.cancer.ca))

1.1.2. LE DEVELOPPEMENT DU CANCER DU SEIN

1.1.2.1. Les caractéristiques des cellules tumorales

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est le résultat de plusieurs anomalies biologiques qui surviennent au sein de la cellule et de l'organisme. Ces anomalies ont été décrites par Hanahan et Weinberg en 2011 (6), qui ont proposé dix grandes caractéristiques biologiques des cellules tumorales, leur permettant de se multiplier et de donner naissance à une tumeur (**Figure 3**).

Premièrement, les signaux qui déclenchent la prolifération chez les cellules cancéreuses sont dérégulés, de sorte qu'elles deviennent capables de maintenir une **prolifération continue**. Ceci n'est pas le cas pour les cellules saines de l'organisme, dont le nombre et l'architecture restent inchangés, grâce au contrôle du cycle et de la division cellulaire. La préservation de cette homéostasie cellulaire est en partie due aux gènes suppresseurs de tumeur. Cependant, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de contourner ce système et **d'échapper aux suppresseurs de prolifération tumorale**.

La mort programmée de la cellule, ou apoptose, est un moyen naturel et intrinsèque de défense contre les cellules anormales, endommagées ou cancéreuses, afin de freiner leur prolifération et propagation. Toutefois, les cellules cancéreuses peuvent développer une **résistance à l'apoptose**, par une dérégulation des voies de signalisation apoptotiques, ce qui entraîne leur « **immortalité** ». Cette immortalité est rendue possible par la présence et l'activité anormale de la télomérase, l'enzyme responsable de l'ajout et de la réparation des télomères. Ces derniers contribuent à la protection du matériel génétique et au final à l'immortalité de la cellule cancéreuse chez l'homme.

De plus, afin de maintenir une prolifération continue, les cellules cancéreuses ont besoin de nutriments et d'oxygène, qui leur parviennent de la circulation sanguine. Le processus d'angiogenèse, ou formation de nouveaux vaisseaux sanguins, permet de répondre aux besoins nutritionnels des cellules tumorales en croissance. Ces dernières sont donc capables **d'entraîner l'angiogenèse**, notamment par la production et la sécrétion des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*). Outre l'apport des nutriments, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins joue un rôle important dans la migration des cellules tumorales vers

d'autres sites. En effet, les cellules cancéreuses peuvent **envahir les tissus sains environnants** et emprunter la circulation sanguine et/ou lymphatique pour créer de nouvelles « colonies » dans d'autres organes, donnant ainsi des **métastases**.

Outre ces six caractéristiques fondamentales, d'autres phénomènes ont été observés et décrits chez les cellules cancéreuses. Ils concernent notamment la **dérégulation des apports et des besoins énergétiques**, **l'instabilité et l'accumulation des mutations du génome**, **l'inflammation favorisant la tumeur** et **l'échappement au système immunitaire**. En effet, depuis les années 2000, un nombre croissant d'études a mis en évidence un lien entre le cancer et l'inflammation. Les cellules impliquées dans l'inflammation fourniraient aux cellules cancéreuses des molécules telles que des facteurs de croissance ou des enzymes, favorisant la prolifération, l'angiogenèse, la résistance à l'apoptose et le développement des métastases. Une description plus détaillée des mécanismes impliqués dans l'inflammation pro-tumorale et la réponse immunitaire antitumorale se trouve dans la partie 1.1.8.

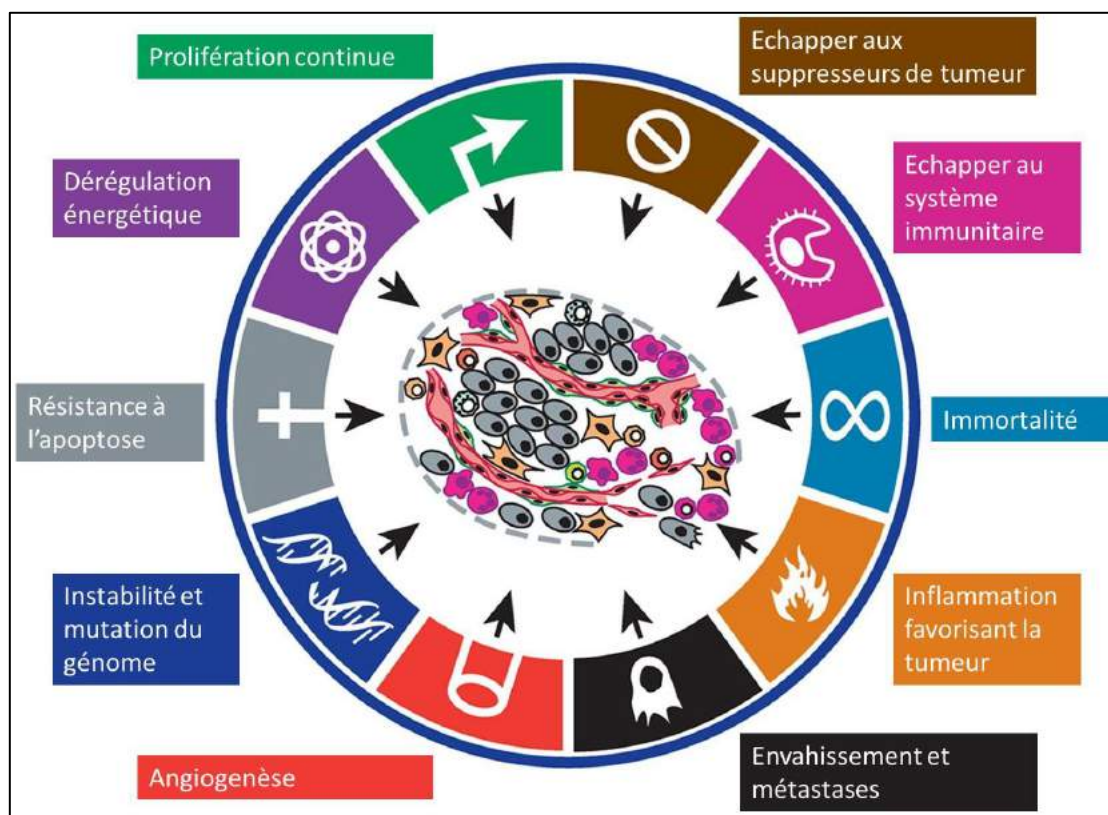


Figure 3 - Les grandes caractéristiques des cellules tumorales
(Source: Hanahan et Weinberg 2011, *Cell*. Traduit en français)

1.1.2.2. La formation du cancer du sein (l'adénocarcinome)

Une tumeur mammaire est née lorsque les cellules qui constituent la glande mammaire présentent des anomalies, se multiplient et produisent d'autres cellules anormales, dites cancéreuses. Les tumeurs mammaires peuvent être bénignes ou malignes. Les tumeurs bénignes sont bien délimitées, avec des cellules bien différenciées qui ressemblent aux cellules normales du tissu. Elles ont une croissance lente et sont de bon pronostic (7).

En revanche, une tumeur maligne est composée de cellules peu différenciées, avec des contours mal définis et une croissance rapide. Souvent, ce sont les cellules épithéliales qui constituent les lobules et les canaux de la glande mammaire qui forment une masse maligne, l'adénocarcinome. Les adénocarcinomes sont la forme la plus courante des cancers du sein et se développent le plus souvent à partir des cellules canalaire et plus rarement à partir de cellules lobulaires.

Lorsque les cellules cancéreuses sont peu nombreuses et limitées aux canaux et aux lobules, on parle de **carcinome *in situ***. Environ 80% des carcinomes *in situ* surviennent dans les canaux, on parle de **carcinome canalaire *in situ* (CCIS)**. Le CCIS représente non seulement la majorité des adénocarcinomes mammaires *in situ*, mais également 25% de tous les carcinomes affectant le sein (7-9). En absence de traitement et avec le temps, les cellules qui se trouvent à l'intérieur des canaux peuvent traverser la membrane basale pour envahir les tissus environnants (**Figure 4**). Il s'agit alors de **carcinome infiltrant ou invasif** qui peut éventuellement atteindre les ganglions lymphatiques et la circulation sanguine pour donner des métastases (7,10). Concernant les carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS), d'après la dernière classification des tumeurs mammaires par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2019, leur présence est considérée plutôt comme un facteur de risque de développement du cancer infiltrant, et non obligatoirement comme un précurseur de cancer (11-13).

De même que les carcinomes *in situ*, la plupart des carcinomes invasifs se forme à partir des cellules canalaire (environ 85% des carcinomes invasifs). Lorsque ces cellules ne présentent pas de caractéristiques particulières de différenciation, on parle de **d'adénocarcinome invasif non spécifique (CINS)** (14). Le CINS représente environ 75% de tous les carcinomes mammaires invasifs (15). Les carcinomes lobulaires

invasifs, quant à eux, représentent 5-15% des adénocarcinomes infiltrants (13,16). Les différents types d'adénocarcinomes sont schématisés dans la **Figure 5**.

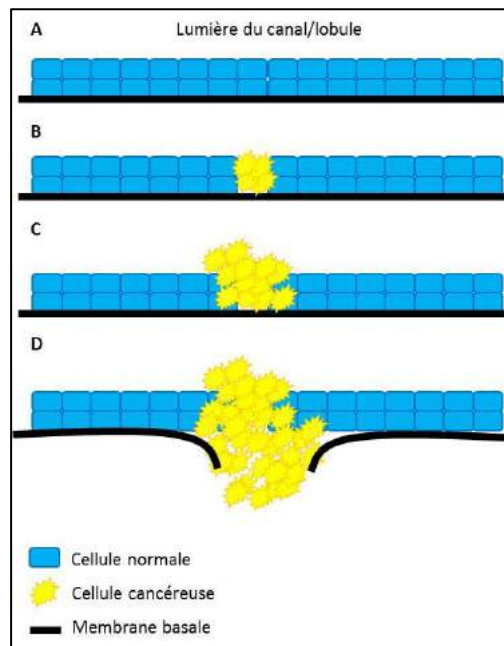


Figure 4 - Apparition et évolution d'un adénocarcinome. (A) Cellules épithéliales normales. (B) Apparition de cellules cancéreuses. (C) Carcinome *in situ*. (D) Rupture de la membrane basale et envahissement des tissus environnants. On parle de carcinome infiltrant.

(Source personnelle, image créée par Sejdi LUSHO)

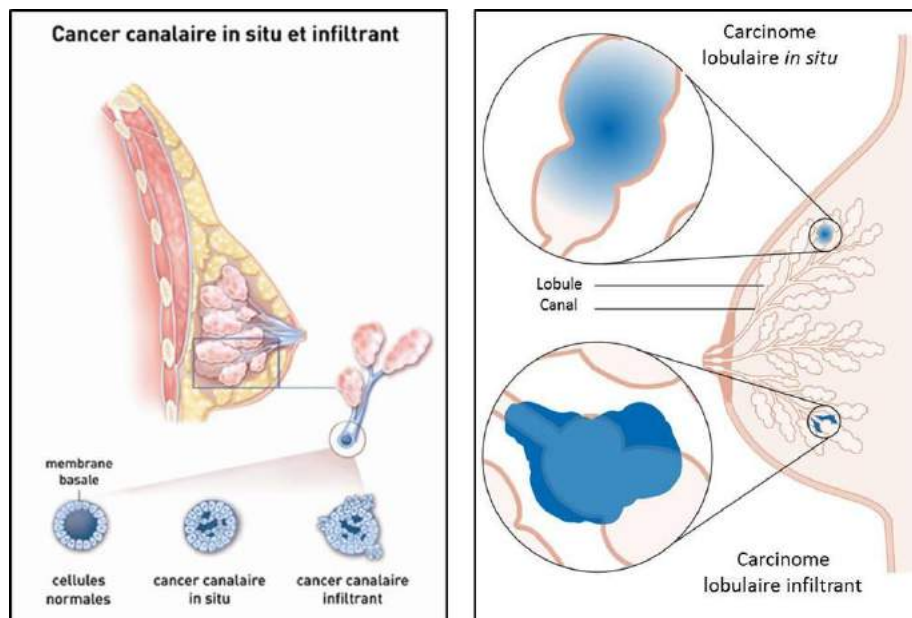


Figure 5 - Les différents types d'adénocarcinomes : Les cancers canaux à gauche (Source : Institut National du Cancer (www.e-cancer.fr)) et les cancers lobulaires à droite (Source : Cancer Research UK (www.cancerresearchuk.org))

1.1.2.3. Les formes rares du cancer du sein

Lorsque les vaisseaux lymphatiques du sein sont obstrués par les cellules cancéreuses qui y circulent, il s'agit d'une forme rare de cancer du sein, dit inflammatoire. Cette forme agressive représente environ 2.5% des cancers du sein (17). D'autres formes rares de carcinomes mammaires existent, tels que :

- le carcinome médullaire, représentant environ 1% des cancers du sein invasifs. Il s'agit d'un carcinome dont les contours sont bien délimités, avec une infiltration lymphocytaire importante. Il touche majoritairement les femmes de moins de 50 ans (18).
- le carcinome mucineux ou colloïde représente 2% des cancers du sein infiltrants. Il tire son nom de la présence de cellules cancéreuses qui produisent et sécrètent du mucus. Survenant le plus souvent chez les femmes de plus de 60 ans, il a un meilleur pronostic que les autres types de carcinomes infiltrants (19).
- le carcinome tubuleux est un autre sous-type rare, représentant seulement 1% des cancers du sein infiltrants. Il est composé de structures tubulaires bien différenciées et touche majoritairement les femmes de plus de 55 ans (20).
- le carcinome neuroendocrine qui touche principalement les femmes ménopausées, présente des caractéristiques des cellules tumorales neuroendocrines. Il représente environ 2% des cancers du sein (21).
- le carcinome papillaire infiltrant touche les femmes âgées. Il représente 1 à 2% des cancers du sein et a un bon pronostic (22).
- le carcinome métaplasique est une entité rare, hétérogène et très agressive du cancer du sein. Il est caractérisé par la différenciation des cellules épithéliales en cellules squameuses (épiderme) et/ou mésenchymateuses (cartilages/os) (23,24).

Malgré leur grande hétérogénéité, due aux différentes caractéristiques histologiques, les carcinomes, en général, restent la forme la plus courante des cancers du sein. Il existe, d'ailleurs, d'autres formes rares du cancer du sein, avec des caractéristiques bien différentes, tels que les sarcomes. Si les carcinomes se développent à partir des cellules épithéliales, c'est dans les tissus mésenchymateux que les sarcomes prennent naissance. Ils représentent moins d'un pourcent des cancers du sein et moins

de 5% de tous les sarcomes. Bien qu'extrêmement rares, les sarcomes sont une entité assez hétérogène (25).

Toutefois, le cancer du sein n'est pas une maladie exclusivement féminine. Environ 1% des cas surviennent chez l'homme et la majorité sont des adénocarcinomes. En raison du diagnostic tardif, le cancer du sein chez l'homme est agressif et présente un mauvais pronostic (26).

1.1.3. EPIDEMIOLOGIE

Le cancer du sein est la maladie cancéreuse la plus fréquente chez la femme dans le monde, avec environ 1,3 – 1,7 millions nouveaux cas et 450 000 décès annuellement (27). Il touche environ 1 femme sur 10 dans le monde (28). Les pays développés comptent plus de la moitié des nouveaux cas et des décès dus à cette maladie. Malgré ce nombre important, la survie nette à 5 ans dans ces pays est de 80%, grâce au dépistage massif et précoce et à l'amélioration des traitements, contrairement aux pays en voie de développement, où la survie nette à 5 ans est de moins de 40% (10). Cette disparité importante est le résultat des faibles moyens, ressources et technologies des pays en voie de développement.

En France en 2018, le cancer du sein représentait 32.9% de tous les cancers féminins (58 459 nouveaux cas) et 15.3% des cancers tous sexes confondus. Il reste ainsi le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier chez la femme, avec 17.9% des décès féminins par cancer (12 146 décès) en 2018. Les taux d'incidence et de mortalité sont 99.9 et 14 pour 100 000 personnes-années, respectivement. Le nombre de femmes atteintes par le cancer du sein a presque doublé entre 1990 et 2018, avec une augmentation annuelle de l'incidence de 1.1%. Toutefois, au cours de la dernière décennie (2010-2018) on observe que l'augmentation de l'incidence a été réduite à 0.6%/an (**Figure 6**). Le dépistage massif, l'augmentation du risque et le vieillissement de la population pourraient expliquer l'augmentation constante du nombre de nouveaux cas de cancer du sein diagnostiqués en France. D'un autre côté, le taux de mortalité est en baisse ces 30 dernières années, avec une diminution annuelle de 1.6% depuis 2010 (29). Cette diminution de la mortalité est le résultat de l'amélioration des stratégies thérapeutiques et du dépistage de plus en plus à un stade précoce de la maladie.

L'âge médian au diagnostic est de 63 ans, tandis que l'âge médian au décès est de 74 ans. Néanmoins, 22% des cancers du sein touchent les femmes jeunes de moins de 50 ans (30) et on observe une augmentation de l'incidence du cancer du sein à partir de 30 ans (**Figure 7**) (29). Ces femmes jeunes ont tendance à présenter une maladie plus agressive, souvent de type moléculaire triple négatif, nécessitant une prise en charge par chimiothérapie, connue pour ses multiples effets indésirables, notamment gonadotoxiques (31).

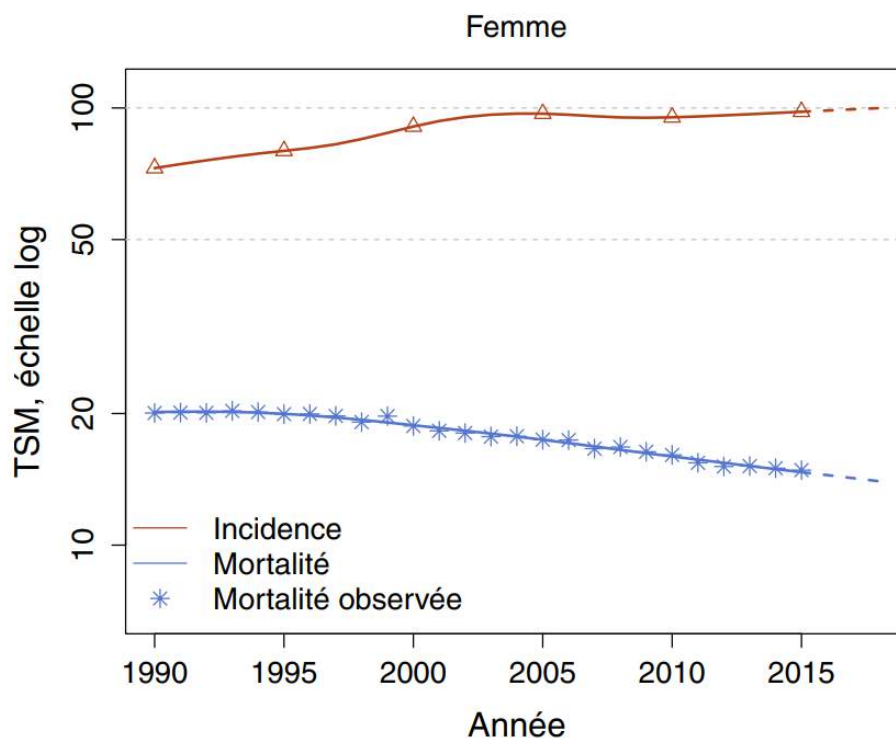


Figure 6 - Taux d'incidence et de mortalité par cancer du sein en France entre 1990 et 2018 (Source : Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Volume 1 - tumeurs solides) TSM : Taux standardisé monde

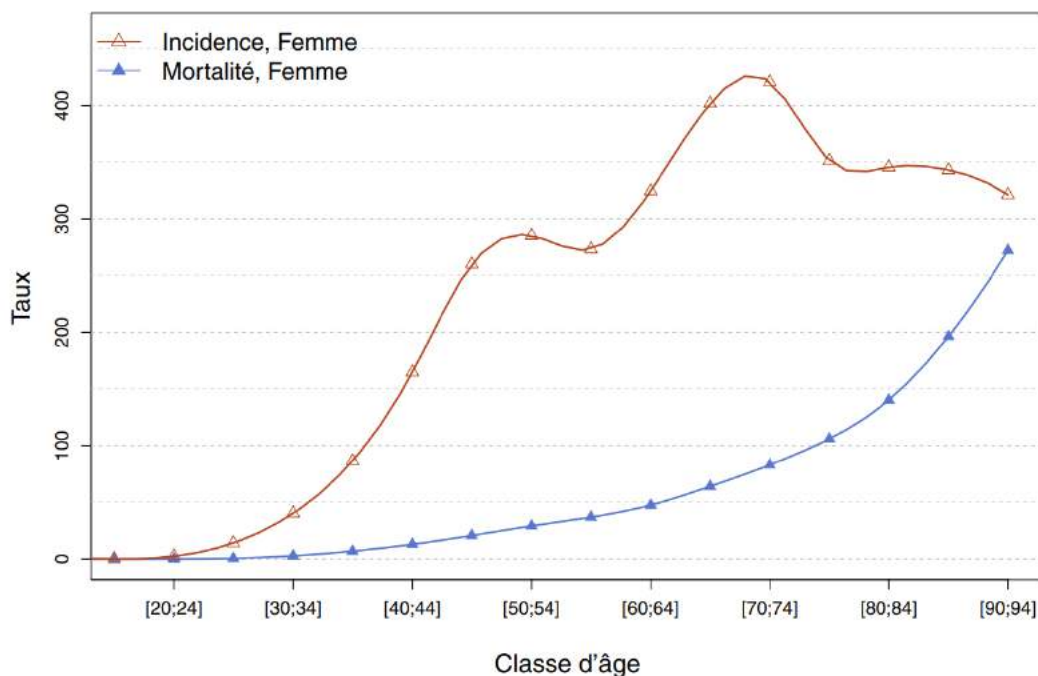


Figure 7 - Taux d'incidence et de mortalité par cancer du sein en France en 2018 selon les différentes classes d'âge (Source: Estimation nationale de l'incidence et de mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Volume 1 - tumeur solides)

1.1.4. FACTEURS DE RISQUE ET FACTEURS PROTECTEURS

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la survenue d'un cancer du sein. Certains de ces facteurs de risque sont intrinsèques (propre à chaque patiente ou interne), d'autres sont extrinsèques.

Tout d'abord, parmi les facteurs internes, **l'âge** reste le plus important. En effet, 78% des cancers du sein surviennent après 50 ans, et l'incidence augmente avec l'âge (30). En France, depuis 2004, le programme national du dépistage organisé du cancer du sein propose aux femmes entre 50 et 74 ans, sans symptômes, ni facteurs de risque, de réaliser un examen par mammographie tous les deux ans. Cependant, en 2017, seulement 49.9% de la population cible a participé au programme de dépistage, bien au-dessous de l'objectif européen de 70% (32).

De plus, **l'histoire personnelle/familiale** et les **antécédents familiaux de cancer** sont un facteur majeur à prendre en compte. Il a été montré que les femmes dont la mère et/ou la sœur ont eu un cancer du sein, présentent un risque accru de développer cette maladie (33). Brewer et al. ont présenté les résultats d'un essai prospectif sur plus de 100 000 femmes, cherchant à établir un lien entre l'histoire familiale de cancer du sein et le risque de développement de cette maladie. Ils ont montré un risque 1.8 fois plus important chez les femmes avec un antécédent familial de cancer du sein versus les femmes sans antécédents familiaux. Ce risque était 2.5 fois plus élevé si au moins 2 cas de cancer du sein avaient été diagnostiqués dans la famille proche. Pareillement, le risque était 2.5 fois plus élevé si les antécédents concernaient la mère et la sœur et/ou survenaient avant l'âge de 45 ans (34,35). Outre les antécédents familiaux, les antécédents personnels de cancer du sein sont associés à un risque 3 à 4 fois plus important de développer un nouveau cancer du sein, comparé à une femme du même âge n'ayant jamais eu un cancer. Les affections bénignes de la glande mammaires augmentent elles aussi le risque de survenue de cancer du sein (36).

En outre, ce risque devient plus important si les femmes sont atteintes d'une mutation des gènes **BRCA1** et/ou **BRCA2** (*Breast cancer associated gene 1* et/ou *2*), connus pour leur implication dans l'apparition du cancer du sein, souvent à un âge précoce. Ces gènes codent des protéines suppresseurs de tumeur et leurs mutations engendrent une instabilité génétique et des anomalies du cycle cellulaire. Les mutations

BRCA 1/2 sont présentes chez 5% à 10% des femmes atteintes d'un cancer du sein et sont responsable d'un quart des cancers du sein héréditaires (5,35,37).

Puis, **le temps d'exposition aux hormones**, notamment à l'œstrogène, est un élément favorisant la tumorigenèse mammaire. En effet, **la puberté précoce, la ménopause tardive, la nulliparité** et une **première grossesse à un âge plus avancé** augmentent le risque de survenue de ce type de maladie (38,39). Il a été montré que le risque de cancer du sein augmente de 3% pour chaque année de ménopause tardive. En revanche, ce risque diminue de 5% pour chaque année de puberté tardive. D'ailleurs, dans les pays occidentaux, on observe une augmentation du nombre de femmes nullipares. Or, le risque de survenue du cancer du sein diminue de 10% pour chaque grossesse menée à terme (35). Enfin, plus une femme est âgée lors du premier accouchement, moins elle est protégée par la grossesse contre le risque de survenue du cancer du sein (40).

Un autre facteur de risque propre à chaque femme est la **densité du tissu mammaire**. Une densité élevée serait corrélée à un risque jusqu'à six fois plus important de développement de cancer du sein, par rapport aux femmes avec une densité mammaire faible (41,42).

Concernant les facteurs extrinsèques, on retrouve des facteurs environnementaux, tels que **l'exposition aux radiations, aux substances toxiques, à la pollution**, ou même le fait de vivre dans un **pays développé**. Le risque d'apparition du cancer est augmenté non seulement par l'environnement, mais aussi par les **comportements alimentaires à risque**.

Notamment, la consommation d'alcool augmente le taux des œstrogènes dans la circulation sanguine. En 2015, en France, on estimait qu'environ 15% des cancers du sein étaient attribuables à **l'excès de la consommation d'alcool**, tandis que 4.4% des cas étaient dus au **tabagisme** (43).

Enfin, l'alimentation riche en lipides et **l'obésité** sont un facteur important de développement de cancer du sein. D'après le Centre International de Recherche sur le Cancer de l'OMS, environ 10.6% des cancers du sein survenant chez les femmes de plus de 30 ans, en France en 2015, étaient attribuables au surpoids et à l'obésité (43). Chez la femme ménopausée, l'obésité contribue à l'exposition de l'organisme aux hormones,

notamment aux œstrogènes, qui ne sont plus produites par les ovaires. En effet, la réaction de conversion des androgènes en œstrogènes après la ménopause est catalysée par l'aromatase, une enzyme qui se trouve majoritairement dans les tissus adipeux (38). De plus, l'obésité augmente le taux d'insuline, qui à son tour stimule la production d'androgènes par les ovaires et les glandes surrénaliennes (44). Il a également été montré que la densité du tissu mammaire est très élevée chez les femmes dont l'indice de la masse corporelle (IMC) est élevé (41).

Enfin, l'utilisation des **traitements hormonaux substitutifs** (THS) pour traiter les signes climatériques de la ménopause, serait potentiellement un autre facteur de risque de développement du cancer du sein (5,37). Plusieurs études ont montré que l'utilisation du THS augmente la densité du tissu mammaire après la ménopause, favorisant ainsi la survenue du cancer du sein (42).

Néanmoins, des facteurs protecteurs contre le cancer du sein ont été identifiés, tels que l'allaitement et la multiparité. En fait, le risque de cancer du sein diminue jusqu'à 4.5% pour chaque année d'allaitement, en plus de la diminution de 10% pour chaque accouchement (40).

Enfin et surtout, l'activité physique régulière est un facteur protecteur connu pour tous les types de cancer, y compris le cancer du sein. Il a été montré dans plusieurs études que l'activité physique non seulement aide à éviter le surpoids et l'obésité, mais encore elle réduit le taux d'insuline, renforce le système immunitaire et produit un effet anti-inflammatoire (35,37,45,46). Le risque de développement de cancer du sein diminue de 25% chez les femmes pratiquant une activité physique régulière (47). L'OMS recommande 150-300 minutes d'activité physique d'intensité modérée par semaine ainsi qu'au moins deux jours par semaine de renforcement musculaire modéré ou intense, pour les personnes de plus de 18 ans (48).

L'identification des facteurs de risque du cancer du sein, liés à l'environnement et au mode de vie, ainsi que des facteurs protecteurs, est une étape importante dans la lutte contre cette maladie. Elle permettrait de sensibiliser le public, afin de changer les comportements à risque modulables et d'éviter au maximum ce type de cancer. En résumé, le **Tableau 1** reprend les facteurs de risque et les facteurs protecteurs dans le cancer du sein.

Tableau 1 - Cancer du sein : les facteurs de risque et les facteurs protecteurs

Facteurs de risque du cancer du sein	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <u>Intrinsèques</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ Sexe, âge ○ Antécédents personnels/familiaux de cancer du sein ○ Prédispositions génétiques ○ Facteurs liés à la reproduction (ménopause tardive, puberté précoce, nulliparité, âge avancé à la première grossesse) ○ Densité du tissu mammaire ➤ <u>Extrinsèques</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ Expositions aux radiations, substances toxiques, à la pollution ○ Comportements alimentaires (alcool, tabac, obésité) ○ Traitement hormonal substitutif ○ Vivre dans un pays développé
Facteurs protecteurs contre le cancer du sein	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Allaitement ➤ Multiparité ➤ Activité physique

1.1.5. LE DIAGNOSTIC DU CANCER DU SEIN

1.1.5.1. L'examen clinique

Le diagnostic du cancer du sein repose premièrement sur une **évaluation clinique** par un médecin oncologue ou sénologue, les examens d'imagerie (**mammographie, échographie**) et enfin la confirmation anatomopathologique (**biopsie**). L'évaluation clinique comprend la palpation manuelle des seins et des ganglions lymphatiques. Les éléments évocateurs d'un cancer du sein lors de l'examen clinique sont la palpation d'une masse dans le sein et/ou les ganglions axillaires, la rétraction ou un écoulement du mamelon ou bien la présence de signes inflammatoires locaux. Lorsqu'une anomalie est détectée, le médecin oncologue ou sénologue détermine le stade de la maladie, à l'aide de la **classification TNM (Tableau 2)**. La **taille de la tumeur (T)**, le **nombre de ganglions lymphatiques atteints** par la maladie (**N**) et la **présence de métastases (M)** permettent de classer les cancers du sein en différents stades cliniques. La 8^{ème} édition de la classification TNM et des différents stades du cancer du sein, détaillée en **Annexe 2**, prend en compte non seulement les paramètres anatomiques, mais également les paramètres moléculaires pour définir le stade clinique. L'*American Joint Committee on Cancer* propose que l'ancienne classification basée exclusivement sur les paramètres anatomiques (T, N et M) soit utilisée uniquement dans les pays où l'analyse des biomarqueurs moléculaires n'est pas disponible (49).

Tableau 2 - La classification TNM clinique du cancer du sein (Source : *American Joint Committee on Cancer – Breast Cancer Staging System*)

Catégorie T	Critères cliniques et/ou pathologiques
TX	La taille de la tumeur ne peut être évaluée
T0	Absence de tumeur primaire
Tis (CCIS)	Carcinome canalaire <i>in situ</i> (Le carcinome lobulaire <i>in situ</i> est considéré comme une lésion bénigne et a été retiré de la 8 ^{ème} édition de la classification TNM)
Tis (Paget)	Maladie de Paget non associée à un carcinome infiltrant ou <i>in situ</i>
T1	Tumeur ≤ 20mm dans la plus grande dimension
T1mi	Tumeur ≤ 1mm dans la plus grande dimension
T1a	Tumeur > 1mm mais ≤ 5mm dans la plus grande dimension
T1b	Tumeur > 5mm mais ≤ 10mm dans la plus grande dimension
T1c	Tumeur > 10mm mais ≤ 20mm dans la plus grande dimension
T2	Tumeur > 20mm mais ≤ 50mm dans la plus grande dimension
T3	Tumeur > 50mm dans la plus grande dimension
T4	Tumeur de toute taille avec extension à la paroi thoracique et/ou la peau
T4a	Extension à la paroi thoracique
T4b	Œdème ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation

T4c T4d	situés sur la peau du même sein T4a et T4b Cancer du sein inflammatoire
Catégorie N	Critères cliniques
cNX	Les ganglions lymphatiques ne peuvent être évalués
cN0	Absence d'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux
cN1 cN1mi	Envahissement des ganglions lymphatiques axillaires homolatéraux de niveau I et/ou II Micrométastases (environ 200 cellules, entre 0.2 et 2.0 mm)
cN2 cN2a cN2b	Envahissement des ganglions lymphatiques axillaires homolatéraux de niveau I et/ou II, qui sont cliniquement fixés OU des ganglions mammaires internes en absence d'envahissement des ganglions axillaires Envahissement des ganglions lymphatiques axillaires homolatéraux de niveau I et/ou II, fixés ensemble ou à d'autres structures Envahissement des ganglions mammaires internes en absence d'envahissement des ganglions axillaires
cN3 cN3a cN3b cN3c	Envahissement des ganglions sous-claviculaires homolatéraux (axillaires niveau III) avec ou sans envahissement des ganglions axillaires de niveau I et II OU des ganglions mammaires internes homolatéraux + ganglions axillaires de niveau I et/ou II OU des ganglions sus-claviculaires homolatéraux avec ou sans envahissement des ganglions mammaires internes ou axillaires Envahissement des ganglions sous-claviculaires homolatéraux Envahissement des ganglions mammaires internes et axillaires homolatéraux Envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux
Catégorie M	Critères
M0	Absence de métastases à distance (évaluation clinique ou radiologique)
cM1	Métastases à distance, détectées à l'aide d'un examen clinique ou radiologique
pM1	Métastases à distances, prouvées histologiquement

1.1.5.2. Les examens d'imagerie

L'examen clinique est ensuite complété par des examens d'imagerie. La mammographie et l'échographie des deux seins sont les techniques d'imagerie de routine. La mammographie permet d'obtenir des images des seins à l'aide de rayons X et de détecter d'éventuelles anomalies. Cet examen peut être réalisé dans un contexte symptomatique ou dans le cadre du programme national de dépistage du cancer du sein, pour les femmes entre 50 et 74 ans. Les résultats de la mammographie permettent de classer les anomalies selon le système BIRADS™ (*Breast Imaging Reporting and Data System*) de l'*American College of Radiology* (ACR) (50–53). Une description succincte des

différentes catégories BIRADS et de leurs interprétations est donnée dans le **Tableau 3**. Pour une description plus complète voir **Annexe 3**.

Tableau 3 - Classification BIRADS™ de la mammographie

Catégorie	Interprétation
ACR - BIRADS 0	Investigation incomplète.
ACR - BIRADS 1	Mammographie normale.
ACR - BIRADS 2	Anomalie bénigne ne nécessitant ni surveillance, ni examens complémentaires.
ACR - BIRADS 3	Anomalie probablement bénigne, suivi nécessaire dans 6 mois.
ACR - BIRADS 4	Suspicion de malignité, biopsie nécessaire.
4A	Biopsie bénigne, faible probabilité de malignité, surveillance nécessaire dans 6 mois.
4B	Probabilité intermédiaire de malignité.
4C	Forte probabilité de malignité.
ACR - BIRADS 5	Malignité, nécessité de biopsie et/ou de chirurgie.
ACR - BIRADS 6	Malignité prouvée histologiquement. L'imagerie est réalisée après la chimiothérapie.

La mammographie est accompagnée d'un examen échographique des deux seins, qui donne des informations complémentaires en cas de résultats suspects sur la mammographie ou lorsque la densité des seins ne permet pas d'obtenir des images de qualité par mammographie. L'échographie peut également aider à guider la biopsie. L'imagerie par résonance magnétique (IRM), quant à elle, est prescrite en cas de discordance entre l'examen clinique et l'imagerie de routine, ou lorsque l'on suspecte de multiples lésions (54).

1.1.5.3. L'examen anatomopathologique

Enfin, le diagnostic du cancer du sein est établi par l'analyse anatomopathologique, réalisée sur des fragments de tissu tumoral prélevé à l'aide d'une aiguille lors d'une biopsie. L'analyse anatomopathologique consiste à étudier au microscope les cellules et le tissu prélevés, et permet de déterminer le type histologique (adénocarcinome *in situ* ou infiltrant, canalaire ou lobulaire), la présence ou non des récepteurs aux hormones (œstrogène et progestérone) ainsi que la surexpression du

gène codant pour la protéine HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*). Tous ces paramètres sont nécessaires à une décision thérapeutique adaptée (55). Un deuxième examen anatomopathologique est réalisé sur la pièce opératoire, prélevée lors d'une intervention chirurgicale.

Lorsque la présence d'une tumeur est confirmée, un bilan d'extension est prévu pour rechercher des métastases éventuelles. Ce bilan est réalisé grâce à des examens complémentaires tels que le scanner du thorax-abdomen-pelvis, l'échographie abdominale, la scintigraphie osseuse ou encore la radiographie du thorax.

En outre, la classification de Scarff Bloom et Richardson (SBR) classe les tumeurs en trois grades, selon le niveau de différenciation des cellules tumorales. Le grade est calculé selon un score, qui peut aller de 3 à 9. Le score est basé sur 3 paramètres : les formations tubulaires, les pléomorphismes nucléaires et le nombre de mitoses. Un score de 1 à 3 est donné à chaque paramètre, 1 étant un score favorable, et 3 un score défavorable. L'addition des scores pour chaque paramètre va donner un score final, permettant de déterminer le grade SBR. Un score entre 3 et 5 correspond au grade I, un score de 6 ou 7 c'est un grade II, et un score de 8 ou 9 correspond au grade III. Les cancers de grades SBR II ou III sont agressifs et de mauvais pronostic. Ils présentent des cellules peu différenciées qui se multiplient et se propagent rapidement, tandis que les cancers de grade SBR I présentent des cellules bien différenciées, qui ressemblent aux cellules normales (12).

1.1.6. CLASSIFICATION MOLECULAIRE

Le cancer du sein est une maladie hétérogène non seulement d'un point de vue histologique, mais aussi moléculaire. Quatre grands sous-types moléculaires qui déterminent la prise en charge sont identifiés : **Luminal-A, Luminal-B, HER2 enrichi et triple négatif**. Cependant, les analyses d'expression génique basées sur les aberrations du nombre de copies de gènes (CNAs) mettent en évidence jusqu'à dix sous-types du cancer du sein (28). Les CNAs décrivent les délétions et/ou les amplifications de grandes régions génomiques et sont des mutations fréquentes liées au développement du cancer (56). Les dix sous-types identifiés par ces analyses ont des profils pronostiques différents et ne sont pas encore utilisés dans la prise en charge des patients (57). Dans la pratique courante, l'analyse du tissu tumoral permet de déterminer le sous-type moléculaire, en se basant sur les éléments suivants : expression des RO, RP, le statut HER2 et la prolifération tumorale mesurée par le Ki67.

La détermination du statut des récepteurs aux hormones repose sur une analyse immunohistochimique (IHC) des coupes de tissu fixé et inclus en paraffine. Le marquage nucléaire de plus d'un pourcent des cellules tumorales est considéré comme un statut hormonal positif (RH+). Toutefois, certains laboratoires utilisent un seuil d'au moins 10% de cellules tumorales marquées pour définir la positivité d'expression des récepteurs aux hormones. En outre, cette analyse d'IHC permet de déterminer le score Allred, qui peut prendre des valeurs entre 0 et 8, prenant en compte la proportion des cellules tumorales marquées et l'intensité de marquage (58).

Le *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2) est une protéine transmembranaire, impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire et codée par le gène *ERBB2*. L'augmentation du nombre de copies de ce gène entraîne une surexpression de la protéine et par conséquent une prolifération tumorale. Cette surexpression peut être mise en évidence par IHC ou par hybridation *in situ* (FISH). Le résultat de l'analyse par IHC est donné sous forme d'un score : un score 0 ou 1+ correspond à un statut HER2 négatif, un score 3+ correspond à un statut positif, tandis que le score 2+ nécessite une analyse complémentaire par FISH. L'analyse des récepteurs aux hormones et de la protéine HER2 est essentielle et obligatoire pour déterminer le sous-type moléculaire et la stratégie thérapeutique adaptée.

Un autre marqueur important c'est le Ki67, une protéine nucléaire impliquée dans la prolifération cellulaire, dont le rôle pronostique a été démontré dans plusieurs études. Le score Ki67 est déterminé par un marquage nucléaire et correspond au pourcentage des cellules marquées parmi toutes les cellules malignes. Cependant, les seuils qui désignent les populations « Ki67 bas » et « Ki67 élevé » varient beaucoup d'une étude à l'autre, le seuil décrit le plus souvent étant entre 10% et 20% (59).

Les cancers du sein de sous-type Luminal-A représentent 40% de tous les cancers du sein et sont caractérisés par une expression des RO, RP ou les deux, l'absence de surexpression d'HER2 et une faible prolifération, contrairement aux cancers de sous-type Luminal-B, qui eux ont une prolifération élevée et constituent 20% des cancers du sein (60). Ceux de type HER2 enrichi (environ 15% des cancers du sein) surexpriment la protéine HER2 et tendent à être RH-. Enfin, environ 77% des cancers du sein de type **basal-like** n'expriment pas les récepteurs aux hormones, ni la protéine HER2, mais on retrouve des marqueurs de type basal, tel que les cytokératines CK5, CK6 ou CK17 (60). L'analyse par IHC a introduit le terme « **triple négatif** », pour décrire l'absence de RO, RP et HER2, cependant les termes « triple négatif » et « basal-like » ne sont pas entièrement synonymes (61). En effet, environ 75% des cancers du sein triple négatifs sont basal-like et tendent à avoir un pronostic plus sombre que les cancers du sein triple négatifs n'exprimant pas les marqueurs de type basal (27,62). Ainsi, les classifications immunohistochimiques et moléculaires ne sont pas entièrement compatibles (**Figure 8**). En l'absence d'une définition internationalement acceptée du cancer du sein basal-like, actuellement ce terme n'est pas utilisé dans la pratique clinique (61). Les différentes caractéristiques moléculaires des quatre grands sous-types sont présentées dans le **Tableau 4**.

Ces différentes classes moléculaires n'ont pas le même pronostic, taux de rechute ou sensibilité aux traitements. Les différentes stratégies thérapeutiques pour chaque classe sont détaillées dans la section 1.1.7.

En fonction des caractéristiques moléculaires, des examens pronostiques génomiques, tels qu'Oncotype Dx®, Endopredict®, MammaPrint® ou PAM50, peuvent être prescrits. Ces tests sont réalisés sur du tissu tumoral afin d'évaluer l'activité de certains gènes impliqués dans la croissance et la propagation des cellules tumorales. En fonction des résultats, différentes stratégies thérapeutiques peuvent être mises en route

afin d'obtenir une meilleure réponse aux traitements, ainsi que d'éviter les rechutes et/ou les éventuelles métastases (63–66).

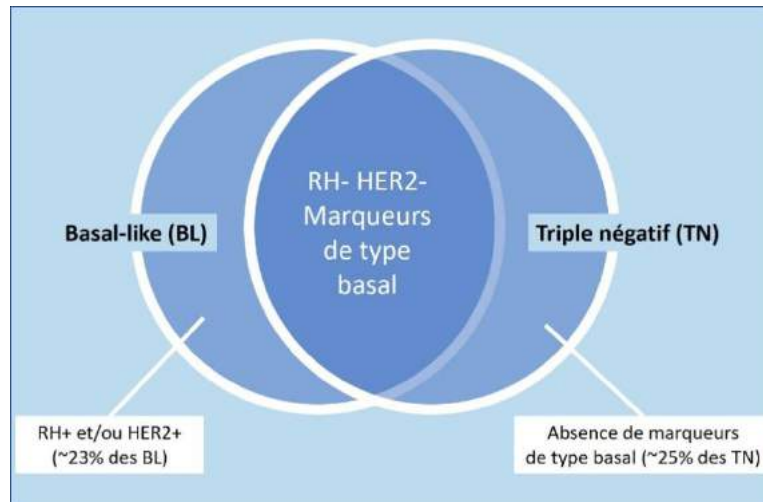


Figure 8 - Relation entre l'immunophénotype triple négatif et le sous-type moléculaire basal-like du cancer du sein
(Source personnelle, image créée par Sejdi LUSHO)

Tableau 4 - Classification moléculaire des cancers du sein

	RO	RP	HER2	Prolifération (Ki67)
Luminal-A	+	+/-	-	Faible (<20%)
Luminal-B	+	+/-	+/-	Elevée (≥20%)
HER2-enrichi (HER2+)	-	-	+	
Triple négatif (TN)	-	-	-	

1.1.7. PRISE EN CHARGE

Le choix du traitement du cancer du sein se fait par des médecins de différentes spécialités lors d'une Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP). La prise en charge thérapeutique du cancer du sein non métastatique est multiple et comprend notamment un traitement loco-régional par chirurgie qui peut être complété par une radiothérapie et/ou des traitements médicamenteux systémiques (chimiothérapie et/ou hormonothérapie et/ou thérapie ciblée). La **Figure 9** montre l'arbre décisionnel de la prise en charge du cancer du sein non métastatique (67).

1.1.7.1. La chirurgie

La chirurgie consiste à enlever par un acte chirurgical la tumeur et une partie du tissu mammaire sain environnant (les marges). On parle alors de **tumorectomie** ou de chirurgie conservatrice, qui permet la résection de la tumeur, tout en préservant le sein. Bien que ce type de chirurgie soit privilégié, dans certains cas, il est nécessaire d'enlever la totalité du sein (**mastectomie**). La décision sur le type de chirurgie à réaliser se fait en prenant en compte la taille de la tumeur, le rapport du volume tumoral sur le volume du sein et le nombre de foyers tumoraux. Une méta-analyse de plusieurs essais cliniques randomisés a montré que les taux de survie globale et de survie sans rechute sont comparables entre les patients traités par tumorectomie et ceux traités par mastectomie (68). Dans tous les cas, une exploration des ganglions lymphatiques est réalisée. Elle consiste à prélever et à analyser tout d'abord le ganglion lymphatique sentinelle, le ganglion le plus proche de la masse tumorale. Lorsque le ganglion sentinelle est envahi par des cellules tumorales, un curage ganglionnaire est envisagé (28,51).

La pièce opératoire, qui correspond au tissu mammaire retiré lors de la chirurgie, subit ensuite une analyse anatomopathologique pour explorer les caractéristiques anatomiques et moléculaires de la tumeur. Cette analyse permet de vérifier si les marges d'exérèse sont suffisantes ou si une intervention supplémentaire est nécessaire. De plus, la classification TNM pathologique, c'est-à-dire après la chirurgie, est déterminée par cette analyse. Enfin, les résultats de l'analyse de la pièce opératoire orientent la prise en charge thérapeutique après la chirurgie.

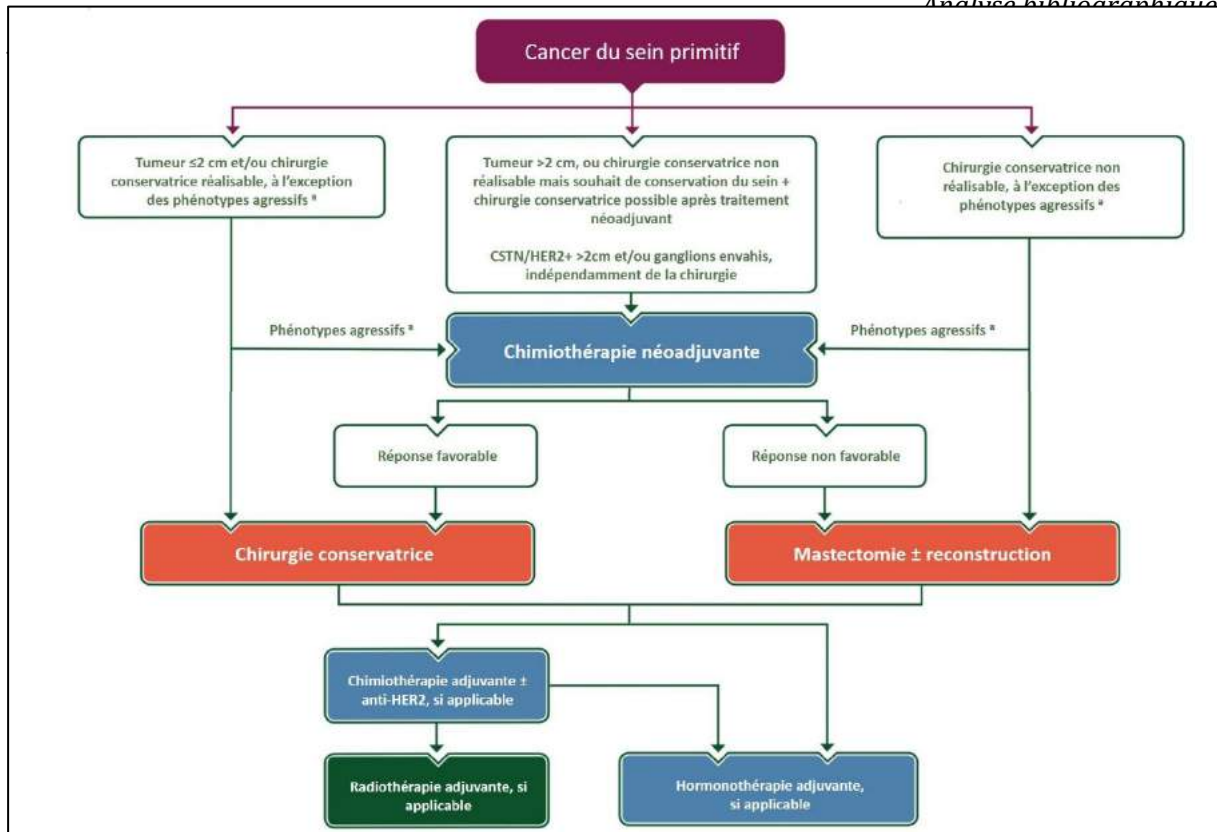


Figure 9 - Arbre décisionnel de la prise en charge du cancer du sein non métastatique.
(Source : *Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up* (<https://www.esmo.org/guidelines/breast-cancer/early-breast-cancer>))

CSTN : Cancer du sein triple négatif

^a phénotypes agressifs, CSTN et/ou HER2+

1.1.7.2. La radiothérapie

Le deuxième traitement locorégional qui complète la chirurgie est la radiothérapie. Il s'agit d'une technique utilisant des rayonnements ionisants dirigés vers la zone traitée pour détruire les cellules cancéreuses restantes après les traitements précédant la radiothérapie. Ces rayonnements sont capables d'entraîner des cassures des brins de l'ADN des cellules tumorales et rendre impossible leur survie. La radiothérapie externe, qui consiste à utiliser une source de rayonnements placée à l'extérieur du corps, est la technique standard pour traiter le cancer du sein. Après une chirurgie conservatrice, la glande mammaire et le lit tumoral sont irradiés, tandis que la paroi thoracique est irradiée si la radiothérapie succède la mastectomie d'une tumeur invasive présentant des risques de récurrence. Dans tous les cas, une irradiation des ganglions est envisagée, en fonction de leur envahissement par des cellules cancéreuses, quel que soit le type de chirurgie.

En général, la dose utilisée pour traiter un cancer du sein non métastatique est de 50 Gy (Gray) répartie sur 25 séances de 2 Gy. Le traitement s'étend sur 5 semaines (5 séances par semaine), mais dans certains cas, la radiothérapie peut être administrée sur une période plus courte ; on parle alors de radiothérapie hypofractionnée (69).

Afin de réaliser une reconstruction mammaire immédiate lors d'une chirurgie non conservatrice, il est nécessaire que la radiothérapie soit réalisée dans un cadre néo-adjuvant, c'est-à-dire, avant la chirurgie. On parle alors d'une séquence inversée.

Le bénéfice principal de la radiothérapie, c'est-à-dire la réduction du risque de récurrence et de décès du cancer du sein, est bien documenté dans la littérature (70), néanmoins, les effets secondaires ne sont pas négligeables. En effet, les rayons émis par l'accélérateur de particules atteignent aussi bien les cellules saines que les cellules tumorales. Les effets secondaires peuvent être immédiats ou tardifs et toucher plusieurs organes, notamment les poumons, le cœur, le sein, la peau et les ganglions. Dans de très rares cas, la radiothérapie engendre le développement de tumeurs dites radio-induites, notamment des poumons ou du sein (71,72). Le **Tableau 5** décrit les différents effets secondaires de la radiothérapie.

Tableau 5 - Effets secondaire de la radiothérapie du cancer du sein

Organe	Effet secondaire immédiat	Effet secondaire tardif
Poumon	Infection, pneumonie	Tumeur radio-induite
Plèvre	Epanchement pleural	
Cœur	Epanchement péricardique	Coronaropathie, péricardite
Sein	Œdème	Douleur, cancer du sein radio-induit
Peau	Rougeur de la peau	Irritation de la peau
Ganglions		Lymphœdème

1.1.7.3. Les traitements systémiques – l'hormonothérapie

Les traitements locorégionaux seuls ne suffisent pas pour traiter de façon optimale le cancer du sein infiltrant. En fonction des caractéristiques moléculaires (récepteurs hormonaux, statut HER2, mutation *BRCA*) et anatomiques (taille de la tumeur, nombre de ganglions envahis) de la tumeur, des traitements systémiques peuvent être administrés. Il s'agit de traitements médicamenteux qui agissent sur

l'ensemble des cellules de l'organisme. Les traitements systémiques standards utilisés dans la prise en charge du cancer du sein sont (1) **l'hormonothérapie** (traitement antihormonal), (2) **les thérapies ciblées** et (3) **la chimiothérapie**.

Environ 60% des cancers du sein appartiennent à la classe moléculaire Luminal (A/B), caractérisée par l'expression des récepteurs aux hormones (œstrogène et progestérone). Les patientes atteintes de ce type de cancer peuvent bénéficier d'un traitement antihormonal, souvent appelé hormonothérapie, qui a pour objectif d'empêcher l'activation des récepteurs hormonaux dans les cellules cancéreuses. Plusieurs molécules d'hormonothérapie existent, avec des indications et des mécanismes d'action différents.

Tout d'abord, chez les femmes non ménopausées, atteintes d'un cancer du sein hormono-dépendant (RH+), le **tamoxifène** à 20 mg/jour pendant cinq ans est l'hormonothérapie standard (28). Il s'agit d'une molécule non-stéroïdienne de la famille des triphényléthylènes qui a une affinité pour les RO. Le tamoxifène est un modulateur sélectif des RO, en raison de son activité ostrogénique à la fois agoniste et antagoniste, en fonction du tissu cible. Dans les tissus mammaires, le tamoxifène se lie aux RO et rentre en compétition avec les œstrogènes produites et sécrétées par les ovaires (**Figure 10**), en bloquant leur fixation et inhibant ainsi leur activité proliférative sur l'endothélium de la glande mammaire (73).

En ce qui concerne son efficacité, une méta-analyse réalisée sur 20 essais cliniques, a montré qu'un traitement par tamoxifène pour une durée de cinq ans, est corrélé à une réduction de 47% (Risque relatif RR = 0.53, $p < 0.0001$) du taux de rechute du cancer du sein dans les 4 premières années après le diagnostic, ainsi qu'à une réduction de 32% (RR = 0.68, $p < 0.0001$) du taux de rechute entre 5 et 9 ans après le diagnostic, par rapport aux patientes n'ayant jamais reçu de tamoxifène. De plus, le taux de décès dans les 15 ans suivant le diagnostic était environ 30% plus faible chez les patientes traitées par tamoxifène (74).

Les effets secondaires liés à l'utilisation du tamoxifène sont multiples et consistent principalement de signes climatériques de la ménopause, tels que les bouffées de chaleur, la sécheresse vaginale, la diminution de la libido et les troubles du sommeil. D'autres effets secondaires plus sérieux qui peuvent survenir sont les événements

thromboemboliques chez les patientes ayant un terrain de prédisposition, la dépression, les complications oculaires et plus rarement l'apparition d'un cancer de l'endomètre (75).

Chez les femmes ménopausées, d'autres hormonothérapies peuvent être prescrites, notamment les **inhibiteurs de l'aromatase (IA)**. En effet, lorsque la ménopause est installée, les ovaires cessent de produire de l'œstrogène, mais sa production continue d'être assurée par la conversion des androgènes, synthétisés dans les glandes surrénaliennes, en œstrogènes, grâce à l'aromatase. L'inhibition de cette enzyme diminue le taux d'œstrogène dans l'organisme et par conséquent arrête la prolifération des cellules cancéreuses hormono-dépendantes (**Figure 10**).

Les IA utilisés en France sont le létrozole (FEMARA®), l'anastrozole (ARIMIDEX®) et l'exémestan (AROMASINE®). Il a été montré que l'administration des IA pendant 5 ans réduit de 15% la mortalité, par rapport à un traitement de 5 ans par tamoxifène seul (76). Toutefois, un traitement antihormonal par IA, suivi par tamoxifène, peut être utilisé contre le cancer du sein chez la femme ménopausée. La plupart des effets secondaires associés au tamoxifène, notamment les signes climatiques de la ménopause, peuvent survenir également avec un traitement par IA. En outre, on observe une diminution de la densité osseuse et une augmentation de risque de fracture chez les femmes traitées par des IA. De plus, les myalgies et les arthralgies sont des effets secondaires fréquents des IA (75).

Ensuite, le fulvestrant (FASLODEX®) est un autre médicament antihormonal prescrit chez la femme ménopausée pour empêcher la fixation de l'œstrogène à son récepteur. Contrairement au tamoxifène, il agit en abimant les RO (**Figure 10**), n'a pas d'activité agoniste et est administré par injection intramusculaire. Le fulvestrant est indiqué en monothérapie dans le cancer du sein RH+ métastatique ou localement avancé, ou en association avec d'autres thérapies. Les principaux effets secondaires sont les bouffées de chaleur, les nausées, les vomissements et les céphalées (77,78).

Enfin, les analogues de la GnRH (*Gonadotropin-releasing hormone*) sont le dernier type d'hormonothérapie utilisé dans le traitement du cancer du sein de la femme non ménopausée de moins de 35 ans, ou présentant un risque élevé de rechute. En effet, la GnRH est une hormone produite et sécrétée par l'hypothalamus. Elle agit sur

l'hypophyse pour stimuler la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone de stimulation de follicules (FSH), qui vont à leur tour stimuler la production et la sécrétion de l'œstrogène et de la progestérone par les ovaires. Le taux de production et de sécrétion des hormones sexuelles (œstrogène et progestérone) est régulé par un rétrocontrôle négatif. Lorsque le taux de ces hormones augmente, elles agissent sur l'hypothalamus pour freiner la sécrétion de la GnRH et inhiber *in fine* leur propre sécrétion (**Figure 10**). L'hormonothérapie par analogues de GnRH se sert de ce même processus pour hyper-stimuler l'hypophyse et arrêter la production des hormones par les ovaires (79). Les analogues de la GnRH utilisés dans le traitement du cancer du sein sont la goséréline (ZOLADEX®) et la leuproréline (ENANTONE®).

D'après les résultats de plusieurs essais cliniques, l'association du tamoxifène ou des IA avec les analogues de la GnRH améliorerait la survie sans rechute des patientes atteintes d'un cancer du sein (28). Les principaux effets secondaires associés aux analogues de la GnRH sont la diminution de la densité osseuse et une castration chimique accompagnée de signes climatériques de la ménopause (80). Le **Tableau 6** reprend les différents types d'hormonothérapie utilisés pour traiter le cancer du sein.

Tableau 6 - Les hormonothérapies utilisées dans le cancer du sein

Hormonothérapie	Indication	Mécanisme d'action	Effets secondaires
tamoxifène	Femmes ménopausées ou non	Rentre en compétition avec l'œstrogène sur les RO	Signes climatériques, événements thrombo-emboliques, cancer de l'endomètre
Inhibiteurs d'aromatase	Femmes ménopausées	Inhibition de l'activité de l'aromatase	Diminution de la densité osseuse, risque de fracture, signes climatériques
fulvestrant	Femmes ménopausées	Abime les RO, inhibe la fixation des œstrogènes	Bouffées de chaleur, nausées, vomissements, céphalées
Analogues de la GnRH	Femmes non ménopausées avec risque élevé de rechute	Hyper-stimule l'hypophyse et inhibe la voie de production des œstrogènes	Castration chimique (ménopause + signes climatériques), diminution de la densité osseuse

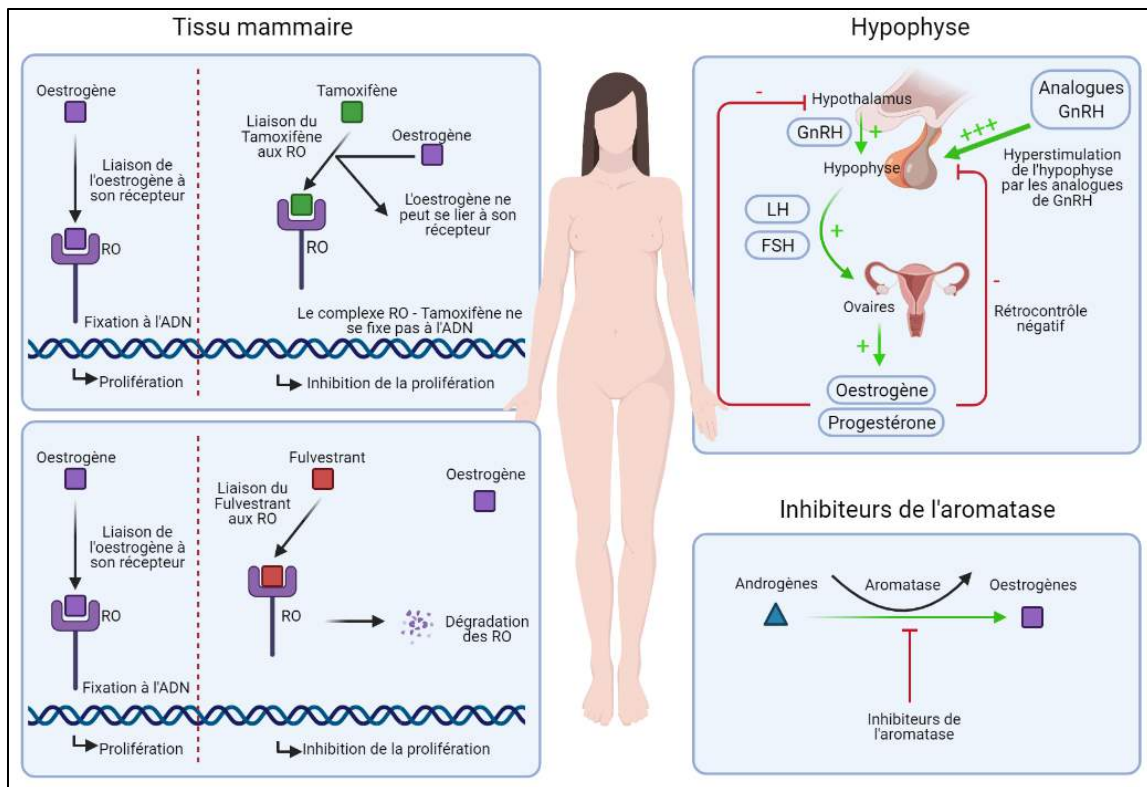


Figure 10 – Schéma simplifié des mécanismes d'action des différentes hormonothérapies contre le cancer du sein.

RO : Récepteurs aux œstrogènes

(Source personnelle, image créée par Sejdi LUSHO)

1.1.7.4. Les traitements systémiques – les thérapies ciblées

La protéine transmembranaire HER2 est surexprimée dans environ 15% des cancers du sein et impliquée dans la prolifération des cellules tumorales. Des stratégies thérapeutiques ciblées contre cette protéine ont été développées, telles que le trastuzumab (HERCEPTIN®). Il s'agit d'un anticorps monoclonal qui bloque la fixation des facteurs de croissance sur l'HER2 et inhibe ainsi la voie de signalisation en aval et enfin la croissance tumorale.

Le trastuzumab (HERCEPTIN®) est un traitement prescrit de manière systématique contre le cancer du sein HER2+. Dans le cadre néo-adjuvant, il peut être administré de manière concomitante à la chimiothérapie de type taxanes. En cas de réponse pathologique non complète à cette association, le trastuzumab est poursuivi en adjuvant, conjugué à l'emtansine (TDM-1, nom commercial KADCYLA®) (81).

Le pertuzumab (PERJETA®) est un autre anticorps monoclonal qui a été testé dans le cancer du sein HER2+, en néo-adjuvant, en combinaison avec le trastuzumab et les agents cytotoxiques de types taxanes (28). Les résultats des essais cliniques montrent une augmentation du taux de réponse pathologique complète (pCR) chez les patientes traitées par cette combinaison, par rapport aux patientes ayant reçu uniquement trastuzumab + chimiothérapie. Le pertuzumab est également utilisé dans le cadre adjuvant chez les patientes présentant un risque élevé de rechute du cancer du sein HER2+ (82).

D'autres thérapies ciblées sont indiquées dans le traitement du cancer du sein RH+/HER2-, telles que le palbociclib (IBRANCE®) et l'évérolimus (AFINITOR®). Ce sont des inhibiteurs des protéines kinases CDK4/6 (*Cyclin-dependent kinase*) et mTOR (mechanistic target of rapamycin), respectivement, connues pour leur implication dans la tumorigenèse mammaire (83).

Enfin, le bevacizumab (AVASTIN®) est un anticorps monoclonal qui empêche l'angiogenèse, en se fixant sur les récepteurs aux VEGF et en bloquant leur activation. Cette thérapie est utilisée exclusivement dans le traitement du cancer du sein métastatique, combinée à la chimiothérapie. Son administration a été prouvée bénéfique pour améliorer la survie sans rechute, mais pas la survie globale du cancer du sein métastatique (28). Le **Tableau 7** et la **Figure 11** reprennent les différents types de thérapies ciblées utilisés pour traiter le cancer du sein et leurs mécanismes d'action.

Tableau 7 - Les thérapies ciblées utilisées dans le cancer du sein

Thérapie ciblée	Mécanisme d'action
trastuzumab (HERCETPIN®)	Inhibition des voies de signalisation de HER2
pertuzumab (PERJETA®)	Inhibition des voies de signalisation de HER2
palbociclib (IBRANCE®)	Inhibition des voies de signalisation des CDK4 et CDK6
évérolimus (AFINITOR®)	Inhibition des voies de signalisation de mTOR
bevacizumab (AVASTIN®)	Inhibition de la fixation du VEGF à son récepteur

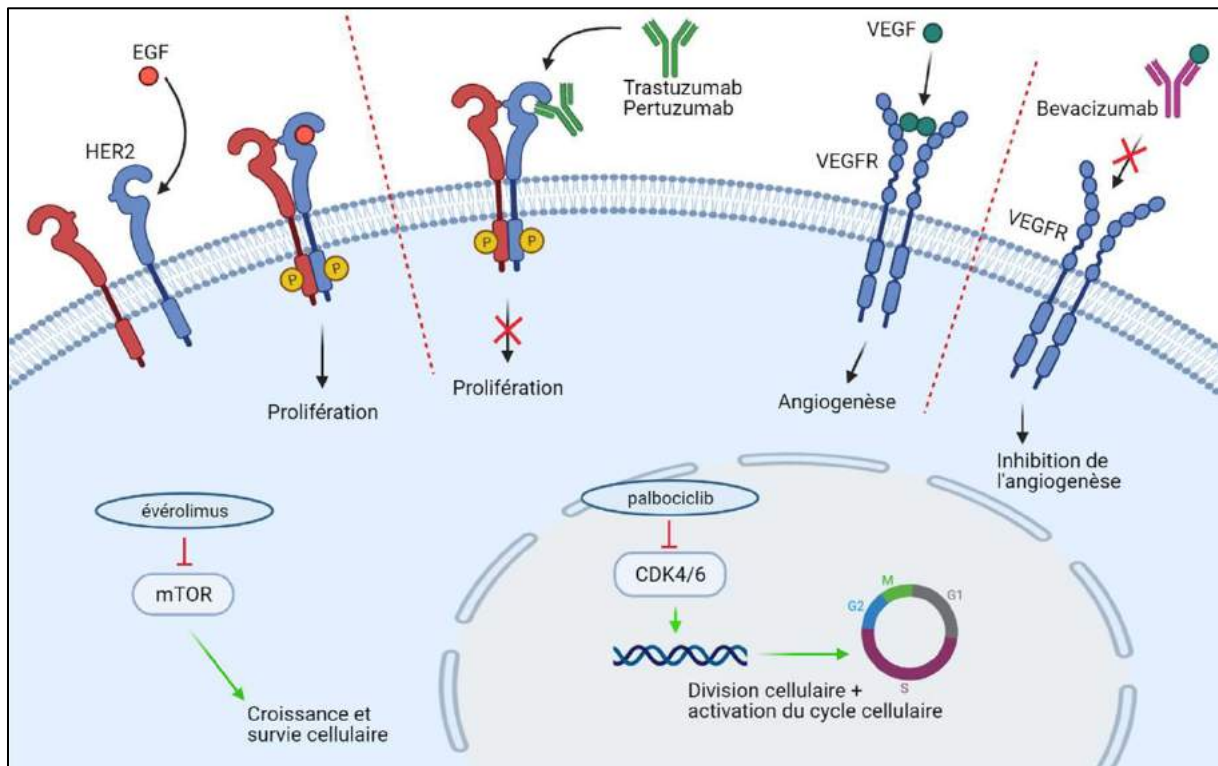


Figure 11 - Schéma simplifié des mécanismes d'action des différentes thérapies ciblées contre le cancer du sein.

EGF : Epidermal growth factor (Facteur de croissance épidermique).

(Source personnelle, image créée par Sejdi LUSHO)

1.1.7.5. Les traitements systémiques – la chimiothérapie

Le traitement le plus connu contre le cancer du sein est peut-être la chimiothérapie. Cependant, ce traitement est réservé aux patientes présentant un risque élevé de rechute de la maladie ou lorsqu'aucun autre traitement n'est possible. Bien que la chirurgie représente le choix thérapeutique principal, il s'avère que certains cancers du sein ne sont pas opérables d'emblée. C'est notamment le cas des cancers trop volumineux par rapport à la taille du sein, qui demandent une prise en charge chirurgicale radicale. Dans ce cas, l'intervention peut être réalisée après une chimiothérapie de première intention (néo-adjuvante), ayant pour but de réduire la taille de la tumeur et de rendre ainsi la tumeur opérable (55,84). La **chimiothérapie néo-adjuvante** (CTNA) est également indiquée dans la prise en charge des cancers du sein de phénotype agressif, tels que HER2+ ou triple négatif (**Figure 5**). Lorsqu'elle est

jugée nécessaire pour traiter le cancer du sein non métastatique, la chimiothérapie peut être administrée dans un cadre néo-adjuvant, adjuvant, ou les deux.

La CTNA permet non seulement de rendre la tumeur opérable, mais aussi d'étudier la réponse de la tumeur aux traitements cytotoxiques (85) et d'éliminer des éventuelles métastases non détectées auparavant par les examens d'imagerie (84). La mesure de la réponse tumorale à la CTNA est un critère important à prendre en compte dans la décision des thérapies adjuvantes.

La réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante

L'évaluation de la réponse à la CTNA est réalisée grâce à une analyse histologique de la pièce opératoire, obtenue à la chirurgie post-CTNA. Plusieurs systèmes d'évaluation de la réponse histologique à la CTNA existent ; ceux utilisés dans la pratique courante en France sont la classification TNM pathologique post-CTNA (ypTNM) (49,86), la classification selon Chevallier (87,88), la classification selon Sataloff (88,89), et plus récemment le *Residual Cancer Burden* (RCB) (90). Le **Tableau 8** décrit les différents systèmes d'évaluation de la réponse du cancer du sein à la CTNA (91).

Tableau 8 - Systèmes d'évaluation de la réponse pathologique du cancer du sein à la chimiothérapie néo-adjuvante

Système de classification	Critère	Réponse histologique
ypTNM	ypT0/Tis ypN0	Absence de carcinome invasif dans le sein et les ganglions lymphatiques, à l'exception du carcinome <i>in situ</i> . Réponse pathologique complète (pCR).
	ypT>0 et/ou ypN+	Présence de carcinome invasif dans le sein et/ou les ganglions lymphatiques (non-pCR).
Chevallier	Classe 1	Disparition de toute tumeur après analyse macro/microscopique.
	Classe 2	Présence de carcinome <i>in situ</i> dans le sein, absence de tumeur dans les ganglions lymphatiques.
	Classe 3	Présence de carcinome invasif.
	Classe 4	Peu ou pas de modification de la tumeur.
Sataloff - réponse au site principal	TA	Effet thérapeutique total ou presque total.
	TB	Effet thérapeutique supérieur à 50% mais pas d'effet

de la tumeur (T)		total ou presque total.
	TC	Effet thérapeutique inférieur à 50%.
	TD	Pas d'effet thérapeutique.
Sataloff - réponse au niveau des ganglions lymphatiques (N)	NA	Effet thérapeutique, pas d'envahissement des ganglions.
	NB	Pas d'envahissement des ganglions ou d'effet thérapeutique.
	NC	Effet thérapeutique évident mais toujours présence d'envahissement des ganglions.
	ND	Envahissement des ganglions, pas d'effet thérapeutique.
RCB	RCB-0	Absence de résidu tumoral (pCR).
	RCB-I	Résidu tumoral de petite taille.
	RCB-II	Résidu tumoral de taille intermédiaire.
	RCB-III	Résidu tumoral de grande taille.

Lorsque la CTNA entraîne une disparition complète de tout carcinome invasif dans le site principal de la tumeur (ypT0 ou ypTis) et au niveau des ganglions lymphatiques (ypN0), on parle de **réponse pathologique complète (pCR)**. Une méta-analyse sur 12 essais cliniques (11 955 patients) avait montré que le taux de pCR était plus élevé pour les sous-types agressifs de cancer du sein (HER2+ et triple négatif) (92). D'ailleurs, plusieurs études et méta-analyses ont montré que l'obtention de pCR après CTNA est corrélée à une meilleure survie sans événement (SSE) et une meilleure survie globale (SG) dans presque tous les sous-types moléculaires du cancer du sein, à l'exception de Luminal A et Luminal B exprimant HER2 (92,93). Cette différence en SSE et SG entre les patients pCR et non-pCR est particulièrement plus évidente pour les sous-types HER2+ (non luminal) et triple négatif (84,92-95). Ainsi, bien que plusieurs systèmes d'évaluation de la réponse à la CTNA existent, la pCR constitue actuellement le critère de jugement principal dans les essais cliniques évaluant les traitements néo-adjuvants, et est considérée comme le « gold standard » à atteindre en clinique.

L'utilisation clinique de ce critère classe les patients en deux groupes : pCR et non-pCR, et les traitements adjuvants sont décidés en conséquence. Or, toutes les patientes non-pCR n'ont pas le même pronostic. Symmans et al., qui ont mis au point le

système RCB, ont montré la même survie à 5 ans entre les patients RCB-0 (pCR) et RCB-I (petit résidu tumoral) tout cancers du sein confondus (90). Dans le cancer du sein triple négatif par exemple, Luen et al. ont montré que les classes RCB-I, RCB-II et RCB-III ont une survie sans rechute (SSR) à 3 ans de 86%, 67% et 26%, respectivement (96). De plus, une étude rétrospective sur 243 patientes atteintes d'un cancer du sein non métastatique, avait montré une SSR à 5 ans de 66% et 68% pour les patientes pCR et les patientes avec une réponse pathologique intermédiaire (définie comme ypT1-2, ypN0), respectivement (97). Depuis quelques années, les sociétés scientifiques (ASCO : *American Society of Clinical Oncology*, et ESMO : *European Society for Medical Oncology*) recommandent d'utiliser le RCB, avec la pCR, comme critères prédictifs de la survie pour le cancer du sein.

Le déroulement de la CTNA

La chimiothérapie standard utilisée dans le traitement de première intention du cancer du sein consiste en trois grandes familles de molécules : les **anthracyclines**, les **agents alkylants** et les **taxanes**. Elle est administrée par injection intraveineuse, de façon périodique, tous les 21 jours, appelés cycles de traitement. Deux protocoles de CTNA sont administrés de manière séquentielle selon une configuration 3+3 cycles ou 4+4 cycles : le premier protocole consiste en trois ou quatre cycles d'une combinaison d'anthracyclines et d'agents alkylants, alors que le second protocole consiste en trois ou quatre cycles de taxanes (**Figure 12**). En fonction de la molécule utilisée, la deuxième séquence de chimiothérapie peut éventuellement être administrée toutes les semaines, pendant 9 à 12 semaines.

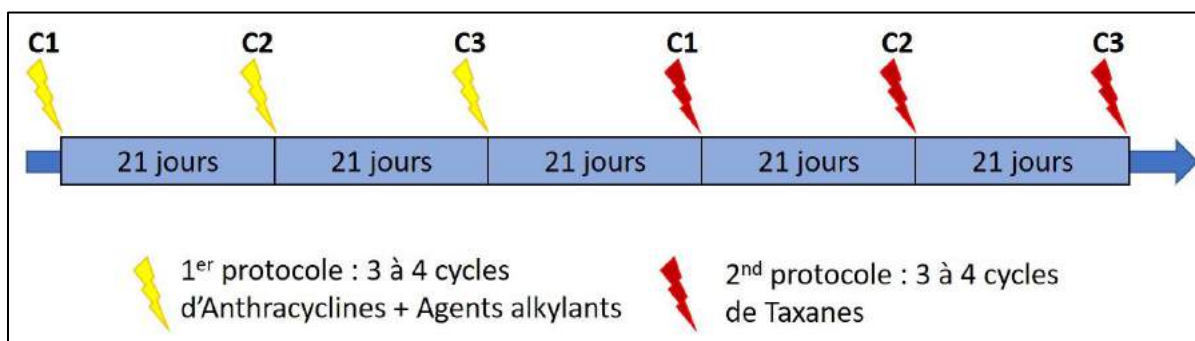


Figure 12 - Schéma thérapeutique de la chimiothérapie néo-adjuvante standard pour le traitement du cancer du sein non métastatique (Source personnelle, image créée par Sejdi LUSHO)

Les différentes molécules de CTNA

La chimiothérapie est un traitement cytotoxique visant à arrêter la croissance cellulaire tumorale par la destruction des cellules et/ou par l'arrêt de leur division. Les molécules de chimiothérapie agissent sur toutes les cellules de l'organisme, aussi bien sur les cellules tumorales que sur les cellules saines, d'où les effets secondaires importants. Différents types de chimiothérapie sont utilisés pour le traitement du cancer du sein.

Tout d'abord, **l'épirubicine** (FARMORUBICINE®) et la **doxorubicine** (ADRIAMYCIN®) sont les principales molécules appartenant à la famille des anthracyclines, utilisées dans le traitement standard du cancer du sein. Elles ont été découvertes de manière fortuite à partir des bactéries *Streptomyces peucetius* (98). Les anthracyclines sont des inhibiteurs de la topoisomérase II, l'enzyme responsable des cassures bicaténaïres de l'ADN, nécessaires pendant la division cellulaire et la réplication de l'ADN. Les anthracyclines agissent en s'intercalant entre les paires de bases de l'ADN et forment un complexe ternaire avec l'ADN et la topoisomérase II, bloquant l'activité de cette dernière, et entraînant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. En présence de certaines enzymes, les anthracyclines créent des radicaux libres d'oxygène et provoquent un stress oxydatif. Cela se traduit par un dysfonctionnement des mitochondries et des dommages de l'ADN, notamment dans les cellules myocardiques, ce qui explique les cardiotoxicités importantes, mais aussi leur effet anti-cancéreux (98,99).

Les anthracyclines sont administrées en combinaison avec le **cyclophosphamide** (ENDOXAN®), un agent alkylant qui est utilisé dans le traitement de plusieurs types de cancer. Il agit en ajoutant des groupes alkyles aux bases guanines de l'ADN, ce qui rend impossible la réplication de cette dernière et la division des cellules cancéreuses. Cette modification de l'ADN par les agents alkylants est permanente et entraîne éventuellement la mort cellulaire (100). Le cyclophosphamide peut être administrés avec l'épirubicine (EC) ou avec la doxorubicine (AC). Les principaux effets indésirables qui surviennent au cours de la première séquence de CTNA sont l'alopécie, l'insuffisance de la moelle osseuse, les nausées et les vomissements, les infections et l'immunosuppression (99,100).

Enfin, il a été montré que l'ajout des taxanes en deuxième séquence améliorerait l'efficacité de la chimiothérapie (67). C'est notamment le cas des travaux de Bear et al., qui ont démontré qu'un protocole de CTNA associant anthracyclines, cyclophosphamide et taxanes dans le traitement du cancer du sein permettait d'obtenir un taux plus élevé de pCR par rapport à la CTNA de type AC (101). Les taxanes utilisés dans le traitement de première intention du cancer du sein non métastatique sont le **docétaxel** (TAXOTERE®), administré tous les 21 jours et le **paclitaxel** (TAXOL®), administré tous les 7 jours. Ces molécules agissent en se fixant sur les microtubules, en stimulant leur prolifération et stabilisation. Or, l'assemblage et la dégradation des microtubules est essentielle à la division cellulaire. Les taxanes sont ainsi responsables de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'inhibition de la mitose (102,103). L'administration des taxanes est accompagnée de plusieurs effets indésirables, tels que l'alopécie, la neuropathie périphérique, la neutropénie, des phénomènes pseudo-allergiques et les douleurs musculaires et articulaires (102).

Lorsque les anthracyclines sont contre-indiquées, notamment chez les patients âgés ou atteints de pathologies cardiovasculaires, un protocole de type docétaxel - cyclophosphamide (TC) peut être envisagé. Toutefois, cette combinaison a été prouvée moins efficace qu'une CTNA basée sur les anthracyclines et les taxanes (67).

La chimiothérapie adjuvante

Ces mêmes traitements peuvent être administrés après la chirurgie première, selon les mêmes modalités que la CTNA ; on parle alors de **chimiothérapie adjuvante (CTA)**. Plusieurs études ont montré que le pronostic des patientes traitées par CTNA ne diffère pas de celui des patientes traitées par chirurgie première suivie d'une CTA (84).

Autres chimiothérapies

Récemment, plusieurs essais cliniques ont mis en évidence des bénéfices d'autres types de chimiothérapie, surtout dans la prise en charge du cancer du sein triple négatif. C'est ainsi que les essais BrighTNess et Alliance ont montré l'intérêt de l'association de la **carboplatine** à la CTNA standard, afin d'obtenir une augmentation du taux de pCR chez les patientes atteintes d'un CSTN (104,105). En ce qui concerne la survie à long-terme, l'essai GeparSixto avait montré une meilleure SSR chez les patientes atteintes de CSTN traitées par carboplatine + CTNA, mais pas d'amélioration significative de la SG (106). En

revanche, les données sur la survie à long-terme sont moins concluantes chez les patientes porteuses de mutations *BRCA1/2*, qui ne semblent pas tirer bénéfice de la carboplatine (107). Dans l'état actuel de nos connaissances sur cette molécule, la carboplatine n'est pas encore utilisée comme CTNA standard dans le traitement du CSTN (67).

D'un autre côté, les résultats de l'essai clinique CREATE-X montrent qu'en absence de pCR suite à une CTNA standard, les patientes atteintes d'un CSTN peuvent bénéficier d'un traitement adjuvant par **capécitabine** (XELODA®), qui améliorerait la SSR et la SG chez les patientes asiatiques. Même si ces résultats doivent être validés dans d'autres populations, le XELODA pourrait être proposé aux patientes traitées pour un CSTN qui n'obtiennent pas une pCR suite à la CTNA (108). Le **Tableau 9** reprend les différentes chimiothérapies utilisées pour traiter le cancer du sein non métastatique. Les mécanismes d'action sont schématisés dans la **Figure 13**.

Tableau 9 - Les différents types de chimiothérapie contre le cancer du sein non métastatique

Molécule	Mécanisme d'action	Indication	Principaux effets indésirables
doxorubicine épirubicine	Inhibition de l'activité de la topoisomérase II, intercalant de l'ADN	- CTNA ou CTA pour cancer du sein (CS) non-métastatique. - CS métastatique	Cardiotoxicités, infections, neutropénie, nausées, vomissements, alopecie, aménorrhée.
cyclophosphamide	Alkylation de l'ADN	- CTNA ou CTA pour CS non-métastatique. - CS métastatique	Infections, immunosuppression, aménorrhée, insuffisance ovarienne, alopecie, nausées, vomissements.
paclitaxel docétaxel	Fixation aux microtubules, inhibition de la mitose	- CTNA ou CTA pour CS non-métastatique. - CS métastatique	Alopecie, neuropathie, neutropénie, allergies, myalgies, arthralgies
carboplatine	Formation de ponts entre les brins de l'ADN, inhibition de la synthèse et de la réparation de l'ADN (109)	Traitement néo-adjuvant du CSTN	Neutropénie, thrombocytopenie (105)
capécitabine	Inhibition de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines (110)	Traitement adjuvant du CSTN non-pCR suite à la CTNA	Syndrome main-pied, neutropénie, thrombocytopenie, nausées, diarrhées (108)

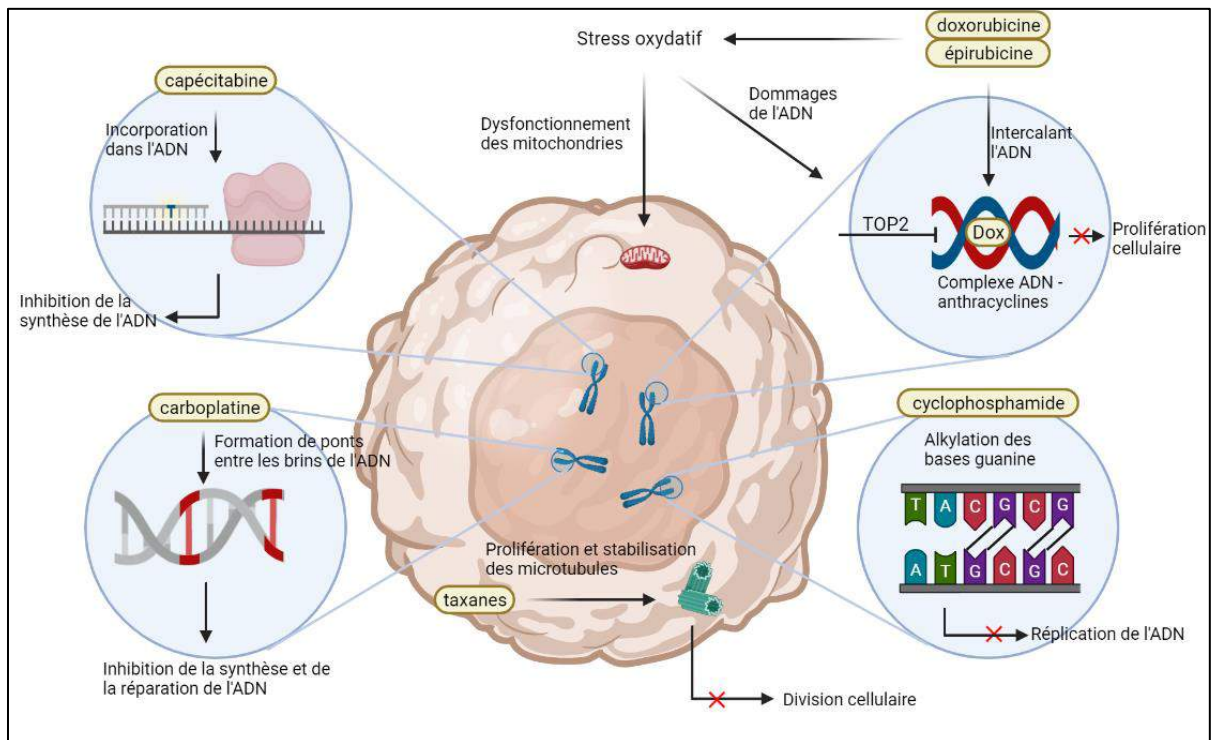


Figure 13 - Schéma simplifié des mécanismes d'action des différents types de chimiothérapies utilisés dans le traitement du cancer du sein non métastatique (TOP2 : topoisomérase 2 ; Dox : doxorubicine)
(Source personnelle, image créée par Sejdi LUSHO)

Focus sur la ménopause chimio-induite

Les traitements anti-cancéreux sont accompagnés de multiples effets secondaires à court et à long terme, dont l'apparition et la durée dépendent de plusieurs facteurs. En particulier, l'âge au moment du diagnostic du cancer du sein est un facteur de risque de l'apparition des symptômes de la ménopause. Plus de 20% des cancers du sein concernent les femmes de moins de 50 ans et l'incidence de cette maladie chez les patientes jeunes, en âge de procréer, est en augmentation. Ces patientes jeunes ont tendance à présenter un cancer du sein agressif, souvent de type moléculaire triple négatif, nécessitant une prise en charge par la chimiothérapie. Ce traitement cytotoxique entraîne une aménorrhée, pouvant aller jusqu'à une ménopause précoce définitive. On estime qu'environ 35% des femmes jeunes traitées par chimiothérapie de type AC et 45% des femmes traitées par AC + taxanes, sont en aménorrhée à 12 mois après la fin de ce traitement (111). Les patientes âgées de plus de 40 ans ont plus de risque de ne pas recouvrer leurs cycles menstruels après la chimiothérapie et de se retrouver en

ménopause chimio-induite (MCI) (112). Les symptômes qui accompagnent la MCI, tels que les bouffées de chaleur et les sueurs nocturnes, les troubles psycho-sociaux, la sécheresse vaginale et la diminution de la libido, l'ostéoporose, la prise de poids et l'infertilité, sont susceptibles d'altérer la qualité de vie des femmes jeunes (113–115). Il semble donc pertinent d'étudier les répercussions de la MCI sur les différents aspects de la qualité de vie des femmes, afin de leur proposer des traitements alternatifs et/ou des soins de support.

1.1.8. L'IMMUNITÉ ET LE CANCER

L'immunité a été décrite comme un facteur clef dans le développement du cancer et de sa progression métastatique. L'inflammation et l'inhibition du système immunitaire font partie des grandes caractéristiques du cancer (6), cependant, les mécanismes précis par lesquels les cellules tumorales échappent aux cellules immunitaires sont complexes et ne sont pas encore très bien compris.

D'après Castro et al. il existerait une sélection des cellules tumorales dès les phases précoces de la maladie cancéreuse. En effet, les cellules tumorales sont porteuses de mutations géniques qui sont traduites en protéines altérées. Ces dernières peuvent être présentées au système immunitaire et stimuler une réponse immunitaire antitumorale. Le système immunitaire est capable de reconnaître et tuer les cellules cancéreuses, néanmoins, certaines cellules tumorales présentent des mutations « invisibles », et sont capables d'échapper au système immunitaire. Il est intéressant de noter que les tumeurs présentant le plus de mutations invisibles pour le système immunitaire concernent des patients jeunes de sexe féminin (1). (**Figure 14**).

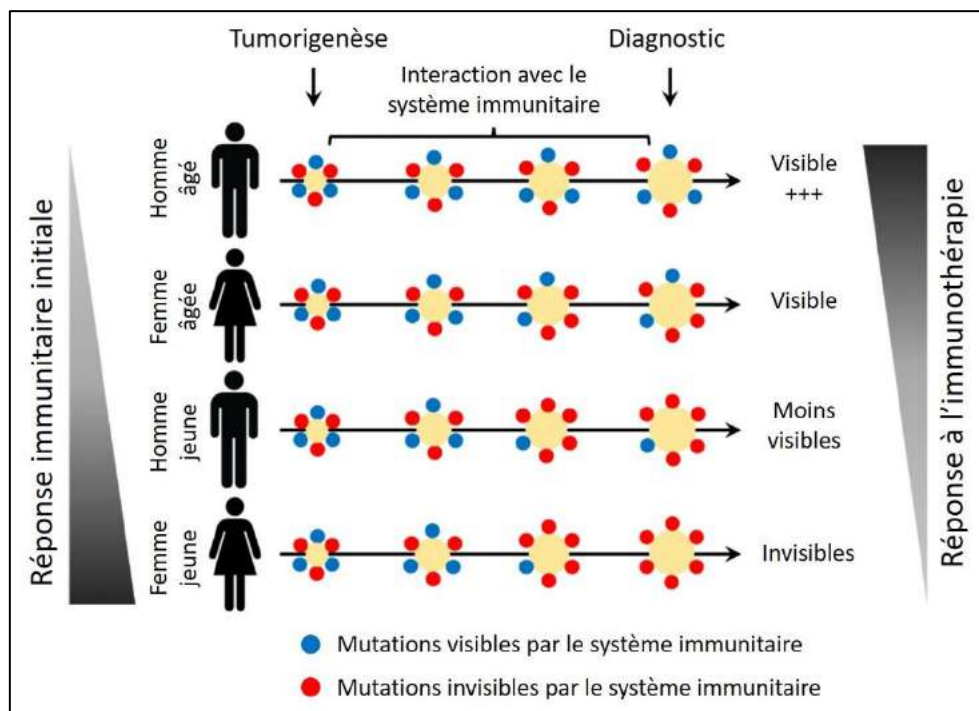


Figure 14 - Les femmes jeunes présentent plus de mutations invisibles pour le système immunitaire (adapté en français de Castro et al., 2020, *Nature*.)

Il existe une interaction constante entre la tumeur et le système immunitaire, qui a lieu aussi bien dans le site tumoral (microenvironnement tumoral : MET) qu'en

périphérie (circulation sanguine). En effet, la réponse immunitaire locale n'est possible que lorsqu'elle est « en communication » avec l'immunité générale et les cellules immunitaires périphériques. Ces dernières jouent un rôle important dans la réponse immunitaire antitumorale (116). Afin de mieux comprendre ces phénomènes, il est important d'étudier l'impact du cancer sur les différentes lignées de cellules immunitaires et le rôle de ces dernières dans la réponse antitumorale.

Les données pré-/cliniques montrent que le développement du cancer entraîne une dérégulation de la production et de la différenciation des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse, notamment en diminuant le taux de lymphocytes T et B, et en augmentant la quantité des monocytes et des neutrophiles immatures. Les travaux précliniques de Hiam-Galvez et al. sur 3 modèles murins de cancer du sein, ont montré une diminution du nombre des cellules dendritiques, et des lymphocytes T et B, produits par la rate et libérés dans la circulation sanguine, ainsi qu'une augmentation du nombre de neutrophiles, éosinophiles et monocytes circulants (116). Ces derniers migrent du sang vers le MET, où ils entraînent une immunosuppression qui donne lieu à la croissance tumorale (**Figure 15**).

De plus, les tumeurs engendrent une immunosuppression non seulement locale, mais aussi systémique, afin de pouvoir se propager à d'autres organes. En effet, la production d'IL-1 β par les cellules tumorales stimule l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ qui expriment l'IL-17. Cette dernière entraîne une accumulation des neutrophiles qui ont la capacité d'inhiber les lymphocytes T CD8+, connus pour leur effet anti-métastatique. Des études précliniques ont montré qu'en ciblant l'axe T $\gamma\delta$ – IL-17 – neutrophiles, on pourrait inhiber le développement de la maladie métastatique (117). D'ailleurs, une méta-analyse sur plus de 40000 patients a montré qu'un taux sanguin élevé de NLR (rapport neutrophiles/lymphocytes) était associé à mauvais pronostic dans plusieurs cancers, tels que le cancer du pancréas, du rein, colorectal, gastrique, du poumon et du foie (118).

L'accumulation des neutrophiles dans d'autres tissus, notamment dans les poumons, pourrait créer un microenvironnement propice à l'installation des cellules tumorales métastatiques (119). Il a été montré que la résection chirurgicale de la tumeur permet d'inverser certains de ces changements, indiquant ainsi que le cancer module les différentes lignées de cellules immunitaires (116). La dérégulation de

l'hématopoïèse n'est pas exclusive à un seul type de cancer. En effet, une étude *basket* a montré une augmentation du taux sanguin des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs des monocytes et des granulocytes dans le cancer du sein, de l'ovaire, du foie, des poumons et les cancers digestifs de l'homme (120).

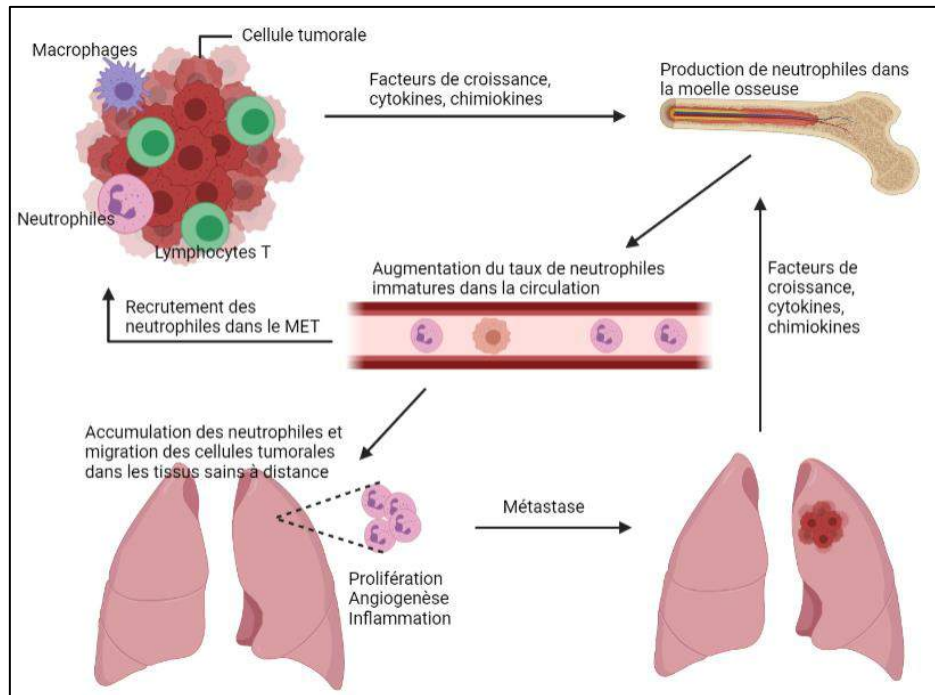


Figure 15 - Dérégulation par les cellules tumorales de la production des neutrophiles et leur implication dans le processus métastatique.

(MET : microenvironnement tumoral)

(Source personnelle, image créée par Sejdi LUSHO).

De plus, les macrophages sont une autre population cellulaire ayant un effet aussi bien anti- que pro-tumoral. Ce sont des cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée. Ils se trouvent dans les tissus et sont le résultat de la différenciation des monocytes (121). Les macrophages sont responsables de l'inflammation due au cancer, et il a été montré que leur présence est corrélée à un mauvais pronostic (122). En effet, pendant les premières étapes de la cancérogenèse, les macrophages sont impliqués dans la destruction des cellules tumorales « visibles » par le système immunitaire. Cependant, avec le développement tumoral et sous l'influence du MET, les macrophages acquièrent un effet pro-tumoral, par la stimulation de l'angiogenèse (production de VEGF et autres facteurs de croissance), de la dissémination métastatique et l'inhibition des cellules immunitaires antitumorales (production d'IL-10, inhibant les cellules T et les cellules dendritiques) (123). De plus, sous l'influence de certaines cytokines et chimiokines

inflammatoires, telles que CXCL2 et CSF1, sécrétées par le MET, les macrophages sont recrutés dans le site tumoral et produisent des IL-1 β , stimulant ainsi l'axe T $\gamma\delta$ – IL-17 – neutrophiles (124,125).

En outre, la diminution du nombre de cellules dendritiques circulantes a un impact important dans la progression tumorale, puisqu'elles sont responsables de la stimulation, différenciation et prolifération des lymphocytes T CD8+ et CD4+. Cette diminution a été observée dans plusieurs types de cancer : ovaire, prostate, sein, poumon, rein et peau (116). Il a été montré que dans le cancer du sein, les facteurs de croissance hématopoïétiques, tels que G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) produits par les tumeurs, ainsi que le VEGF, sont responsables de l'arrêt de la maturation des cellules dendritiques. Ces dernières sont rendues incapables de stimuler les lymphocytes T (116,123). De plus, la production et la libération d'IL-6 par la tumeur dans la circulation sanguine induit l'apoptose des cellules dendritiques (116).

Puis, les cellules *Natural Killers* (NK) sont responsables de l'apoptose des cellules tumorales (126). Leur activation empêche le développement des métastases dans le cancer du foie, du poumon et de la peau (116). De plus, leur présence dans le MET est associée à un meilleur pronostic dans le cancer colorectal (123). L'altération du phénotype des cellules NK a été observée chez les patientes atteintes de cancer du sein. Par conséquent, les NK perdent leur capacité d'être activés et de reconnaître et « tuer » les cellules tumorales. Ceci a été observé aussi dans le cancer gastro-intestinal et pulmonaire. Cette altération des fonctions des NK a été associée à une mauvaise survie dans le cancer du poumon (116). Cette population de cellules immunitaires reste encore très peu explorée, concernant son rôle dans la réponse antitumorale, surtout dans le cancer du sein.

Les lymphocytes, quant à eux, sont la population la plus étudiée. En ce qui concerne les lymphocytes T circulants, ils sont caractérisés par une diminution de la diversité des récepteurs chez les patients atteints de cancer du sein ou du poumon. Or, ces récepteurs sont essentiels dans la réponse immunitaire antitumorale. Hormis l'effet des cellules cancéreuses, l'âge et les infections chroniques pourraient impacter cette diversité des récepteurs et favoriser le développement des tumeurs. Dans la circulation sanguine des patientes atteintes d'un cancer du sein, il a été observé une augmentation

du nombre de lymphocytes T et B régulateur (Treg et Breg), responsables de la régulation et/ou suppression de l'activité des cellules immunitaires (116,123).

Dans les premières étapes de la cancérogenèse, les lymphocytes T périphériques peuvent migrer vers le MET et infiltrer la tumeur, si suffisamment d'antigènes immunogènes sont produits par les cellules cancéreuses. Une fois dans le MET, les lymphocytes T entreprennent une action immunitaire contre les cellules tumorales. Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) sont des biomarqueurs prédictifs largement étudiés et validés dans plusieurs cancers, y compris le cancer du sein (127).

Les cellules T CD8⁺ sont la population principale antitumorale de TILs. Ils se différencient en lymphocytes cytotoxiques et mènent une attaque efficace contre les cellules cancéreuses. D'un autre côté, les cellules T *helper* CD4⁺ produisent des cytokines inflammatoires (IL-2, TNF- α , IFN- γ) pour stimuler l'activation des lymphocytes cytotoxiques, des macrophages et des cellules NK (123).

Toutefois, les tumeurs sont capables de porter atteinte à la capacité des lymphocytes d'infiltrer la tumeur et de produire un effet cytotoxique antitumoral (128). En effet, les cellules tumorales résistantes à la réponse immunitaire initiale développent des mécanismes pour échapper au système immunitaire. Elles entraînent le recrutement des lymphocytes Treg qui exercent un effet immunosuppresseur sur les cellules immunitaires (**Figure 16**). D'ailleurs, dans le cancer du sein, l'infiltration de la tumeur par les cellules Treg est associée à un mauvais pronostic (129). CTLA-4, PD-1 et PD-L1 sont des molécules des points de contrôle immunitaire impliquées dans l'inhibition des lymphocytes T et dans la progression tumorale (130). Elles ont été la cible de différentes immunothérapies (inhibiteurs des points de contrôle, tels que anti-PD-1, anti-PD-L1 et anti-CTLA-4) qui ont été montrées efficaces dans certains types de cancer, notamment le cancer du poumon ou les mélanomes (1,116).

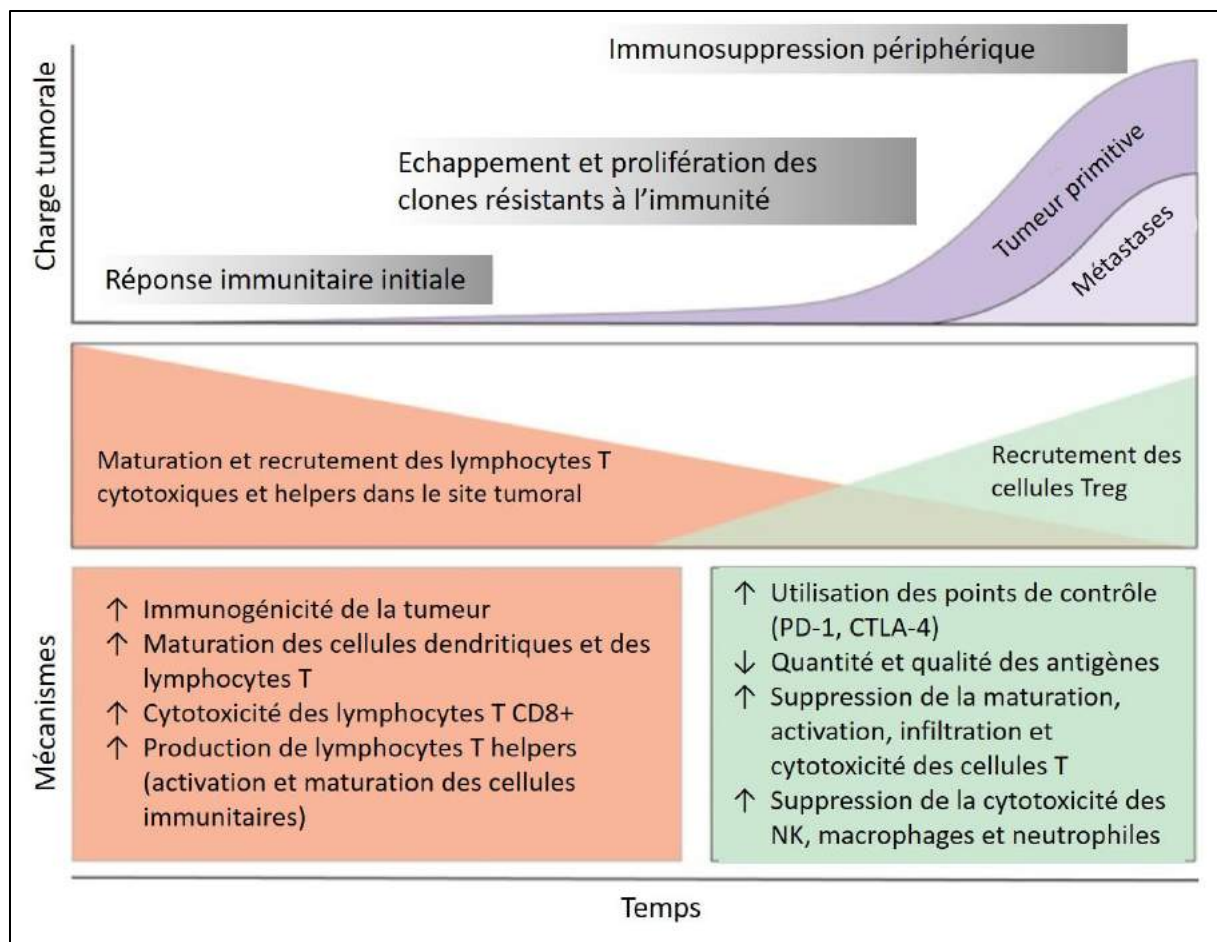


Figure 16 - Le rôle des lymphocytes dans le développement du cancer et des métastases (Adapté de Hiam-Galvez et al., 2021, *Nature Reviews Cancer*)

Les populations des cellules immunitaires circulantes ne sont pas altérées seulement par la tumeur, mais aussi par les traitements. Les différentes thérapies utilisées dans le traitement du cancer du sein, notamment les agents cytotoxiques, pourraient perturber le système immunitaire. Par exemple, il a été montré que la CTNA diminue, augmente ou ne change pas la quantité des lymphocytes T CD8+PD1+ circulants, chez les cancers HER2+, TN et RH+, respectivement (116,131). Dans le CSTN, par exemple, la CTNA entraîne le recrutement des lymphocytes T de la circulation sanguine vers le MET. D'un autre côté, la diminution des lymphocytes T CD8+ dans la circulation sanguine post-CTNA chez les patientes atteintes de CSTN, est un facteur prédictif de la survenue de la rechute métastatique (116). Il est donc important de comprendre l'impact du traitement anti-cancéreux, afin d'administrer les traitements susceptibles d'entraîner une réponse immunitaire antitumorale.

Enfin, bien qu'elles ne soient pas considérées comme des cellules, les plaquettes sont issues de l'hématopoïèse et jouent un rôle important dans l'inflammation. Elles sont impliquées dans le développement du cancer par la production et la libération des facteurs de croissance (132,133). Les facteurs de croissance sont aussi produits et libérés par les cellules cancéreuses, afin de stimuler de manière autocrine leur propre dissémination et progression (134,135). D'un autre côté, les cellules cancéreuses produisent des molécules inflammatoires, tels que IL-1, IL-3 et IL-6, induisant la différenciation des mégacaryocytes en plaquettes (136). De plus, l'augmentation du nombre de plaquettes entraîne une coagulation intravasculaire disséminée et favorise le développement des métastases dans plusieurs types de cancers, tels que digestifs, pulmonaires, et prostatiques (137).

La combinaison des valeurs de certains de ces paramètres permet d'obtenir l'index de l'immunité et de l'inflammation systémique (SII). Il prend en compte le taux sanguin des neutrophiles, plaquettes et lymphocytes (neutrophiles x plaquettes/lymphocytes), et reflète l'état de l'immunité et de l'inflammation systémique. Dans le cancer du sein, une méta-analyse récente a permis de montrer que l'augmentation du SII était associée à une mauvaise SSR et SG (138). C'est pourquoi, il est important d'étudier l'état général de l'immunité des patientes atteintes de cancer du sein et de développer des biomarqueurs immunitaires prédictifs de la réponse aux traitements. En approfondissant nos connaissances sur la relation entre le cancer et le système immunitaire, nous pouvons proposer les meilleurs traitements selon les besoins de chaque patiente.

L'immunothérapie

Les données nombreuses qui montrent la relation étroite entre le cancer et le système immunitaire ont poussé les chercheurs à développer un autre type de traitement contre le cancer, l'immunothérapie, qui est actuellement en plein essor. Elle vise à « réveiller » le système immunitaire pour reconnaître et combattre les cellules tumorales. L'immunothérapie a déjà montré son efficacité dans certains types de cancer (poumon et mélanome) et actuellement plusieurs essais cliniques sont en cours pour évaluer son efficacité dans le traitement du cancer du sein (123).

Les cellules tumorales ont parfois recours à des protéines spécifiques, appelées points de contrôle, qui sont fabriquées par les cellules du système immunitaire, pour éviter d'être attaquées par celles-ci. Les inhibiteurs du point de contrôle immunitaire (ICI) sont des médicaments qui bloquent ces protéines et permettent aux lymphocytes T d'attaquer et de détruire les cellules cancéreuses. Les ICI sont des anticorps monoclonaux qui trouvent un antigène spécifique à la surface des cellules cancéreuses et qui s'y fixent.

Cependant, les ICI sont efficaces pour seulement 10-40% des patients atteints de cancer, pour des raisons encore pas très bien connues. Plusieurs méta-analyses montrent que les femmes jeunes atteintes de cancer tendent à avoir un faible taux de réponse à l'immunothérapie, par rapport aux autres populations (femmes âgées, hommes jeunes et âgés) (1).

Dans le CSTN par exemple, les points de contrôle PD-1 et PD-L1 sont impliqués dans l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire. L'utilisation des inhibiteurs de PD-1 et PD-L1 entraîne la réactivation de la réponse immunitaire antitumorale. L'ajout du pembrolizumab, un ICI, à la CTNA de type anthracyclines-taxanes, a permis d'obtenir des taux très élevés de pCR, pouvant aller jusqu'à 90% dans certaines études (139).

En particulier, l'essai clinique KEYNOTE-522, évaluant l'ajout du pembrolizumab (200mg) vs placebo à la CTNA de type paclitaxel + carboplatine, a mis en évidence un taux significativement plus élevé de pCR chez les patientes atteintes de CSTN primitif recevant du pembrolizumab (taux de pCR : 64.8% vs 51.2%, respectivement). De plus, une tendance vers une meilleure SSE à 18 mois a été observée dans le groupe pembrolizumab, sans pour autant être statistiquement significative (140).

Actuellement, l'immunothérapie n'est pas utilisée dans la pratique courante pour le traitement du cancer du sein. De nombreux essais cliniques sont en cours pour évaluer des nouveaux médicaments qui pourraient jouer un rôle important dans la prise en charge des cancers du sein de tous les stades.

1.2. LE CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF

Le cancer du sein triple négatif (CSTN) est un sous-type agressif du cancer du sein qui présente un taux élevé de rechutes métastatiques précoces, souvent fatales. Doté d'une grande hétérogénéité morphologique, clinique et génétique, il représente un vrai défi en oncologie. C'est pourquoi, il est important d'élargir nos connaissances sur le développement du CSTN, ses différents profils de rechutes, la réponse aux traitements et les différents biomarqueurs prédictifs et pronostiques.

1.2.1. LES CARACTERISTIQUES DU CSTN

1.2.1.1. Les caractéristiques histologiques et moléculaires

Le CSTN est caractérisé par l'absence d'expression des récepteurs aux hormones œstrogène (RO- : <1% de cellules tumorales marquées en IHC) et progestérone (RP- : <1% de cellules tumorales marquées en IHC), ainsi que par l'absence de surexpression du gène *ERBB2*, responsable de la synthèse de la protéine HER2 (HER2- : score 0 ou 1+ en IHC, ou absence d'amplification du gène *ERBB2* par FISH) (141). En outre, les CSTN ont tendance à être de grade histologique élevé (grade SBR 2 et 3), d'une taille plus importante et présenter des caractéristiques du phénotype basal-like, tels qu'une activité mitotique importante, un index Ki67 élevé, un pléomorphisme cellulaire ou encore une infiltration lymphocytaire du stroma. Tout comme les autres sous-types de cancer du sein, les CSTN sont en majorité des adénocarcinomes invasifs non spécifiques. On retrouve par ailleurs d'autres types histologiques, notamment des carcinomes médullaires ou métoplasiques (142).

Les principales mutations génétiques des CSTN concernent les gènes *TP53* et *PIK3CA* (143). Environ 10% des patientes atteintes d'un CSTN sont porteuses de mutation dans le gène *BRCA1*, alors que plus de 75% des cancers *BRCA1* muté sont de phénotype triple négatif (144). La recherche des anomalies génétiques impliquées dans le développement et la rechute du CSTN est essentielle pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les études du transcriptome du CSTN attestent de la grande hétérogénéité de cette maladie. Lehmann et al. ont mis en évidence six sous-types de tumeurs triple négatives : basal-like 1 (BL1), basal-like 2 (BL2), immunomodulateur (IM), mésenchymateux (M), mésenchymateux stem-like (MSL) et luminal avec récepteurs aux

androgènes (LAR). Cette classification pourrait avoir des implications thérapeutiques et cliniques importantes, puisque les études pré-cliniques ont déjà montré différents taux de pCR selon le sous-type TN, les BL1 étant les plus sensibles à la CTNA standard (jusqu'à 50% de pCR), tandis que les BL2 et LAR rarement atteignent une réponse pathologique complète (143).

De même, les travaux de Curtis et al. sur la classification basée sur les CNAs, avaient mis en évidence jusqu'à 10 sous-types de cancer du sein, parmi lesquels ils ont observé deux sous-groupe de CSTN, avec des caractéristiques et pronostics différents, apportant ainsi des preuves supplémentaires quant à l'hétérogénéité du CSTN.

1.2.1.2. L'épidémiologie

Le CSTN représente 10-20% de tous les cancers du sein et touche principalement les femmes jeunes de moins de 40 ans (139). Il est plus fréquent chez les femmes d'origine africaine ou afro-américaine (145,146). Les travaux de plusieurs équipes mettent en évidence une relation entre le surpoids et l'obésité chez les femmes préménopausées et la survenue d'un CSTN (145). Contrairement aux autres types de cancer du sein pour lesquels la multiparité est un facteur protecteur, certaines études ont établi un lien entre la multiparité et le risque du CSTN, tandis que l'allaitement reste un facteur protecteur contre cette maladie (144,147). Les antécédents familiaux de cancer du sein seraient un autre facteur de risque de survenue d'un CSTN (146,148).

1.2.1.3. La réponse aux traitements

Malgré son agressivité et pronostic sombre, le CSTN est, en général, très sensible aux traitements cytotoxiques endommageant l'ADN, notamment à la CTNA (149). Le taux de pCR suite à la CTNA comportant anthracyclines + taxanes se trouve entre 35% et 50% pour les patientes atteintes de CSTN, significativement plus élevé que les autres types moléculaires de cancer du sein. De plus, les patientes atteintes de CSTN qui sont en pCR après la CTNA ont moins de risque de développer des rechutes métastatiques et ont un meilleur pronostic, par rapport aux patientes qui présentent un résidu tumoral post-CTNA (93,143). En outre, des essais cliniques récents montrent que les sels de platine, notamment la carboplatine, administrés en combinaison avec la CTNA standard, augmentent le taux de pCR dans ce groupe de cancer du sein (104-106).

1.2.1.4. Le pronostic du CSTN

En raison des caractéristiques moléculaires qui limitent les stratégies thérapeutiques, et en dépit du développement rapide de nouvelles thérapies, le CSTN reste une maladie agressive avec un pronostic sombre. En effet, les rechutes métastatiques sont fréquentes après les traitements initiaux. Elles concernent environ 35% de toutes les patientes avec un CSTN, un taux significativement plus élevé que les autres sous-type de cancer du sein (150,151). Les rechutes métastatiques surviennent majoritairement dans les trois ans après les traitements initiaux, avec un pic d'incidence à un an après la fin des traitements, et très rarement au-delà de cinq ans après la fin des traitements (**Figure 17**). En ce qui concerne la survie, les résultats obtenus par Liedtke et al. montraient une SSR à 3 ans de 63% pour les CSTN, significativement différente du taux de 76% pour les autres types de cancers du sein traitées par CTNA, tandis que les taux de SG étaient de 74% versus 89% pour CSTN et non-CSTN, respectivement (141).

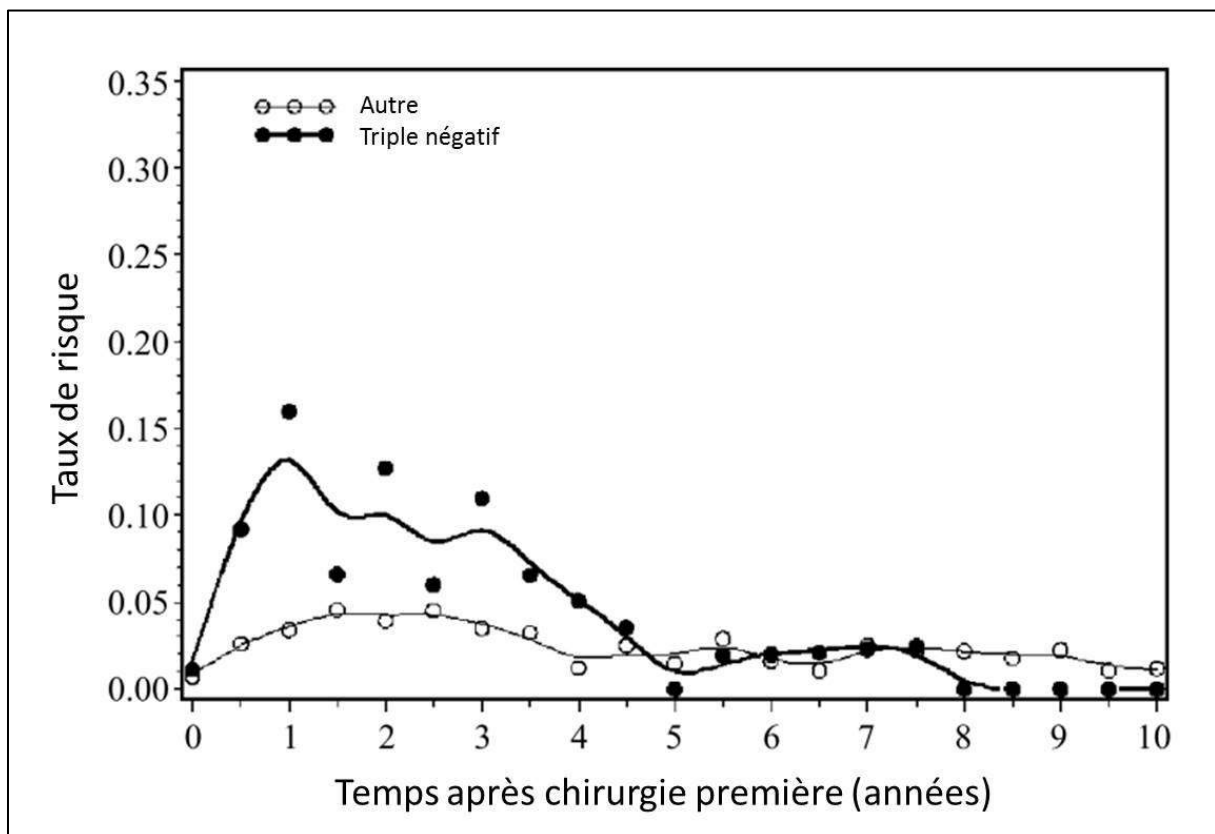


Figure 17 - Taux de risque de la rechute métastatique du cancer du sein triple négatif (Source: Dent et al. 2007, *Clin Cancer Res.*)

Une fois que la maladie évolue au stade métastatique, le pronostic est toujours fatal, la SG médiane des patientes métastatiques étant inférieure à 15 mois (151–153).

Les premiers sites atteints par les métastases du CSTN sont le système nerveux central (SNC) et les poumons (153,154), les métastases osseuses et hépatiques étant moins fréquentes (**Figure 18**). A partir de 5 ans après le diagnostic, les os sont le site principal de métastases du CSTN (150,154).

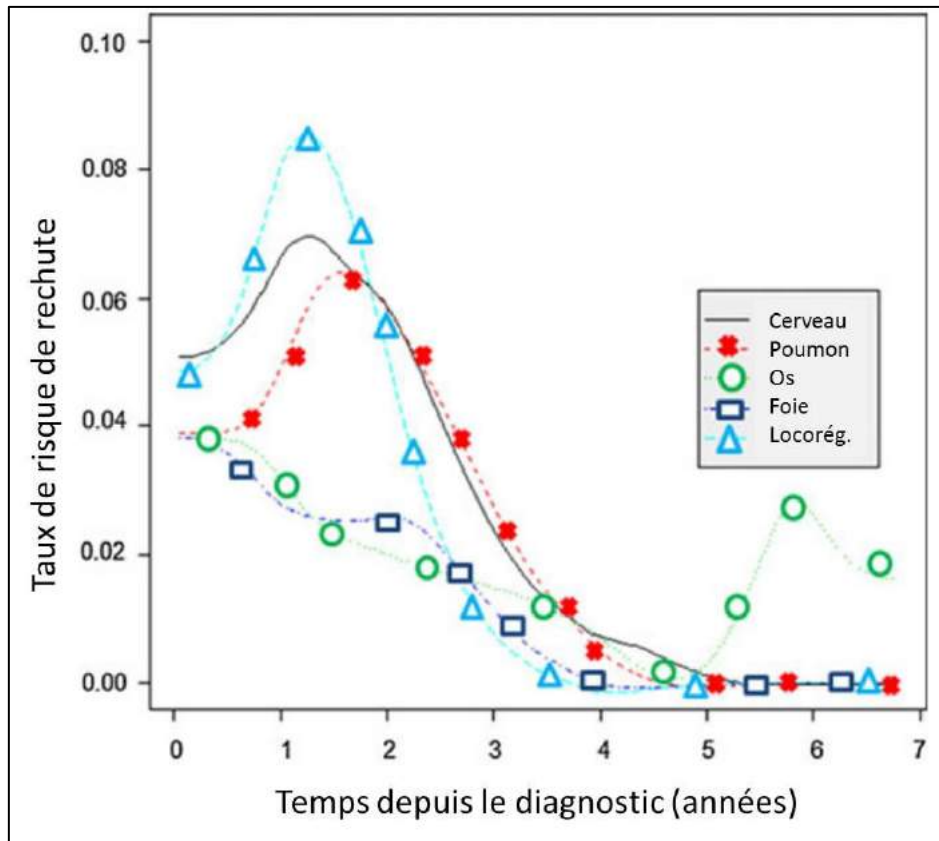


Figure 18 - Taux de risque de rechute métastatique du CSTN selon le site de rechute (Source : Pogoda et al., 2013, *Medical Oncology*)

D'après les travaux de Dawood et al., la SG des patientes atteintes de métastases cérébrales est inférieure à 3 mois et inférieure à 6 mois si le SNC est le premier site métastatique (152). Pogoda et al. ont rapporté une survie médiane de 3.5 et 9.8 mois pour les patients atteints de métastases hépatiques et pulmonaires, respectivement (150).

Néanmoins, toutes les patientes atteintes d'un CSTN ne développeront pas de métastases. Il est donc important de mettre en évidence des biomarqueurs fiables permettant de déterminer le niveau de risque, et si possible, le profil de la rechute métastatique de ces patientes, afin de mieux adapter les traitements pour prévenir la survenue d'une rechute à distance et/ou améliorer la survie.

1.2.2. FACTEURS PREDICTIFS ET PRONOSTIQUES

1.2.2.1. Les paramètres clinico-pathologiques

Actuellement, les principaux paramètres utilisés dans l'estimation du risque métastatique et de la survie des patientes atteintes d'un CSTN sont de nature clinico-pathologique, tels que la taille de la tumeur et le nombre de ganglions lymphatiques envahis par les cellules tumorales (155).

En effet, les tumeurs triple négatives de taille T1a/bN0 ont tendance à avoir une meilleure survie par rapport aux tumeurs TN plus volumineuses (156) et une survie similaire aux autres sous-types moléculaires de la même taille (157,158). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux connaître le CSTN de petite taille et les biomarqueurs qui permettent d'évaluer son risque métastatique et la survie.

D'un autre côté, la présence de cellules cancéreuses dans les ganglions lymphatiques est associée à une survie médiocre (159,160). Ceci est d'autant plus vrai lorsque l'envahissement ganglionnaire persiste après la CTNA (161). La présence de ganglions lymphatiques atteints par la maladie serait un indicateur du caractère invasif et du potentiel métastatique de la tumeur.

L'obtention de la pCR après la CTNA a été corrélée avec une meilleure survie chez les patientes atteintes d'un CSTN (92,95). Toutefois, toutes les patientes pCR ne sont pas protégées contre la maladie métastatique, de même façon que toutes les patientes avec un résidu tumoral post-CTNA ne rechutent pas. Le RCB serait un meilleur facteur pronostique, surtout en combinaison avec d'autres biomarqueurs provenant du microenvironnement immun tumoral, notamment le taux d'infiltration lymphocytaire tumorale (162-164).

En effet, nous avons besoin de mieux comprendre la relation entre la tumeur et l'immunité, non seulement locale, mais aussi systémique. Cette dernière décennie, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle prédictif et pronostique de plusieurs paramètres qui reflètent la réponse immunitaire dans le site tumoral et/ou la circulation sanguine, dans plusieurs types de cancer. Malgré le nombre croissant des recherches sur ces biomarqueurs, peu d'études ont été menées dans le CSTN, où le besoin d'établir des paramètres prédictifs et pronostiques se ressent fortement. Dans le cadre de mon projet

doctoral, je me suis particulièrement intéressé aux cellules immunitaires circulantes, aux plaquettes et aux lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs).

1.2.2.2. Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs)

Les TILs correspondent à toutes les populations de lymphocytes qui infiltrent le tissu tumoral, afin de reconnaître et tuer les cellules cancéreuses. En temps normal, très peu de lymphocytes se trouvent dans le tissu mammaire sain (165). Leur présence suggère qu'il existe un effet immunogène du cancer du sein. En effet, des recherches menées sur différents types de cancer ont montré que les mutations et l'instabilité génétique des tumeurs donnaient lieu à la production d'antigènes reconnaissables par le système immunitaire, ce qui entraînait un recrutement des lymphocytes vers le site tumoral. Dans le cancer du sein, les sous-types TN et HER2+ présentent plus de mutations que les tumeurs luminales, ce qui pourrait expliquer le taux supérieur de TILs chez ces sous-types par rapport aux tumeurs luminales. Dans le MET mammaire il s'agit souvent de lymphocytes T CD4+ et/ou CD8+ (139). D'autres populations, tels que les lymphocytes B- et NK se trouvent en quantité plus faible (166).

Les lymphocytes T CD8+ jouent un rôle majeur dans la mort des cellules cancéreuses par la libération des IFN- γ , tandis que leur activation et maturation sont médiées par les cellules CD4+ et les antigènes produits par les cellules dendritiques (165).

Ces cinq dernières années, de nombreuses études aussi bien rétrospectives que prospectives ont bien démontré que la présence de TILs en grande quantité est associée à une meilleure réponse aux traitements cytotoxiques et une meilleure survie, dans plusieurs types de cancer, y compris le CSTN (127).

Dans le cadre néoadjuvant, les TILs sont considérés comme un biomarqueur fiable de la pCR. En 2010, Denkert et al. ont présenté les résultats de deux cohortes (GeparDuo et GeparTrio) sur plus de 1000 patientes atteintes de cancer du sein traitées par CTNA de type anthracyclines-taxanes, montrant clairement une relation entre la présence de TILs et le taux de pCR (167). De plus, la CTNA avec son effet cytotoxique, favorise l'attraction des lymphocytes vers le site tumoral, par la destruction des cellules cancéreuses, dont le contenu est reconnu par les cellules immunitaires (168).

Dans le cadre adjuvant, plusieurs essais cliniques ont établi un lien entre la présence de TILs en grande quantité sur le résidu tumoral post-CTNA et un meilleur pronostic pour le CSTN (169,170). Dieci et al. montrent une réduction relative du risque de métastase de 21% pour chaque incrément de 10% de TILs sur la pièce opératoire post-CTNA dans le CSTN (169). D'autres études ont montré des résultats similaires (171–173). Une synthèse des principales études évaluant le rôle prédictif et pronostique des TILs sur le CSTN est montrée dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 - Synthèse de plusieurs études évaluant TILs en tant que biomarqueur prédictif et pronostique dans le CSTN

Etude (auteur, année)	Type de traitement	Caractéristiques de l'étude	Résultats de l'étude
Adams, 2014 (174)	Chirurgie première	481 échantillons, prospectif, TILs comme variable continue	18% et 19% de réduction du risque de rechute et de décès, respectivement, pour chaque incrément de 10% de TILs
Asano, 2018 (175)	CTNA (anthracyclines – taxanes)	61 patients, TILs évalués au diagnostic TILs élevé > 10% TILs bas ≤ 10%	Taux de pCR élevé dans le groupe TILs élevés, $p=0,013$ SSR et SG plus longue dans le groupe TILs élevés, $p=0,001$
Pruneri, 2016 (173)	Chirurgie première ± Docétaxel + Methotrexate	647 patients, TILs comme variable continue	11% ($p=0,005$) et 17% ($p<0,001$) de réduction du risque de rechute et de décès, respectivement, pour chaque incrément de 10% de TILs
Luen, 2019 (96)	CTNA (anthracyclines – taxanes)	375 patients avec résidu tumoral post-CTNA, TILs évalués sur la pièce opératoire TILs élevé > 20%	TILs élevés corrélés à une meilleure SSR et SG ($p<0,001$) TILs élevés corrélés à une meilleure SSR et SG dans le groupe RCB II
Loi, 2014 (172)	Chirurgie première	145 patients avec CSTN primitif TILs comme variable continue	13% de réduction du risque de métastase à distance pour chaque incrément de 10% de TILs ($p=0,02$)
Krishnamurti, 2017 (176)	Chirurgie première	157 pièces opératoires, TILs évalués comme intervalles : <5%, 5-10%, 11-50%, >50%	Corrélation positive entre le taux de TILs et la SG ($p=0,0354$) et la SSR ($p=0,0314$)
Dieci, 2014 (169)	CTNA	278 patients avec résidu tumoral post-CTNA, TILs évalués sur la pièce opératoire, TILs comme variable continue et binaire TILs élevés > 60%	21% de réduction du risque de métastase et de décès pour chaque incrément de 10% de TILs ($p<0,001$) SSM à 5 ans 81,5% et 46% pour TILs élevés et bas, respectivement ($p=0,0019$) SG à 5 ans 91% et 55% pour TILs

			élevés et bas, respectivement ($p=0,0017$)
Denkert, 2018 (177)	CTNA	906 patients, TILs comme variable continue et catégorielle 0-10%, 11-59% et 60-100%	50% de pCR pour TILs élevés (60- 100%) contre 31% de pCR pour les deux autres groupes ($p<0,0001$) TILs corrélé à une meilleure SSR
Ruan, 2018 (178)	CTNA	166 biopsies de diagnostic, TILs exprimés par incréments de 10%	Corrélation positive entre le taux de TILs et le taux de pCR ($p=0,0001$)

Malgré la validation de ce biomarqueur par plusieurs laboratoires et études, l'évaluation des TILs ne fait pas encore partie de la pratique clinique de routine de la prise en charge du cancer du sein, en raison de la nécessité d'un pathologiste spécialisé et de la présence d'un risque d'erreur inhérent. Afin d'éviter ces erreurs, un groupe de travail composé d'experts sur l'évaluations des TILs (*Immuno-Oncology International TILs Working Group*) a développé des recommandations pour harmoniser les méthodes d'évaluation des TILs sur les tissus mammaires (179,180).

Dans le cadre de mon projet doctoral, je me suis intéressé particulièrement aux biomarqueurs circulants, notamment aux cellules sanguines (neutrophiles, lymphocytes), aux plaquettes et aux rapports entre eux, afin de déterminer si ces paramètres pourraient apporter des informations supplémentaires aux celles des TILs, voire les remplacer dans la prédiction de la réponse à la CTNA du CSTN et de la survie sans rechute métastatique.

1.2.2.3. Les facteurs circulants

La recherche de biomarqueurs immunitaires dans le CSTN doit s'étendre au-delà du MET. En effet, les cellules immunitaires périphériques jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire contre le cancer, soit en la renforçant, soit en engendrant une immunosuppression (116). De plus, une recherche menée par Wu et al. portant sur le séquençage d'ARN des différentes populations de lymphocytes infiltrants et circulants, dans plusieurs types de cancers, a mis en évidence l'expansion clonale des lymphocytes périphériques, entraînant une infiltration de la tumeur par ces populations de lymphocytes. Cette étude montrait que les lymphocytes infiltrants la tumeur étaient remplacés continuellement par des lymphocytes venant de la circulation périphérique et des tissus sains. De plus, l'expansion clonale des lymphocytes périphériques variaient

d'un patient à l'autre, ce qui pourrait expliquer la variabilité d'infiltration tumorale et de la réponse clinique qui en résulte. L'identification des clones de lymphocytes dans la circulation sanguine par une « biopsie liquide » pourrait apporter plus d'informations sur les populations de TILs (181).

Les cellules circulantes (neutrophiles, lymphocytes, monocytes) et les plaquettes sont des biomarqueurs émergents, étudiés dans la prédiction de la réponse aux traitements et de la survie dans plusieurs types de cancer.

Par exemple, les travaux de Soyano et al. sur 157 patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules et traités par des inhibiteurs de la protéine PD-1 (*Programmed Death Protein 1*) tels que le nivolumab ou le pembrolizumab, ont mis en évidence une corrélation significative entre plusieurs paramètres sanguins et la SSR et la SG à 12 mois. En effet, un NLR (*neutrophil-to-lymphocyte ratio*) < 5.9 et un taux de monocytes $\geq 0.63 \times 10^9$ cellules/L étaient associés à une plus longue SG et SSR, tandis que le MLR (*monocyte-to-lymphocyte ratio*) et le taux de neutrophiles inférieurs à 11.3 et 7.5×10^9 cellules/L respectivement, étaient associés à une meilleure SG (166).

En outre, une méta-analyse récente sur différents cancers urologiques, montre que le NLR élevé est prédictif d'une mauvaise SSR et SG dans le cancer de la prostate, du rein et de la vessie (182). De nombreuses recherches mettent en évidence des résultats similaires sur le cancer du pancréas (183), de l'endomètre (184), du foie (185) et ORL (186).

Les paramètres de la formule sanguine ont également été étudiés dans le cancer du sein. Une étude française menée sur 280 patientes traitées par CTNA de type anthracyclines-taxanes pour un cancer du sein, a montré qu'un taux faible de neutrophiles ($< 1.5 \times 10^9$ cellules/L) et un PLR (*platelet-to-lymphocyte ratio*) élevé (≥ 150) avant les traitements étaient tous les deux corrélés à un risque élevé de rechute ($p < 0.001$ et $p = 0.012$ respectivement en analyse multivariée) (187).

De plus, Van Berckelaer et al. ont établi une corrélation entre les paramètres sanguins avant la mise en route des traitements et le pronostic, chez 127 patientes atteintes d'un cancer du sein inflammatoire. En effet, un NLR > 4 serait associé à une mauvaise SG ($p = 0,01$), avec une survie médiane de 5,54 ans pour le groupe NLR bas vs

2,17 ans pour les patientes avec NLR élevé. De plus, un PLR ≤ 210 serait corrélé à une meilleure SSR ($p=0,018$) (188).

Des recherches ont également été réalisées sur le CSTN. Azab et al. ont étudié les paramètres sanguins avant la CTNA sur 125 femmes atteintes d'un CSTN de stade 1-3. Ils ont montré une mauvaise SG et SSR pour les patientes dans le groupe NLR élevé ($NLR \geq 2$; $p < 0,0001$) (189). De nombreuses autres équipes ont présenté des résultats qui vont dans le même sens (190–195).

La plupart des données dans la littérature suggère un rôle prédictif du NLR. Or, le rapport plaquettes/lymphocytes (PLR) est un autre paramètre qui a été étudié dans le cancer du sein et qui serait un marqueur intéressant de la réponse aux traitements et de la survie. Cependant, les recherches sur le PLR dans le CSTN ont été réalisées sur un nombre limité de patients, souvent ne permettant pas de conclure à une corrélation avec le pronostic dans ce type de cancer. D'après les travaux d'Asano et al. un PLR < 150 serait corrélé à un taux supérieur de pCR ($p=0,019$) chez 177 patientes atteintes d'un cancer du sein, traitées par CTNA, parmi lesquelles 61 présentaient un CSTN (196). Le même seuil a été utilisé par Cuello-Lopez et al. qui ont montré une relation avec le taux de pCR chez 272 patientes avec un cancer du sein, mais aucune relation n'a été observé chez les 62 patientes CSTN de la cohorte (132). Des résultats similaires ont été obtenus par différents équipes, montrant la corrélation entre le PLR élevé et la survie plus courte chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (187,197–199).

Des recherches ont également été menées sur l'Index de l'immunité et de l'inflammation systémique (SII). Ce paramètre qui reflète l'équilibre des cellules immunitaires dans la circulation sanguine, a été étudié dans plusieurs types de cancers. Il est calculé en multipliant le nombre absolu de neutrophiles et de plaquettes, divisés par le nombre absolue de lymphocytes ($SII = \text{neutrophiles} \times \text{plaquettes} / \text{lymphocytes}$). L'étude menée par Chen et al. sur 262 patientes traitées par CTNA de type anthracyclines-taxanes pour un cancer du sein, dont 67 présentaient un CSTN, a montré qu'un SII inférieur à $0,85 \times 10^9$ cellules/L était associé à une meilleure SSR et à une SG plus longue (200).

Contrairement aux TILs, ces biomarqueurs circulants sont faciles à obtenir et à évaluer en routine. Ils pourraient représenter une alternative plus rapide et moins chère

que les biomarqueurs tissulaires. Toutefois, les seuils de NLR, PLR etc. utilisés dans la littérature pour définir les populations de bon pronostic ou non, sont différents d'une étude à l'autre. De plus, davantage d'études doivent être réalisées dans le CSTN. Une synthèse des caractéristiques des principales recherches ayant montré un rôle prédictif des cellules immunitaires circulantes dans le cancer du sein, est présenté dans **Annexe 4**.

1.2.2.4. Autres biomarqueurs circulants

Il est important d'identifier des biomarqueurs de tumeur résiduelle microscopique après les traitements locaux et systémiques du cancer du sein, et notamment du CSTN. La présence de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) dans le plasma après les traitements pourrait indiquer que des cellules tumorales continuent à être présentes dans l'organisme. Ces cellules tumorales pourraient avoir un potentiel métastatique à distance et/ou de rechute dans le sein traité.

La recherche de l'ADNtc est basée sur le principe que l'ADN tumoral contient des mutations somatiques, présentes uniquement dans l'ADN des cellules tumorales et non dans l'ADN des cellules saines d'un organisme. Les mutations présentes dans certains gènes de l'ADN tumoral sont identifiées à partir du tissu tumoral prélevé lors de la biopsie ou de la chirurgie, fixé au formol et inclus en paraffine. La détection de ces mutations se fait par séquençage (201). Ensuite, l'ADN circulant est extrait du plasma et la technique de PCR (*polymerase chain reaction*) permet d'amplifier la région de l'ADN mutée, correspondant à l'ADN tumoral identifié sur le tissu, afin de le quantifier. Les techniques de PCR et de séquençage dont on dispose aujourd'hui permettent de détecter l'ADNtc à des très faibles concentrations et de l'amplifier, afin de rechercher une mutation donnée (202).

L'ADN circulant est libéré par toutes les cellules, tumorales ou non. Il a été montré cependant, que le taux d'ADN circulant est significativement plus important chez les patients atteints d'un cancer que chez les individus sains (203). Ce taux est encore plus important chez les patients présentant des métastases (204,205).

L'ADNtc a été utilisé dans plusieurs études pour surveiller l'évolution de plusieurs cancers solides, mais peu d'études ont été menées sur le cancer du sein. Dawson et al. avaient montré que l'ADNtc présente une meilleure sensibilité que les

autres biomarqueurs circulants, dans la détection de la maladie métastatique du cancer du sein (206). L'analyse intermédiaire de l'essai EBLIS, mené par Coombes et al. sur 49 patientes atteintes d'un cancer du sein non métastatique, a montré un taux de détection de l'ADNtc de 89% chez les patientes ayant rechuté, et de 100% chez les patientes atteintes d'un CSTN et ayant rechuté. De plus, l'ADNtc a été détecté dans le plasma environ 200 jours avant la détection de la rechute par les techniques d'imagerie (207).

L'ADNtc pourrait devenir un outil clinique qui aiderait les cliniciens à proposer des traitements adjuvants et un suivi particulier aux patientes qui présentent un risque élevé de rechute. Cependant, cet outil serait différent et propre à chaque patient, en fonction des mutations identifiées dans la tumeur. Il pourrait être d'un grand intérêt pour prédire la réponse à la chimiothérapie de première ligne et la survie chez les patientes métastatiques, atteintes d'un cancer du sein (204).

D'autres éléments circulants, tels que les protéines circulantes dans le sang pourraient avoir un rôle prédictif et pronostic dans plusieurs cancers, y compris le cancer du sein. Il serait sans doute intéressant de combiner plusieurs marqueurs tissulaires, circulants et génétiques pour établir un marqueur composite, fiable dans la prédiction de la réponse aux traitements et de la rechute, chez les patientes atteintes d'un CSTN.

PARTIE 2

LA RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PREDICTIFS ET PRONOSTIQUES DU CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF EN ANALYSANT LES PARAMETRES IMMUNITAIRES LOCAUX ET SYSTEMIQUES

2. RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PREDICTIFS ET PRONOSTIQUES DANS LE CSTN

Le premier axe de mon projet doctoral a été focalisé sur la recherche de biomarqueurs circulants prédictifs et pronostiques dans le CSTN. Je me suis intéressé particulièrement aux paramètres dérivés de la formule sanguine, notamment les taux de neutrophiles, lymphocytes, plaquettes et les différents rapports entre eux, tels que NLR et PLR. Au vu des nombreux résultats présentés dans la littérature démontrant l'intérêt de ces paramètres circulants dans plusieurs types de cancer, et la validation de la quantité de TILs comme un biomarqueur fiable dans le CSTN, nous avons souhaité déterminer si les paramètres circulants pourraient apporter des informations supplémentaires aux celles obtenues par la quantification des TILs, voire les remplacer dans la prédiction de la réponse à la CTNA du CSTN et de la survie sans rechute métastatique. Plus précisément, nos hypothèses étaient les suivantes :

Les paramètres NLR, PLR, neutrophiles et/ou plaquettes au diagnostic sont des biomarqueurs prédictifs de la réponse à la CTNA, du risque de rechute métastatique et de la survie sans rechute métastatique, dans le CSTN.

La quantité de TILs, évaluée sur la biopsie de diagnostic est un biomarqueur prédictif de la réponse à la CTNA, du risque de rechute métastatique et de la survie sans rechute métastatique, dans le CSTN.

Il existe une corrélation entre le taux sanguin de neutrophiles ou plaquettes, ou entre le NLR et le PLR et la quantité de TILs sur la biopsie tumorale effectuée avant le traitement néoadjuvant.

Afin de tester nos hypothèses, nous avons analysé les données de 120 patientes atteintes d'un CSTN et traitées par CTNA au Centre Jean PERRIN (CJP). Ces données ont été extraites de la base de données des CSTN du CJP.

2.1. LES OBJECTIFS

L'objectif principal de cette recherche était de déterminer si les paramètres NLR, PLR, neutrophiles et/ou plaquettes au diagnostic sont des meilleurs biomarqueurs prédictifs de la réponse à la CTNA que le taux de TILs au diagnostic, dans le CSTN.

Les objectifs secondaires de cette recherche étaient les suivants :

- Déterminer si les paramètres NLR, PLR, neutrophiles et/ou plaquettes au diagnostic sont des meilleurs biomarqueurs prédictifs du risque de rechute métastatique que le taux de TILs au diagnostic.
- Déterminer si les paramètres NLR, PLR, neutrophiles et/ou plaquettes au diagnostic sont des meilleurs biomarqueurs prédictifs de la survie sans rechute métastatique que le taux de TILs au diagnostic.

2.2. LA BASE DE DONNEES DU CSTN

Au Centre Jean PERRIN, nous avons créé une base de données (BD) répertoriant tous les cas de CSTN diagnostiqués et/ou traités au centre depuis 2008. Elle est mise à disposition de plusieurs utilisateurs pour la saisie, la mise à jour et la recherche. En juillet 2021, la BD compte 776 cas de CSTN primitifs ou de cancers du sein ayant développé au moins une fois une tumeur triple négative pendant leur prise en charge et/ou suivi.

Depuis sa conception, plusieurs étudiants ont participé à l'alimentation de cette BD, qui recensait 417 cas en octobre 2018. Tout au long de mon projet doctoral, j'ai été chargé de la gestion de la base, à savoir le transfert dans un support sécurisé et plus simple d'utilisation, la mise à jour de tous les cas existants, la saisie de nouveaux cas de CSTN et la formation de nouveaux utilisateurs.

Cette BD est enregistrée dans le registre CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) de l'établissement sous la référence « Ref-2018-08 ». Toutes les patientes, dont les données sont rentrées dans notre BD, en ont été informées et ne s'y sont pas opposées. Concernant les recherches dans le cadre de mon projet doctoral, un avis éthique consultatif favorable a été obtenu le 18 janvier 2021 par le Comité d'éthique des Centres d'Investigation Clinique de la région Rhône-Alpes-Auvergne (numéro IRB 5921).

2.2.1. DONNEES RECUEILLIES

Des données cliniques et biologiques des patientes sont recueillies à partir des documents sources (comptes rendus d'examens, de consultations etc.) et saisies dans la BD de façon structurée et avec le moins de redondance possible. Seules les données nécessaires à la recherche de facteurs pronostiques et prédictifs du CSTN sont recueillies. Elles sont regroupées par « étape » de la prise en charge du CSTN (diagnostic, traitements néoadjuvants, chirurgie, traitements adjuvants et rechutes/progressions, **Figure 19**).

Les données sur le diagnostic du cancer du sein :

- Date du diagnostic
- Type histologique (canalaire / lobulaire / autre)
- Grade SBR (Scarff-Bloom-Richardson)
- Expression des RH, HER2, Ki67
- Classification TNM clinique
- Statut ménopausique au diagnostic
- Les mutations constitutionnelles et somatiques des gènes *BRCA1* et *2*

Les données sur les traitements néoadjuvants :

- Le protocole de CTNA (si applicable)
- Autres traitements néoadjuvants, si applicable (hormonothérapie, thérapies ciblées, etc.)
- Radiothérapie (RT) néoadjuvante (si applicable)
- Progression de la maladie sous les traitements néoadjuvants

Les données sur la chirurgie et la pièce opératoire :

- Date de la chirurgie
- Type de chirurgie (conservatrice/non conservatrice, première intention/post-CTNA)
- Taille de la tumeur sur la pièce opératoire
- Recherche du ganglion sentinelle et/ou curage ganglionnaire
- Type histologique (canalaire/lobulaire/autre) du résidu tumoral

- Grade SBR
- Expression des RH, HER2, Ki67
- La réponse aux traitements néoadjuvants (si applicable) :
 - pCR ou non
 - Classification selon Chevallier, Sataloff, RCB, pTNM, ypTNM
 - Nombre de ganglions lymphatiques envahis

Les données sur les traitements adjuvants :

- Le protocole de chimiothérapie adjuvante (si applicable)
- Radiothérapie adjuvante
- Autres traitements, si applicables (hormonothérapie, thérapie ciblée)

Les données sur la rechute et/ou la progression du cancer du sein :

- Date de la rechute/progression
- Type de rechute (locale/controlatérale/métastatique)
- Type moléculaire de la rechute (Luminal A/B, HER2+, TN), si déterminé
- Localisation des métastases (si applicable)
- Les traitements reçus pour la maladie métastatique et leur durée

Les données sur la numération de la formule sanguine :

- Date du bilan biologique (diagnostic, avant la chirurgie, avant la RT, 6 mois après la fin de la RT, 12 mois après la fin de la RT et au moment de la première rechute)
- Taux de leucocytes, neutrophiles, lymphocytes, éosinophiles, basophiles, monocytes et plaquettes

Autres données :

- Cancer concomitant (autre que cancer du sein) et/ou antécédent de cancer (cancer du sein ou autre cancer)
 - Date de diagnostic
 - Traitements reçus

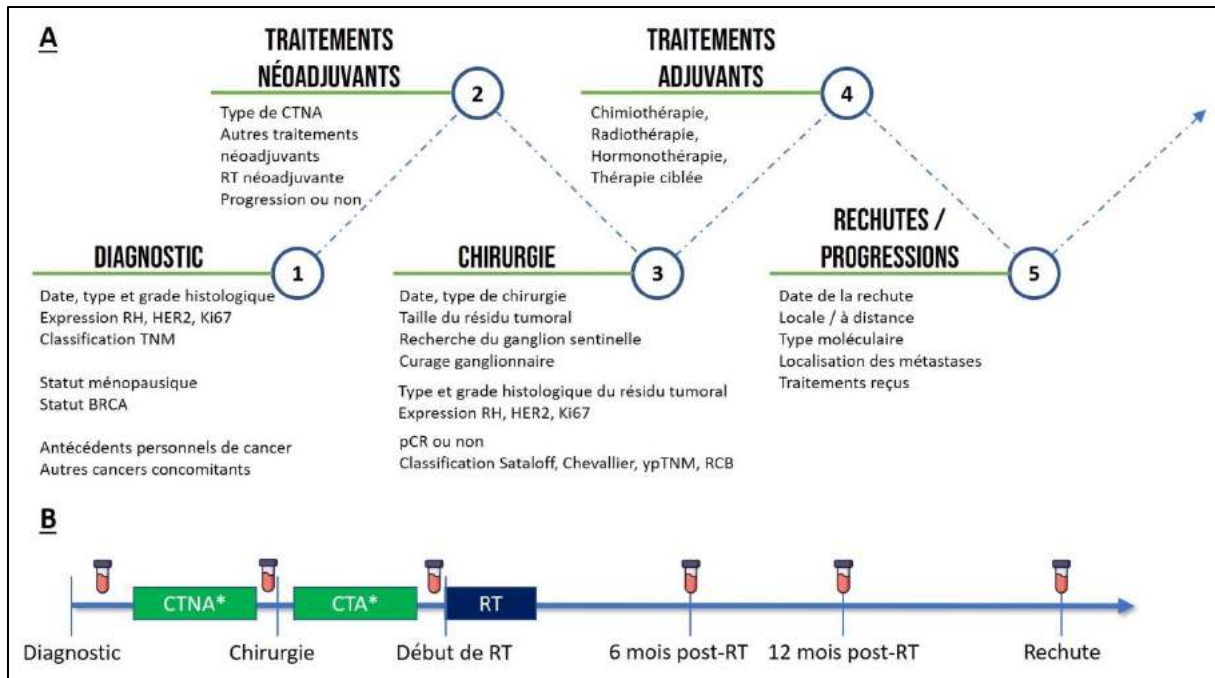


Figure 17 – (A) Les différents types de données recueillies dans la BD (RT : radiothérapie). (B) Les différents bilans biologiques sanguins saisis dans la BD (RT : radiothérapie ; CTA : chimiothérapie adjuvante ; * si applicable).

2.2.2. MISE A JOUR DE LA BD ET SAISIE DES NOUVEAUX CAS

La première étape dans la gestion de la BD concernait son transfert dans le logiciel EnnovClinical, un support couramment utilisé internationalement pour les cahiers d'observation (CRF : *case report form*) des essais thérapeutiques. Ce logiciel présente plusieurs avantages : il est sécurisé, simple d'utilisation et accessible à distance. Il permet également de suivre l'avancement de la saisie des dossiers et de tracer les modifications.

En collaboration avec la gestionnaire de données du Centre Jean PERRIN, j'ai rédigé les différents documents et trames nécessaires à la création de l'interface de la BD et j'ai mis en forme les données extraites, afin de faciliter leur transfert dans le nouveau logiciel (**Figure 20**). Au moment du transfert, 417 cas de CSTN sur la période 2008 – 2015 étaient répertoriés dans la BD.

RÉPONSE AUX TRAITEMENTS NÉOADJUVANTS			
1	Réponse pathologique complète ?	Oui / Non / NC / NA	Non
2	Réponse selon Chevallier	1 / 2 / 3 / 4 / NC	3
3	Réponse selon Sataloff (T)	A / B / C / D / NC	B
4	Réponse selon Sataloff (N)	A / B / C / D / NC	B
5	Taille du résidu (mm)	0.5	
6	Taille du résidu n°2 (mm)		
7	Résidu tumoral (ypT)	ypT0 / ypT1mi / ypT1 / ypT1a / ypT1b / ypT1c / ypT2 / ypT3 / ypT4 / ypTis / NC	ypT1a
8	Résidu ganglionnaire (ypN)	ypN0 / ypN1 / ypN2 / ypN3 / ypN3a / NC	ypN0
9	RCB - Residual Cancer Burden (Symmans)	0 / 1 / 2 / 3 / NC	Non connu
10	Nombre de ganglions prélevés	3	
11	Nombre de ganglions envahis	0	
12	Ganglion sentinelle envahi ?	Oui / Non / NC	Non

Figure 20 - Exemple d'une page de recueil des données sur la réponse aux traitements néoadjuvants

Avant la saisie des cas de CSTN diagnostiqués et/ou traités au CJP à partir de l'année 2016, il était important de mettre à jour les données existantes. Ainsi, j'ai revu tous les dossiers afin de (1) vérifier l'éligibilité des patientes déjà saisies et identifier les cas qui ne respectaient pas les critères de la BD, (2) de mettre à jour les données manquantes et (3) de saisir les données de la numération de la formule sanguine (NFS).

Enfin, la saisie des nouveaux cas concernait les patientes diagnostiquées avec un CSTN primitif ou qui présentaient une rechute de type moléculaire triple négatif d'un cancer du sein entre janvier 2016 et décembre 2019 au CJP. Au total, 295 nouveaux cas ont été saisis pour cette période.

Soixante-quatre cas sur l'année 2020 ont été saisis dans la BD par Manon BARAILLE, étudiante en Master 2, stagiaire au CJP, sous ma supervision.

2.3. PATIENTS ET METHODES

2.3.1. LES CRITERES DE SELECTION DES PATIENTES

Notre recherche de facteurs prédictifs et pronostiques a porté sur les cellules périphériques circulantes et les TILs. Elle a été réalisée rétrospectivement sur la BD des CSTN, pour la période 2008 – 2019. La sélection des patientes a été faite selon les trois critères suivants :

1. CSTN (RH<10%, HER2- par hybridation *in situ*), histologiquement prouvé, non métastatique au diagnostic
2. Traitement par CTNA de type anthracyclines-taxanes seulement (pas de RT néoadjuvante, pas d'autres types de médicament dans le schéma)
3. Résultats de la NFS disponibles avant les traitements

2.3.2. LES BILANS SANGUINS

Les bilans sanguins permettant d'obtenir les résultats de la NFS ont été réalisés dans le laboratoire associé au CJP (le laboratoire d'hématologie du Centre de biologie du CHU Gabriel Montpied de Clermont-Ferrand), la veille de l'administration de la première cure de CTNA. **NLR** a été défini comme le rapport entre le nombre absolu de neutrophiles (nombre de cellules x 10¹²/L) sur le nombre absolu de lymphocytes (nombre de cellules x 10¹²/L). **PLR** a été défini comme le rapport entre le nombre absolu de plaquettes (nombre de plaquettes x 10¹²/L) sur le nombre absolu de lymphocytes (nombre de cellules x 10¹²/L).

2.3.3. L'ANALYSE HISTOPATHOLOGIQUE

L'analyse par IHC des biopsies et des pièces opératoires a permis de définir le statut triple négatif (RH < 10% ; statut HER2 négatif par hybridation *in situ*).

La pCR a été définie comme l'absence de toute tumeur invasive (ypT0) ou présence d'adénocarcinome *in situ* seulement (ypTis) dans le sein, absence d'envahissement ganglionnaire (ypN0) et absence de métastases (ypM0), après la CTNA.

Dans le cadre de mes travaux, nous avons classé les patientes en deux groupes :

Groupe 1 : résidu tumoral absent ou petit. Ce groupe comprenait les patientes avec une pCR ou un résidu tumoral de petite taille, sans envahissement ganglionnaire (ypT0 ypN0, ypTis ypN0, ypT1a ypN0 et ypT1b ypN0).

Groupe 2 : ce groupe comprenait toutes les autres patientes, à savoir, petit résidu tumoral avec envahissement ganglionnaire (ypN+) et gros résidu tumoral (\geq ypT1c) quel que soit le statut ganglionnaire.

2.3.4. L'ÉVALUATION DES TILS

L'évaluation de la quantité de TILs sur la biopsie de diagnostic a été réalisée par la Dre Myriam KOSSAÏ (pathologiste au sein du CJP) et Mlle Nathalie LACRAMPE (interne en médecine), selon les recommandations de l'*International Immuno-Oncology TILs Working Group* (www.tilsinbreastcancer.org). Dans l'analyse statistique, les TILs ont été évalués non seulement comme une variable continue, mais aussi binaire, selon différents seuils (5%, 10%, 30%, 50%).

2.3.5. LES ANALYSES STATISTIQUES

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel R, version 3.6.1 (R-Project, GNU GPL, <http://cran.r-project.org/>). Pour l'analyse descriptive, chaque variable d'intérêt a été exprimée par des résumés statistiques classiques et des représentations graphiques. Les variables catégorielles ont été présentées par les effectifs et les taux associés des modalités de chaque variable.

Les tableaux des variables continues comprennent : le nombre des valeurs disponibles pour chaque variable (n), des mesures de tendance centrale (moyenne et médiane), des mesures de dispersion (écart-type et intervalle interquartile), les valeurs maximales et minimales, la valeur p, l'intervalle de confiance (IC 95%).

Pour l'analyse inférentielle nous avons utilisé le seuil de significativité conventionnel de 0.05. Pour évaluer la relation entre deux variables catégorielles nous avons utilisé la matrice de contingence et le test exact de *Fisher*, tandis qu'entre une variable continue et une variable catégorielle nous avons utilisé le test de *Wilcoxon-Mann-Whitney* ou le test de *Student*, ainsi que la courbe ROC. La relation entre une variable continue et la MFS a été investiguée par le modèle de régression de *Cox* et la courbe ROC dépendante du temps.

2.4. RESULTATS OBTENUS

Parmi les 712 cas de CSTN saisis dans la BD au moment de notre analyse, nous avons identifié 237 cas de CSTN primitifs, traités par CTNA. Après élimination de 27 cas de cancer métastatique d'emblée, 31 cas non traités par CTNA de type anthracyclines-taxanes, 15 cas traités par RT néoadjuvante et 44 cas dont les données de la NFS au diagnostic n'étaient pas disponibles, nous avons obtenu 120 cas de CSTN analysables (Figure 21).

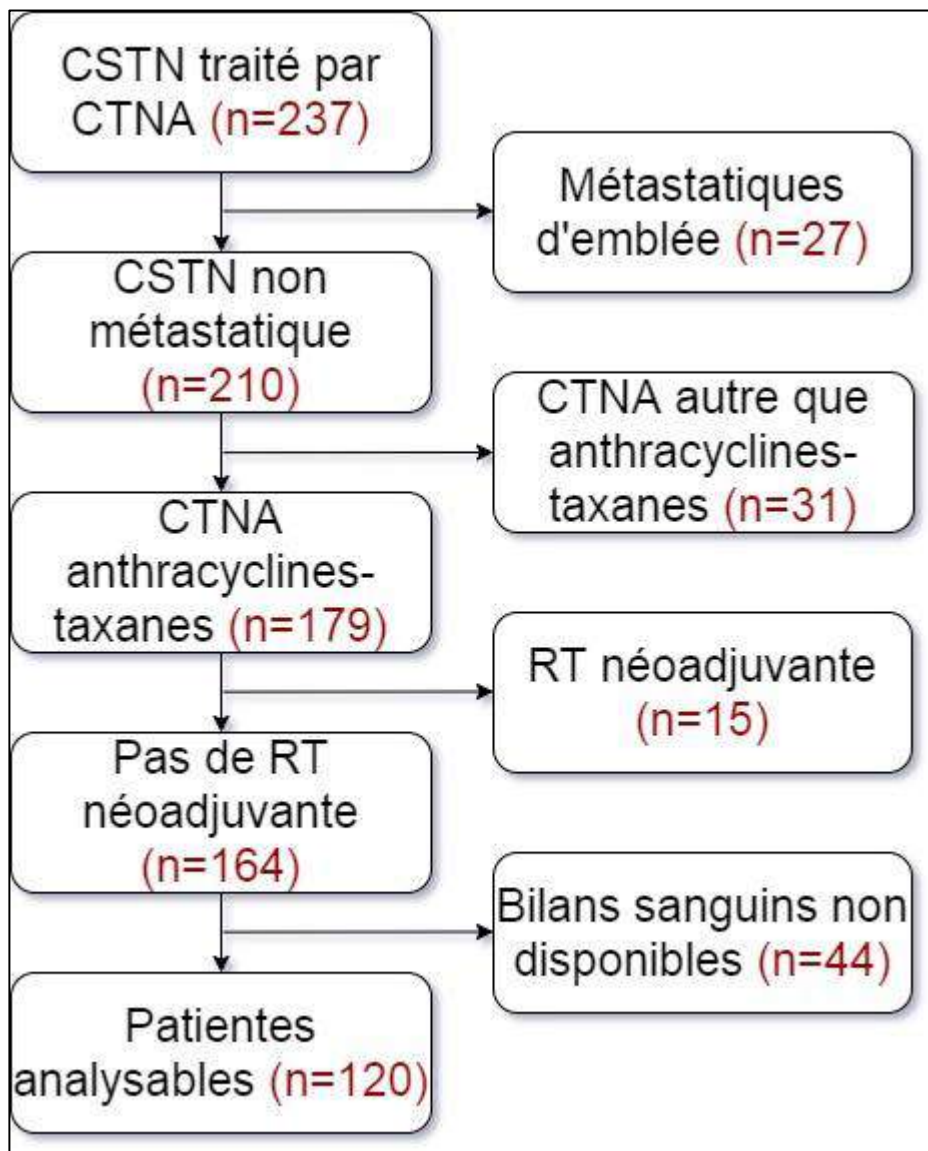


Figure 21 - Flowchart de la sélection des patientes analysées

2.4.1. LES CARACTERISTIQUES DES PATIENTES

Les principales caractéristiques des patientes sont présentées dans le **Tableau 11**. Pour une description plus détaillée des caractéristiques, voir **Annexe 5**.

Tableau 11 - Les principales caractéristiques des patientes analysées

Variable	N (%)
Age médian (années)	56 (28 – 86)
> 50 ans	79 (65.8%)
≤ 50 ans	41 (34.2%)
Type histologique au diagnostic	
Carcinome canalaire infiltrant	98 (81.7%)
Carcinome canalaire infiltrant + <i>in situ</i>	21 (17.5%)
Carcinome lobulaire infiltrant + <i>in situ</i>	1 (0.8%)
Grade SBR sur la biopsie de diagnostic	
1	4 (3.3%)
2	48 (40%)
3	66 (55%)
Non connu	2 (1.7%)
Ki67	53.8 ± 28.8
< 20%	17 (14.5%)
≥ 20 %	100 (85.5%)
Classification TNM clinique	
T1	30 (25%)
T2	70 (58.3%)
T3	13 (10.8%)
T4	5 (4.2%)
Tx	2 (1.7%)
Cancer du sein inflammatoire	5 (4.2%)
Envahissement ganglionnaire	
N0	69 (57.5%)
N1	35 (29.2%)
N2	4 (3.3%)
N3	3 (2.5%)
Nx	9 (7.5%)
pCR	34 (28.3%)
Classification TNM pathologique post-CTNA	
ypT1a ypN0	16 (13.3%)
ypT1b ypN0	8 (6.7%)
ypT0/Tis ypN>0	8 (6.7%)
ypT1a ypN>0	3 (2.5%)
ypT1b ypN>0	3 (2.5%)
ypT1c ypN0	17 (14.2%)
ypT1c ypN>0	6 (5%)
ypT≥2 ypN0	7 (5.8%)
ypT≥2 ypN>0	18 (15%)
Rechute métastatique	24 (20%)

Le suivi médian des patientes était de 46 mois [IC 95% (37 – 55)]. L'âge médian au diagnostic était de 56 ans, et environ deux tiers des patientes avaient plus de 50 ans. La quasi-totalité des patientes (99.2%) présentait un carcinome canalaire infiltrant, associé à un carcinome *in situ* pour 21 (17.6%) d'entre elles. La majorité des tumeurs était de grade histologique intermédiaire ou élevé (40% et 55%, respectivement). Les tumeurs de taille T2 étaient les plus fréquents (58.3%), tandis que 69 patientes (57.5%) ne présentaient pas d'envahissement ganglionnaire au diagnostic.

A l'issue de la CTNA, 34 patientes (28.3%) étaient en pCR. Vingt-quatre patientes présentaient un petit résidu tumoral (16 patientes avec ypT1a ypN0 et 8 patientes avec ypT1b ypN0). Ainsi, 58 patientes appartenaient au **Groupe 1** et 62 patientes au **Groupe 2**. Parmi les 120 patientes analysées, 24 (20%) d'entre elles ont développé des métastases.

2.4.2. TILS ET LEUR ASSOCIATION AVEC LA PCR

Les données des TILs étaient disponibles pour 98 (81.7%) patientes de notre cohorte et ont été évalués sur la biopsie de diagnostic du CSTN. La moyenne et la médiane des TILs étaient de 17.1% et de 10%, respectivement, tandis que la valeur maximale observée était de 80%.

Parmi les 98 patientes dont les données de TILs étaient disponibles, 31 (31.6%) d'entre elles étaient en réponse pathologique complète après la CTNA. Nous avons pu montrer que les patientes ayant obtenu une pCR présentaient un taux plus élevé de TILs sur la biopsie ($p=0.043$). De plus, les patientes avec un taux de TILs $\geq 12.5\%$ au diagnostic (TILs évalué en tant que variable continue) avaient 2 fois plus de chance d'obtenir une pCR à l'issue de la chimiothérapie, par rapport aux patientes dont le taux d'infiltration lymphocytaire tumorale était $< 12.5\%$ (taux de pCR : 43.5% vs 21%, respectivement, $p=0.029$, **Tableau 12, Figure 22**).

Tableau 12 – Taux de pCR selon les différents seuils de TILs (12.5% pour variable continue et 30% pour variable binaire).

	TILs $\geq 12.5\%$	TILs $< 12.5\%$	TILs $\geq 30\%$	TILs $< 30\%$
pCR	20 (43.5%)	11 (21%)	14 (53.9%)	17 (23.6%)
Non-pCR	26 (56.5%)	41 (79%)	12 (46.1%)	55 (76.4%)

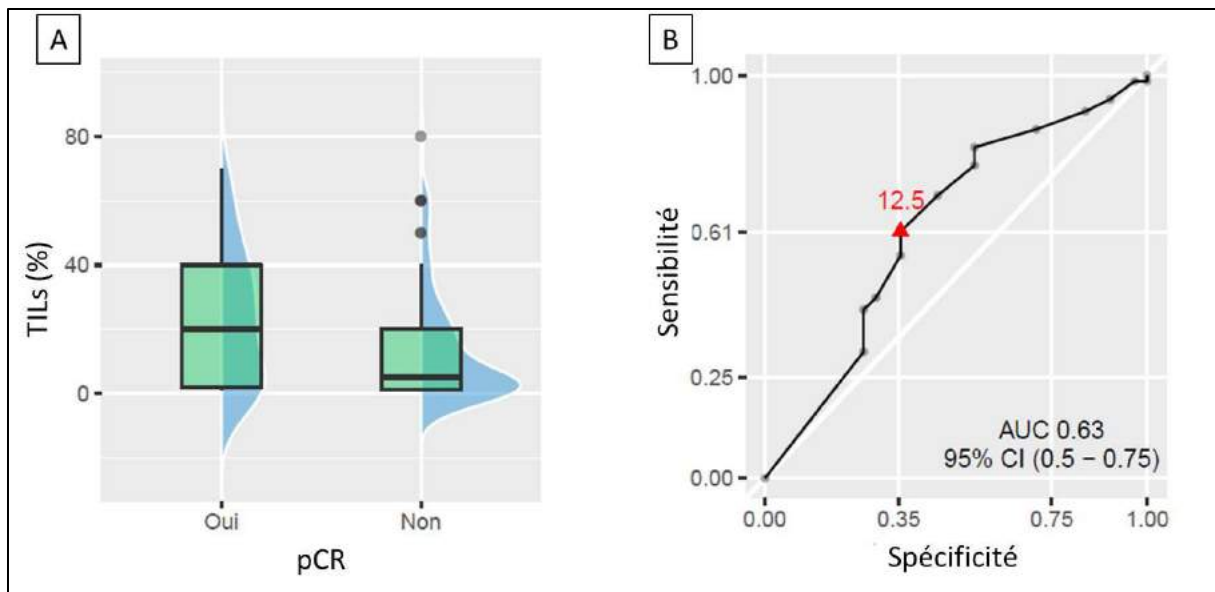


Figure 22 - Association entre TILs à la biopsie de diagnostic et le pCR. **(A)** Les patientes pCR présentent un taux plus élevé de TILs à la biopsie ($p=0.043$). **(B)** La courbe ROC montrant que le seuil de 12.5% de TILs permet de discriminer entre les patientes pCR et non-pCR.

Lorsque les TILs ont été évalués en tant que variable binaire (élevé vs bas, selon les différents seuils définis), seulement le seuil de 30% permettait d'obtenir une différence significative du taux de pCR. En effet, les patientes avec un taux de TILs $\geq 30\%$ au diagnostic présentaient un taux plus élevé de pCR, par rapport aux patientes dont les TILs étaient $< 30\%$ (taux de pCR : 53.9% vs 23.6%, respectivement, $p=0.007$, **Tableau 12**). Cependant, nous n'avons pas trouvé d'association entre le taux de TILs (variable continue ou binaire) et le Groupe 1 (résidu tumoral absent ou petit).

2.4.3. TILS BAS AU DIAGNOSTIC SONT ASSOCIES A UN RISQUE ELEVE DE RECHUTE METASTATIQUE

Parmi les 98 patientes dont les données de TILs étaient disponibles, 20 (20.4%) ont développé des métastases. D'après la courbe ROC, un seuil de TILs à 1.5% (variable continue) peut discriminer entre les patientes qui développent des métastases et celles qui n'en développent pas. En effet, les patientes avec TILs $< 1.5\%$ présentaient un risque trois fois plus élevé de métastase que les patientes avec TILs $\geq 1.5\%$ (taux de rechute métastatique : 37.9% vs 13%, respectivement, $p=0.012$, **Figure 23**). Toutefois, aucune association n'a été mise en évidence entre TILs en tant que variable binaire (seuils 5%, 10%, 30% et 50%) et le risque de survenue de rechutes métastatiques.

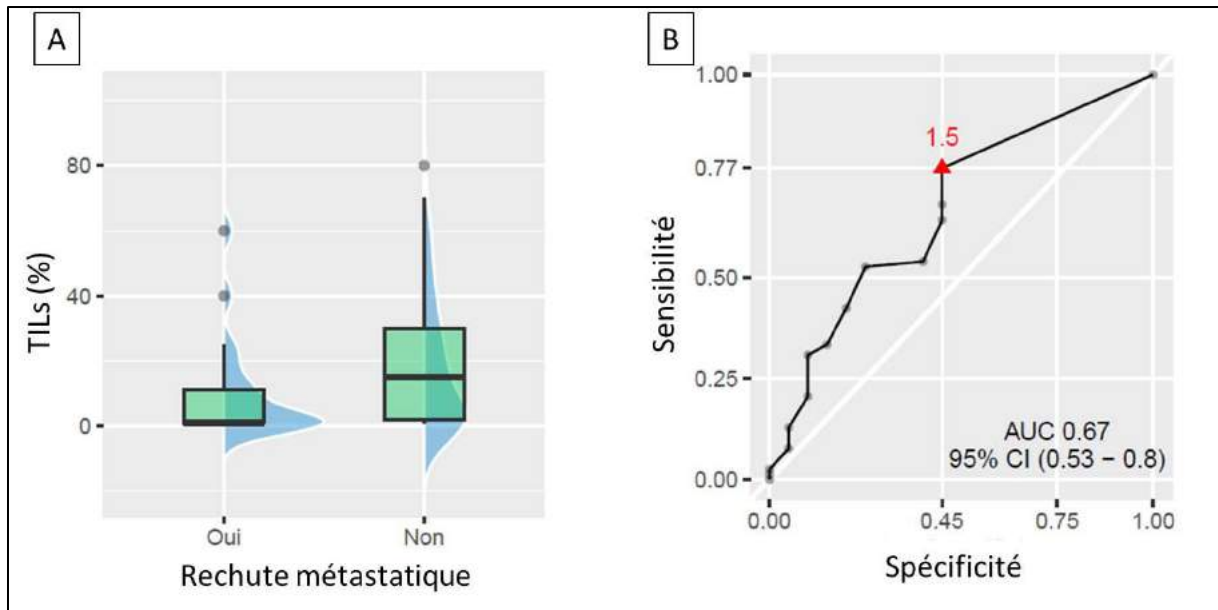


Figure 23 - Association entre TILs à la biopsie de diagnostic et la survenue de la rechute métastatique. **(A)** Les patientes présentant des rechutes métastatiques ont un faible de taux de TILs au diagnostic ($p=0.021$). **(B)** La courbe ROC montrant que le seuil de 1.5% de TILs permet de discriminer entre les patientes qui développent des métastases ou non.

2.4.4. LE PLR EST ASSOCIE A LA REPONSE A LA CTNA

Nous avons ensuite étudié la relation entre les différents paramètres sanguins au diagnostic et la réponse à la CTNA. Aucune corrélation statistiquement significative n'a été retrouvée entre la réponse à la CTNA et chacun des paramètres suivants : neutrophiles, monocytes, lymphocytes, plaquettes et NLR. En revanche, la valeur de PLR était statistiquement plus faible dans le Groupe 1 (médiane 124.3) que dans le Groupe 2 (médiane 141.2), $p=0.045$ (**Figure 24**). Les courbes ROC ont montré qu'un seuil de PLR à 133.25 permet de discriminer entre les deux groupes (**Figure 25**).

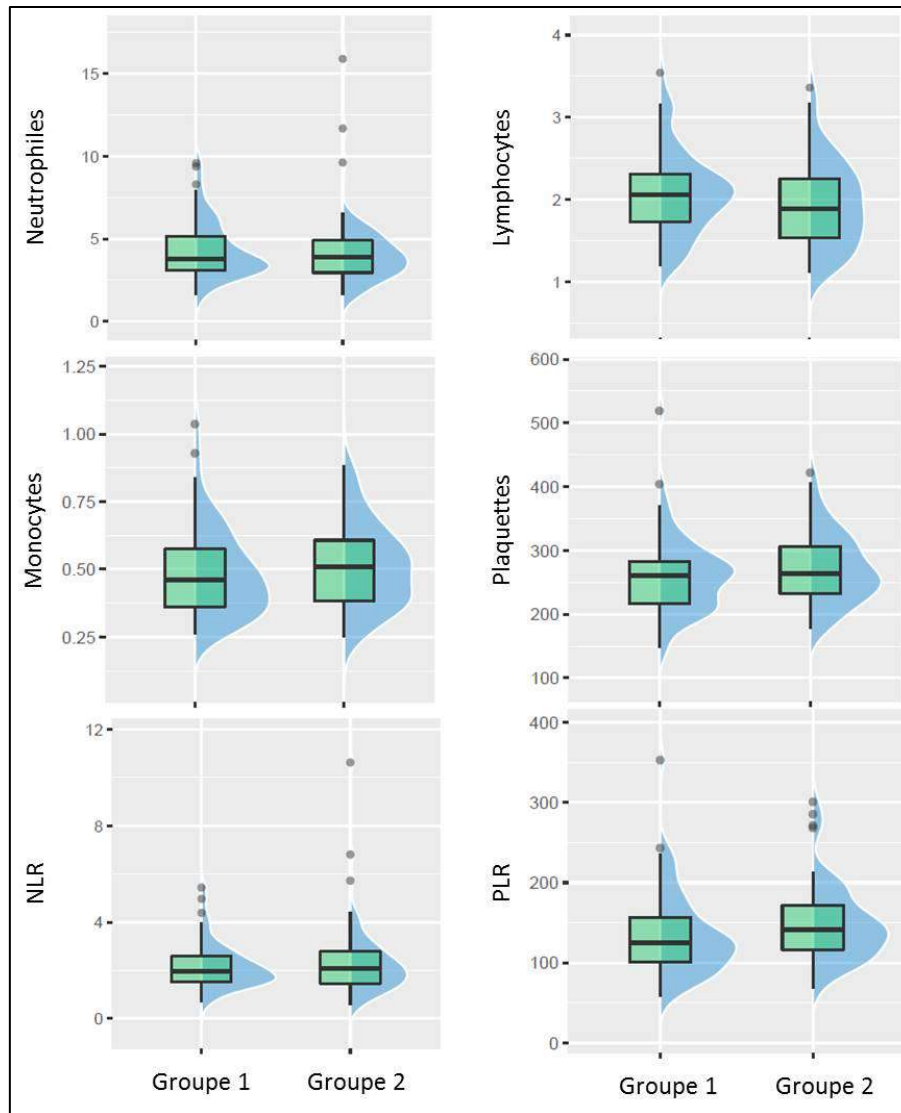


Figure 24 – La différence des éléments figures du sang entre le groupe 1 et le groupe 2

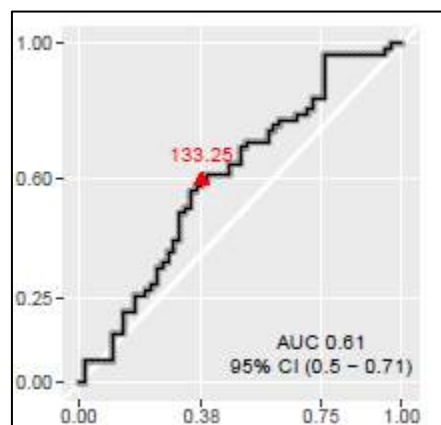


Figure 25 - Courbe ROC montrant un seuil de 133.25 de PLR pour discriminer entre les patientes avec bonne (pCR + petites tumeurs résiduelles) et mauvaise réponse

2.4.5. RELATION ENTRE LES PARAMETRES SANGUINS AU DIAGNOSTIC ET LA SURVENUE DE LA RECHUTE METASTATIQUE

Parmi les 120 patientes de notre cohorte, seulement 24 patientes ont développé des métastases. La recherche d'une association entre les différents paramètres issus de la formule sanguine au diagnostic et la survenue de la rechute métastatique n'a pas permis d'obtenir des résultats significatifs.

2.4.6. RELATION ENTRE LES PARAMETRES SANGUINS ET LES TILS

Dans notre cohorte, nous n'avons pas pu mettre en évidence une corrélation entre le taux de TILs au diagnostic et les paramètres dérivés de la formule sanguine (neutrophiles, lymphocytes, monocytes, plaquettes, NLR et/ou PLR).

2.4.7. LE GROUPE 1 (PCR + PETITES TUMEURS) PRESENTE UN FAIBLE RISQUE DE RECHUTES METASTATIQUES

Nous n'avons pas observé une différence significative du risque métastatique entre les patientes pCR et non-pCR. Toutefois, l'ensemble des patientes avec un résidu tumoral petit ou absent (Groupe 1) présentait un plus faible risque de rechute métastatique ($p=0.042$). Le risque relatif de développer des métastases était 2.27 fois plus élevé dans le Groupe 2 (**Tableau 13**).

Tableau 13 - La survenue de la rechute métastatique

	Rechute métastatique	Pas de rechute métastatique	<i>p</i> valeur
pCR	5	29	$p = 0.453$
Non-pCR	19	67	
Groupe 1	7	51	$p = 0.042$
Groupe 2	17	45	

2.4.8. LE GROUPE 1 (PCR + PETITES TUMEURS RESIDUELLES) PRESENTE UNE MEILLEURE SURVIE SANS METASTASES (MFS)

Outre le faible risque de métastases, les patientes du Groupe 1 présentaient aussi une meilleure MFS que les patientes du Groupe 2 (**Figures 26 et 27**). La différence entre les deux groupes était statistiquement significative à 24, 60 et 96 mois après le diagnostic ($p=0.024$, 0.035 et 0.024 respectivement, **Figure 26**), ainsi qu'à 60 et 96 mois après la chirurgie ($p=0.036$ et 0.025 , respectivement, **Figure 27**). Nous n'avons pas observé une différence de MFS entre les patientes pCR et non-pCR.

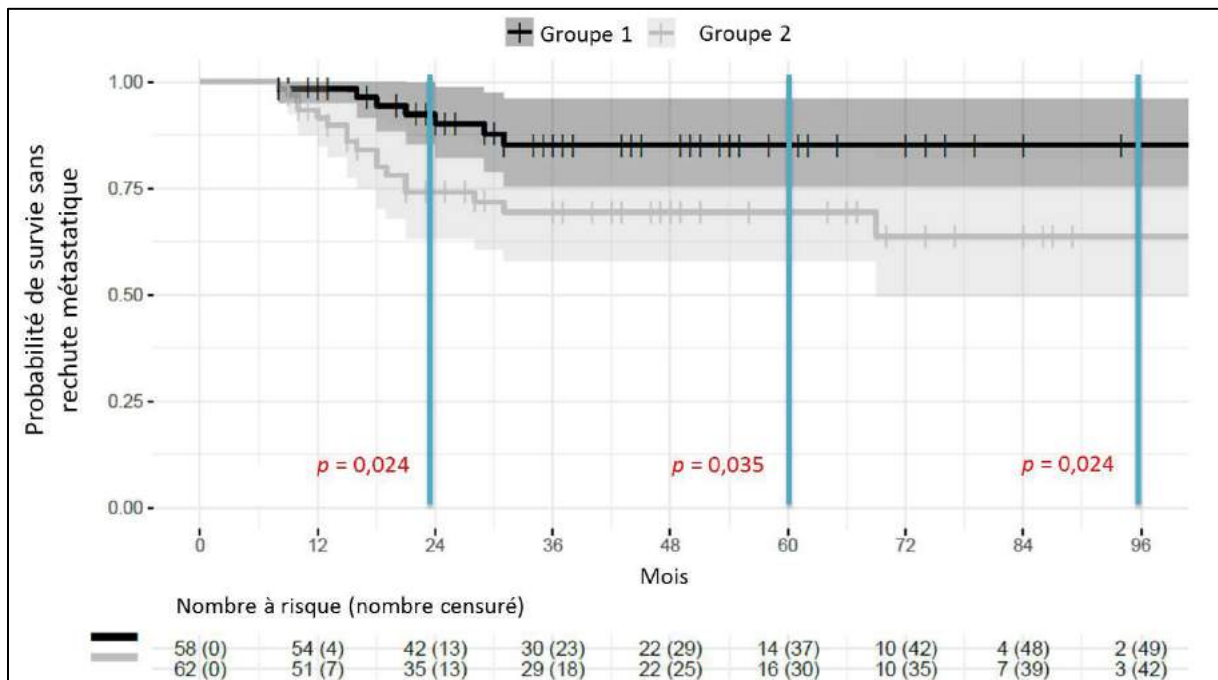


Figure 26 - Probabilité de la survie sans rechute métastatique (MFS) depuis le diagnostic. Les patientes du Groupe 1 présentent une meilleure MFS à 24, 60 et 96 mois que celles du Groupe 2.

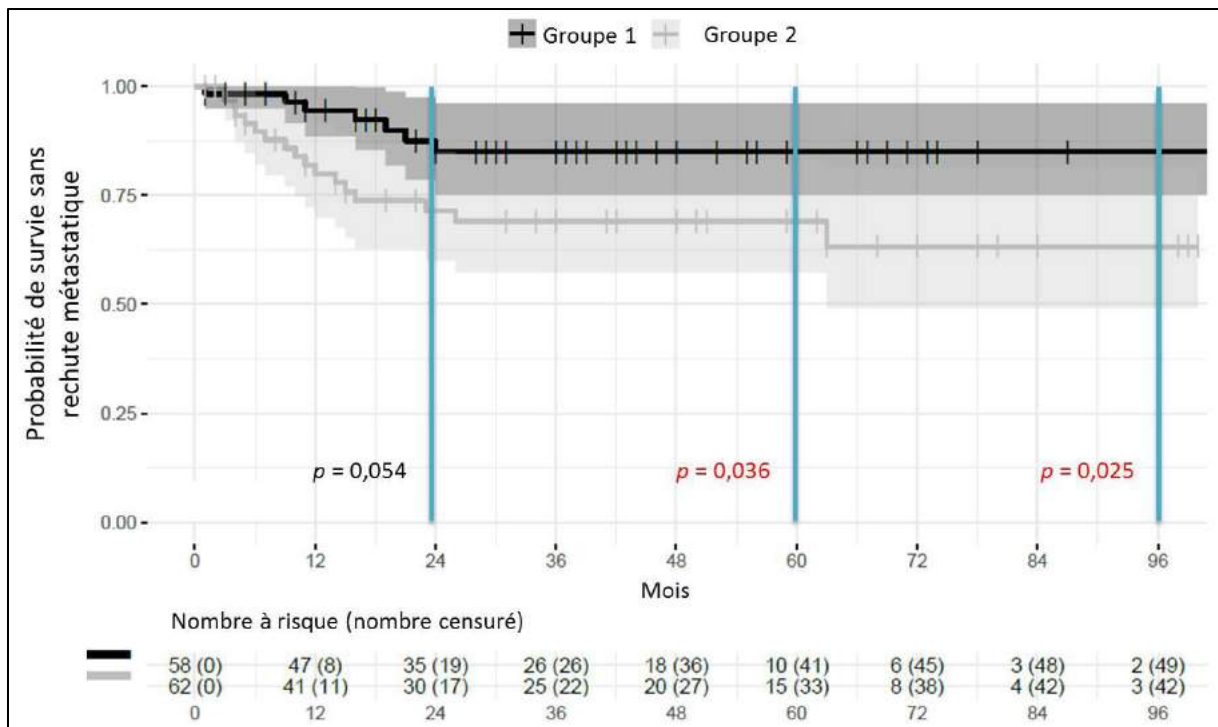


Figure 27 - Probabilité de la survie sans rechute métastatique (MFS) depuis la chirurgie. Les patientes du Groupe 1 présentent une meilleure MFS à 60 et 96 mois que celles du Groupe 2.

En résumé, nos résultats montrent que les paramètres issus de la formule sanguine (neutrophiles, lymphocytes, plaquettes, monocytes, NLR, PLR), au moment du diagnostic, ne sont pas des biomarqueurs plus performants que les TILs dans la prédiction de la réponse pathologique complète (pCR) suite à la CTNA et du risque de survenue de métastases.

De plus, dans notre cohorte, la pCR n'était pas corrélée au risque de rechute métastatique.

Néanmoins, les patientes du Groupe 1 (pCR + petites tumeurs résiduelles) avaient un risque de rechute métastatique plus faible et une meilleure survie sans métastases que les patientes du Groupe 2 (gros résidu tumoral).

PLR était le seul paramètre qui montrait le risque des patientes d'appartenir au groupe 1, le groupe qui, sur le long terme, avait un meilleur pronostic.

2.5. DISCUSSION

Notre étude nous a permis de mettre en évidence plusieurs résultats intéressants. Premièrement, nous avons montré que **les TILs au diagnostic étaient des biomarqueurs plus performants que les paramètres sanguins** (neutrophiles, lymphocytes, monocytes, plaquettes, NLR et PLR) **dans la prédiction de la réponse pathologique complète (pCR) du CSTN à la CTNA standard**. Cependant, lorsque l'ensemble des **pCR et petites tumeurs résiduelles (Groupe 1) était considéré comme « bonne » réponse à la CTNA, le seul biomarqueur prédictif était le PLR**.

Même si la pCR est actuellement considérée et acceptée universellement comme un critère prédictif puissant du pronostic du CSTN (92), il a été montré que **la persistance d'un résidu tumoral de petite taille après la CTNA n'aggrave pas le pronostic**, qui est pratiquement identique à celui des patientes en pCR. Symmans et al. qui ont mis au point un nouveau système histologique de la mesure de la réponse à la CTNA, le RCB, ont montré que les patientes avec un score RCB-0 (pCR) et RCB-I (petit résidu tumoral) avaient la même survie à 5 ans (90). Le score RCB n'a pas pu être analysé dans notre cohorte, en raison de matériel tissulaire insuffisant pour une grande partie des patientes. C'est pourquoi, **nous avons défini le statut ypT1ab ypN0 comme « petit résidu tumoral »**.

Deuxièmement, dans la population étudiée, une proportion importante des patients présentait un petit résidu tumoral post-CTNA (20% de la cohorte entière (24 patientes sur 120) et 28% du sous-groupe non-pCR (24 patientes sur 86)), parmi lesquelles, seulement deux patientes ont développé une rechute métastatique, soit 8,3% (Tableau 13). Ainsi, **le taux de rechute métastatique chez les patients ayant un petit résidu tumoral était environ deux fois moins important que le taux de rechute métastatique des patientes en pCR** (5 patientes sur 34, 14,7%, Tableau 13).

De plus, des taux similaires de rechute métastatique ont été observés chez les patientes dont les données de TILs étaient disponibles (98 sur 120 patientes). En effet, parmi les 31 patientes en pCR, trois ont rechuté à distance (9,6%), tandis que parmi les 19 patientes avec un petit résidu tumoral, une seule patiente (5,2%) a rechuté. Ces proportions montrent que **notre cohorte était composée de beaucoup de patientes non-pCR (ypT1ab ypN0) qui avaient un très bon pronostic**.

Une explication possible de la perte du pouvoir prédictif des TILs lorsque la réponse favorable après la CTNA comprenait pCR + petites tumeurs, pourrait être la sensibilité intrinsèque des patientes avec un petit résidu tumoral à la CTNA et le recrutement des TILs pendant ce traitement. En effet, les patientes auraient pu avoir un faible taux de TILs au diagnostic, mais une augmentation du nombre de TILs pendant la CTNA et présenter ainsi un petit résidu tumoral post-traitement. En effet, **les patientes avec un petit résidu tumoral post-CTNA dans notre cohorte avaient un taux plus faible de TILs au diagnostic** (médiane : 2%, moyenne \pm écart-type : $14\% \pm 7\%$), **que les patientes en pCR** (médiane : 20%, moyenne \pm écart-type : $23\% \pm 21\%$) ($p < 0,05$, **Annexe 5**). La CTNA engendre l'activation de la réponse immunitaire antitumorale par la destruction des cellules cancéreuses, dont le contenu attire les lymphocytes dans le lit tumoral. Ce phénomène est un facteur majeur responsable de la réponse favorable à la chimiothérapie et de la bonne survie à long-terme (168,208).

La valeur prédictive des TILs a été démontrée dans plusieurs études sur le CSTN, les seuils de 50% et 60% étant les meilleurs seuils décrits, permettant de discriminer entre les patientes pCR et non-pCR (177,209). Dans notre cohorte, **le seuil des TILs permettant de montrer une différence entre pCR et non-pCR était de 30%**, plus bas que la plupart des valeurs référées dans la littérature, mais quand-même similaire aux résultats de certaines équipes (167,178,210–212).

La présence de TILs reflète l'état de l'immunité systémique et locale (site tumoral). Les mécanismes derrière l'association entre les paramètres sanguins circulants et l'infiltration lymphocytaire tumorale dans le cancer du sein n'ont pas encore été bien explorés. **Nos recherches n'ont pas montré une corrélation entre les paramètres sanguins au diagnostic et les TILs**. Cela laisse supposer qu'il existe une régulation différente de l'immunité systémique et celle locale. Des études ont montré qu'une diminution du taux des lymphocytes dans la circulation sanguine est associée à une survie médiocre dans le cancer du sein métastatique, néanmoins, les données sur l'impact des paramètres sanguins au moment du diagnostic sur la réponse aux traitements et la survie du CSTN restent rares (213,214).

A notre connaissance, **nous présentons les résultats de la plus grande étude menée sur le CSTN et montrant une valeur prédictive du PLR**. Les travaux de Graziano et al. ont montré qu'une combinaison de NLR faible (≤ 2.42) et de PLR faible (\leq

104.47) était associée à un taux élevé de pCR dans une cohorte de 373 patientes atteintes de cancer du sein, parmi lesquelles 62 présentaient un CSTN (198). Cuello-Lopez et al. ont montré qu'un PLR faible ($PLR < 150$) avant les traitements, corrélait avec un taux élevé de pCR, dans une population de 272 patientes avec un cancer du sein. Cependant, aucune corrélation n'a pas été observée parmi les 62 patientes de leur cohorte atteintes de CSTN (132). Des résultats similaires ont été obtenus par Asano et al. dans une population de 177 patientes atteintes d'un cancer du sein, mais seulement 61 d'entre elles avaient un CSTN (196).

Dans notre étude, **le seuil permettant de faire la distinction entre les populations PLR bas et PLR élevé était de 133,25**, similaire aux données déjà publiées (132,197). Il est important de noter que dans notre étude **le PLR bas n'était pas associé à la pCR, mais au groupe pCR + petites tumeurs résiduelles (Groupe 1)**. Dans notre cohorte, **le groupe 1 avait une meilleure survie sans rechute métastatique que le groupe pCR**. Cela implique que le PLR est le seul facteur prédictif de la « bonne » réponse. En effet, **les valeurs de PLR au diagnostic étaient très similaires entre le groupe pCR** (médiane : 125,3, moyenne \pm écart-type : $131,5 \pm 46,3$) **et le groupe petits résidus tumoraux** (médiane : 124,3, moyenne \pm écart-type : $139,4 \pm 62,4$) (**Annexe 5**). La supériorité de PLR par rapport aux TILs dans la prédiction de la bonne réponse pourrait s'expliquer par une immutabilité du taux de PLR au cours de la CTNA, contrairement aux TILs, qui eux, auraient pu augmenter pendant le traitement et contribuer ainsi à l'obtention de la bonne réponse, malgré le faible infiltrat lymphocytaire au moment du diagnostic.

Les données sur le PLR et son évolution pendant la CTNA sont rares, et principalement obtenues sur les cancers digestifs, traités par radio-chimiothérapie. Certaines de ces études montrent une association entre PLR élevé et pCR, tandis que d'autres suggèrent que le PLR bas est associé à la réponse favorable (215,216). Afin de déterminer à quel moment le PLR présente le plus de puissance prédictive et afin de décrire son évolution pendant et après la CTNA, **nous avons mis en place l'essai clinique PERCEPTION** (217), décrit dans la section 2.6.

Troisièmement, nous montrons que **les TILs sont des biomarqueurs prédictifs de la survie sans rechute métastatique**. Les analyses statistiques ont défini la valeur de 1,5% comme le seuil permettant de différencier entre les patientes à bas et haut

risque de rechute métastatique. Cette valeur de 1,5%, qui est assez faible et impossible à obtenir lors de l'évaluation des TILs, pourrait être considérée comme équivalente à l'absence de TILs. Les biais de sélection des patientes étudiées pourraient être un facteur important dans l'obtention de ce faible seuil. En effet, **la proportion des patientes ayant développé une rechute métastatique était relativement faible** (24 patientes sur 120, soit 20%), tandis que la MFS et la SG étaient relativement longues. De plus, 45% de nos patientes présentaient une tumeur de grade SBR I ou II, ce qui signifie que notre cohorte était composée de patientes atteintes d'un CSTN moins agressif.

En ce qui concerne le **PLR, nous n'avons pas trouvé une corrélation avec la survie, malgré son association avec le groupe pCR + petites tumeurs post-CTNA**. Nous pensons que le PLR pourrait être validé en tant que biomarqueur prédictif de la survie dans des grandes études prospectives. En effet, Corbeau et al. ont montré une association entre le PLR élevé et une mauvaise SSR et SG chez 280 patientes, parmi lesquelles 72 étaient atteintes d'un CSTN (187). De l'autre côté, d'autres études ont montré que le PLR bas (< 100-190) est associé à une meilleure survie (197). Certaines équipes ont travaillé sur le CSTN métastatique. Par exemple, Vernieri et al. ont trouvé une association entre $PLR \geq 200$ et une mauvaise survie sans progression, chez 57 patientes atteintes de CSTN métastatique (199).

Afin de comprendre l'impact de PLR sur la réponse aux traitements et la survie, il est important de comprendre le rôle des plaquettes dans le développement du cancer. **Les plaquettes soutiennent la progression tumorale et le développement des métastases** par la production et la libération des facteurs de croissance dérivés de plaquettes (PDGF A et B), des facteurs angiogéniques et des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF-A). De plus, les plaquettes interagissent avec les interleukines et les métalloprotéines myéloïdes (132,133). Ces molécules, notamment les PDGF, sont aussi produites et libérées par les cellules cancéreuses, afin de stimuler leur propre dissémination et progression (134,135). D'un autre côté, les cellules cancéreuses produisent des molécules inflammatoires, tels que IL-1, IL-3 et IL-6, induisant la différenciation des mégacaryocytes en plaquettes (136) et activant ainsi un cycle vicieux où les plaquettes et les cellules cancéreuses stimulent continuellement la croissance les uns des autres. En outre, les PDGF sont également impliqués dans la régulation des protéines transmembranaires, telles que CDCP1 (CUG domain-containing

protein 1), une protéine surexprimée dans le CSTN et jouant un rôle dans le progression tumorale (136). De plus, l'augmentation du nombre de plaquettes entraîne une coagulation intravasculaire disséminée et favorise le développement des métastases dans plusieurs types de cancers, tels que digestifs, pulmonaires, et prostatiques (137). Finalement, nous pouvons dire que le PLR élevé reflète l'état de l'immunité systémique, où les plaquettes stimulent la progression tumorale, tandis que les lymphocytes l'inhibent.

La plupart des études analysant les cellules sanguines et les plaquettes en tant que biomarqueurs prédictifs dans le CSTN, montre que le NLR est un paramètre plus puissant (133,190–195,197). Ces études ont été menées principalement dans un cadre adjuvant ou sur moins de 90 patientes atteintes de CSTN et traitées par CTNA. Parmi les 120 patientes de notre cohorte, aucune association n'a été décelée entre le NLR et la réponse à la CTNA, probablement due aux biais de sélection.

Cette étude présente plusieurs limites. **Il s'agit d'une étude monocentrique, rétrospective, sur une population de taille relativement petite et composée de patientes non-consécutives.** De plus, les taux des cellules sanguines peuvent être altérés par l'alimentation, les médicaments et les maladies concomitantes, telles que les infections. C'est pourquoi, ces résultats devraient être validés dans des plus grandes cohortes de patientes. Dans ce cadre, la Division de Recherche Clinique du CJP a mis en place l'essai clinique PERCEPTION, dont l'objectif principal est d'évaluer la valeur prédictive des cellules sanguines, NLR, PLR et TILs, avant, pendant et après la CTNA standard dans le CSTN (217).

2.6. L'ESSAI CLINIQUE PERCEPTION

Les études rétrospectives permettent d'obtenir des résultats préliminaires. Néanmoins, il s'avère nécessaire de poursuivre les investigations par des études prospectives pour avoir un meilleur niveau de preuve. Les résultats obtenus sur la BD doivent être validés sur une cohorte prospective de patients. Dans ce cadre, au CJP, nous avons mis en place l'essai clinique **PERCEPTION** (*Corrélation entre les éléments figurés du sang et le taux de l'infiltration lymphocytaire tumorale chez les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif*), ayant pour objectif principal d'étudier la corrélation entre le taux d'infiltration lymphocytaire tumorale évalué sur biopsie et le NLR mesuré sur prélèvement sanguin, chez la femme atteinte d'un CSTN, au moment du diagnostic.

Il m'a été confié la gestion de cet essai clinique depuis les premières étapes de sa conception. Ainsi, j'ai réalisé la veille bibliographique, la rédaction des documents de l'étude (protocole, synopsis, liste des investigateurs), la création du CRF électronique, l'estimation du budget, la recherche de financement et la soumission du protocole aux instances réglementaires (Comité de Protection de Personnes (CPP) pour avis et information de l'Agence Nationale de la Sécurité des Médicaments et des produits de santé (ANSM)). J'ai également réalisé la mise en place de l'étude et j'ai assuré des missions de chef de projet et d'attaché de recherche clinique.

L'essai clinique PERCEPTION rassemble plusieurs intervenants de spécialités différentes, tels que des oncologues, des pathologistes, des chefs de projet clinique, des onco-généticiens, une biostatisticienne et des étudiants. Tous ces experts scientifiques et médicaux ont participé au design de l'étude et à la rédaction du protocole.

PERCEPTION est une recherche impliquant la personne humaine (RIPH) de catégorie 2, à risques et contraintes minimales, menée prospectivement dans un seul centre (CJP). Après obtention d'un avis favorable du CPP Sud Méditerranée IV de Montpellier, l'essai a été mis en place au CJP le 4 décembre 2019 et la première patiente a été incluse dans l'étude le 11 décembre 2019.

2.6.1. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE ET CRITÈRES D'ÉVALUATION

Les objectifs de l'étude et les critères d'évaluation sont présentés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 - Les objectifs et les critères d'évaluation de l'essai PERCEPTION

Objectif principal	Critères d'évaluation
Corrélation entre le taux de TILs sur la biopsie et le NLR mesuré sur prélèvement sanguin, au moment du diagnostic.	<ul style="list-style-type: none"> - La valeur de NLR au diagnostic - Le taux de TILs sur la biopsie de diagnostic
Objectifs secondaires	Critères d'évaluation
Corrélation entre le taux de TILs sur la biopsie, et les autres paramètres de la formule sanguine (taux circulant de leucocytes, de polynucléaires neutrophiles, de lymphocytes, de plaquettes et PLR), au moment du diagnostic.	<ul style="list-style-type: none"> - Les valeurs de leucocytes, lymphocytes, neutrophiles, plaquettes et PLR au diagnostic - Le taux de TILs sur la biopsie de diagnostic
Relation entre les différents paramètres issus de la formule sanguine au moment du diagnostic et les marqueurs de l'évolution histologique et clinique du CSTN : réponse à la CTNA, taux de TILs après la CTNA, rechute de la maladie cancéreuse.	<ul style="list-style-type: none"> - Les valeurs de leucocytes, lymphocytes, neutrophiles, plaquettes et PLR au diagnostic - La réponse à la CTNA selon la classification histologique de Sataloff - Le taux de TILs après la CTNA - La survenue de la rechute métastatique cancéreuse
Relation entre les différents paramètres issus de la formule sanguine le jour de la chirurgie post-CTNA et le taux de TILs au même moment.	<ul style="list-style-type: none"> - Les valeurs de leucocytes, lymphocytes, neutrophiles, plaquettes, NLR, PLR le jour de la chirurgie post-CTNA - Le taux de TILs après la CTNA - Délai entre le dernier cycle de CTNA et la chirurgie
Relation entre tous les paramètres relevés et la présence d'ADN tumoral	<ul style="list-style-type: none"> - Les valeurs de leucocytes, lymphocytes, neutrophiles, plaquettes, NLR, PLR

circulant (ADNtc), ainsi que la relation entre l'ADNtc et le devenir clinique (rechute métastatique).	<ul style="list-style-type: none"> - Le taux de TILs - Le taux d'ADNtc plasmatique - La survenue de la rechute métastatique
Relation entre les différents paramètres issus de la formule sanguine après les traitements et la rechute métastatique de la maladie cancéreuse.	<ul style="list-style-type: none"> - Les valeurs de leucocytes, lymphocytes, neutrophiles, plaquettes, NLR, PLR après les traitements - La survenue de la rechute métastatique

2.6.2. CRITERES D'INCLUSION

Les critères d'inclusion et de non inclusion sont présentés dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 - Critères d'inclusion et de non inclusion de l'essai clinique PERCEPTION

Critères d'inclusion	Critères de non inclusion
Femmes ≥ 18 ans	Prélèvements tumoraux non disponibles
CSTN primitif, non métastatique, histologiquement prouvé	Résultats des bilans sanguins au diagnostic non disponibles
Patiente traitée par chimiothérapie, chirurgie et radiothérapie	Femmes enceintes ou allaitantes, personnes vulnérables, majeurs faisant l'objet d'une mesure de protection légale ou hors d'état d'exprimer leur consentement.
Patiente maîtrisant la langue française	
Patiente affiliée à un régime de sécurité sociale	
Obtention du consentement éclairé, écrit, daté et signé	

2.6.3. DEROULEMENT DE L'ETUDE

Les patientes éligibles se verront proposer de participer dans l'étude à 12 mois après la fin des traitements (**Figure 28**). Après inclusion, les prélèvements tumoraux de la biopsie et de la pièce opératoire seront analysés par deux pathologistes pour déterminer le taux de TILs. D'autres données cliniques et biologiques des patientes auront déjà été recueillies dans la BD des CSTN et seront disponibles pour l'essai PERCEPTION.

Plusieurs bilans sanguins à différents moments de la prise en charge des patientes seront analysés : au moment du diagnostic, avant la chirurgie, avant la radiothérapie et 6 mois après la fin de la radiothérapie. Les patientes incluses dans

l'essai réaliseront en plus un prélèvement sanguin un an après la fin de la radiothérapie (au moment de l'inclusion) et au moment du diagnostic de la première rechute métastatique, le cas échéant. Ces prélèvements serviront aux dosages des éléments figurés du sang et à la quantification de l'ADN tumoral circulant.

La période d'inclusion sera de 3 ans. Au total, 90 patientes participeront à l'étude. Les patientes seront suivies jusqu'à l'apparition de la première rechute métastatique ou jusqu'à 5 ans après l'inclusion si aucune rechute métastatique ne survient.

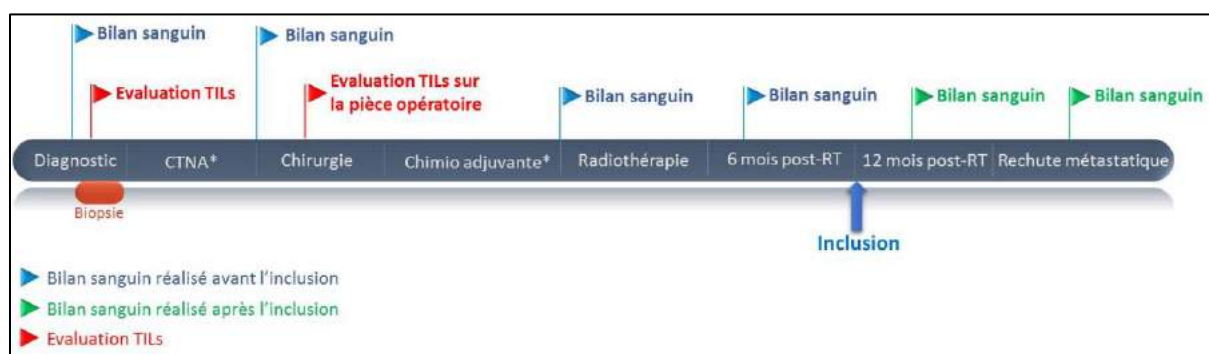


Figure 28 - Schéma de l'étude PERCEPTION (CTNA : chimiothérapie néoadjuvante ; RT : radiothérapie ; * si applicable).

2.6.4. CONSIDERATIONS STATISTIQUES

En utilisant un risque alpha de 5% et une puissance de 80%, nous avons estimé qu'une taille d'échantillon de 90 patientes nous permettrait de mettre en évidence une corrélation entre les TILs et le NLR. Les analyses statistiques seront réalisées avec le logiciel R (R-Project, GNU GPL, <http://cran.r-project.org/>).

2.6.5. ETAT D'AVANCEMENT DE L'ETUDE

L'essai PERCEPTION a été mis en place au CJP le 4 décembre 2019 et la première patiente a été incluse le 11 décembre 2019. Au 16 juillet 2021, 30 patientes ont été incluses dans l'étude. La période d'inclusion sera de 3 ans et au total 90 patientes seront incluses dans cette étude avant la fin de l'année 2022. Le protocole détaillé de l'étude PERCEPTION a été publié le 11 décembre 2020 dans le journal MEDICINE (217) (**Annexe 1**).

2.6.6. RESULTATS ATTENDUS

L'étude PERCEPTION permettra de déterminer si les paramètres issus de la formule sanguine, ainsi que l'ADNtc pourraient prédire la réponse aux traitements,

notamment à la CTNA, ainsi que la survenue de la rechute métastatique. Ces nouveaux paramètres, faciles à obtenir et peu onéreux, pourraient apporter des informations complémentaires aux TILs, et devenir un outil clinique de routine. A terme, il serait possible de proposer des traitements alternatifs et innovants aux patientes atteintes d'un CSTN et présentant un risque élevé de rechute métastatique et/ou de décès.

2.7. CONCLUSION

Le besoin d'identification de biomarqueurs prédictifs et pronostiques dans le CSTN s'avère nécessaire. Les résultats obtenus sur la BD ont permis de confirmer la valeur prédictive et pronostique des TILs. Cependant, leur évaluation n'est pas toujours possible dans la pratique clinique. Le PLR pourrait représenter une autre alternative et nous donner des informations sur la réponse à la CTNA. Des études prospectives sont nécessaires afin de valider ces résultats. Dans cette optique, nous avons mis en place l'essai clinique PERCEPTION.

Contrairement aux TILs, l'évaluation des paramètres sanguins est plus simple, moins chère, moins invasive et réalisable en routine. Les efforts pour identifier des biomarqueurs issus de la formule sanguine doivent être multipliés, afin de les introduire dans la pratique clinique. Des efforts doivent être faits également pour faciliter l'évaluation des TILs, qui restent un biomarqueur fiable dans la prise en charge du CSTN.

PARTIE 3
LA MÉNOPAUSE CHIMIO-INDUITE
L'ÉTUDE MENOCOR

3. MÉNOPAUSE CHIMIO-INDUITE (ETUDE MENOCOR)

La chimiothérapie est un traitement indispensable pour les patientes atteintes d'un cancer du sein agressif, souvent de type triple négatif ou HER2+, et présentant un risque élevé de rechute. Souvent, il s'agit de patientes jeunes, en âge de procréer, chez lesquelles les traitements anti-cancéreux pourraient avoir des effets gonadotoxiques. Au vue de l'augmentation de l'incidence de cancer du sein chez cette population, il est important de pouvoir apporter des informations précises aux femmes en âge de procréer atteintes de cancer du sein concernant la gonadotoxicité éventuelle des traitements.

En effet, la chimiothérapie entraîne une déplétion de la réserve ovarienne, traduite en aménorrhée, pouvant aller jusqu'à une ménopause précoce définitive, dite ménopause chimio-induite (MCI). Il a déjà été montré que la ménopause survenant naturellement est accompagnée de plusieurs symptômes et d'une dégradation de la qualité de vie. Il semble donc pertinent d'étudier les répercussions de la MCI sur les différents aspects de la qualité de vie des femmes, afin de leur proposer des traitements alternatifs et/ou des soins de support.

Dans ce cadre, le CJP a mis en place l'essai clinique MENOCOR : "*Etude de l'impact de la Ménopause Chimio-Induite (MCI) sur la qualité de vie chez les femmes jeunes en âge de procréer et atteintes d'un cancer du sein non métastatique*", dont l'objectif principal est l'évaluation à 2 ans de l'impact de la MCI sur le score fonctionnel du questionnaire de qualité de vie QLQ-C30 chez des femmes jeunes en âge de procréer et atteintes d'un cancer du sein. Il s'agit d'un essai prospectif, interventionnel à risque minime, multicentrique. Trois centres participent au recrutement des patientes : le Centre Jean PERRIN à Clermont-Ferrand, l'Institut de Cancérologie Lucien NEUWIRTH à Saint-Etienne et l'Institut Jean GODINOT à Reims.

Le deuxième axe de mon projet doctoral concernait donc l'étude de la MCI, notamment par la gestion de l'essai MENOCOR. Toutefois, en raison d'un rythme d'inclusion en-deçà des attentes, il n'est pas encore possible d'analyser les données de l'étude. Tout au long de ma thèse, j'ai assuré des missions de chef de projet, d'attaché de

recherche clinique (ARC) et d'ARC moniteur pour l'étude MENOCOR, ce qui m'a permis de voir les différents aspects et métiers de la recherche clinique.

3.1. OBJECTIFS DE L'ETUDE ET CRITERES D'EVALUATION

L'objectif principal de l'essai MENOCOR est l'évaluation à 2 ans de l'impact de la MCI sur le score fonctionnel du questionnaire de qualité de vie QLQ-C30 chez des femmes jeunes en âge de procréer et atteintes d'un cancer du sein. Plusieurs objectifs secondaires vont être analysés. Le **Tableau 16** reprend les différents objectifs et critères d'évaluation de l'étude.

Tableau 16 - Les objectifs et les critères d'évaluation de l'essai MENOCOR

Objectif principal	Critères d'évaluation
Evaluation à 2 ans de l'impact de la MCI sur le score fonctionnel du questionnaire de qualité de vie QLQ-C30 chez des femmes jeunes en âge de procréer, atteintes d'un cancer du sein.	Variation différentielle du score fonctionnel du questionnaire de qualité de vie QLQ-C30 entre l'inclusion et à 2 ans.
Objectifs secondaires	Critères d'évaluation
Evaluation du taux de MCI à l'issue des chimiothérapies	Taux de patientes ménopausées à l'issue des chimiothérapies
Sensibilité et spécificité de l'hormone antimüllérienne (AMH) sanguine dans la prédiction de la MCI	Dosage sanguin de l'AMH à l'inclusion et post-chimiothérapie
Evaluation de la variation des taux de FSH (<i>Follicle Stimulating Hormone</i>) et d'œstradiol avant chimiothérapie et à la fin de la chimiothérapie	Dosages sanguins de la FSH et de l'œstradiol à l'inclusion et post-traitement
Valeur prédictive de l'aménorrhée de 6 mois sur la ménopause à 2 ans	Taux de patientes recouvrant leurs règles après 6 mois d'aménorrhée
Délai d'apparition de l'aménorrhée induite en fonction du type de chimiothérapie	Délai d'apparition de l'aménorrhée induite (méthode Kaplan-Meier) en fonction du type de chimiothérapie
Délai d'apparition de l'aménorrhée induite en	Survenue de la MCI en fonction l'âge

fonction de l'âge	
Variation différentielle du score symptomatique du questionnaire QLQ-C30 à 2 ans selon l'état ménopausique	Score symptomatique du questionnaire de qualité de vie QLQ-C30
Etude longitudinale de la qualité de vie des patientes après le traitement selon le statut ménopausique	Score global de la qualité de vie des patientes à l'inclusion à 1, 2, 3 ans post-inclusion
Impact de la MCI sur les aspects spécifiques de la qualité de vie (anxiété, dépression, image corporelle, activité sportive et qualité du sommeil) après un cancer du sein	Scores par dimension et scores globaux des questionnaires QLQ-BR23 (<i>Quality of life questionnaire, breast cancer</i>), HAD (<i>Hospital anxiety and depression</i>), BIQ (<i>Body image questionnaire</i>), questionnaire de sommeil de Leeds, activité physique Ricci et Gagnon
Comparaison de la survie sans rechute à 3 ans entre les femmes ménopausées à l'issue du traitement et celles non ménopausées	Survie sans rechute après 3 ans de suivi (méthode Kaplan-Meier)
Relation entre les variations de poids et la MCI	Variations entre le poids à l'inclusion et le poids pris à différentes périodes (1, 2, 3 ans post inclusion)
Incidence de la douleur en général	Evaluation de la douleur par EVA (Echelle Visuelle Analogique) et par le questionnaire DN4 (Douleur Neuropathique par le biais de 4 questions).
Incidence des bouffées de chaleur et des signes associés à la MCI	Gradation OMS des bouffées de chaleur Index de Kupperman
Incidence de la MCI sur la fertilité	Nombre de grossesse après la chimiothérapie, Procréation Médicalement Assistée (PMA) et nombre de fausses couches.

3.2. CRITERES D'INCLUSION

Afin de répondre aux objectifs de l'étude, 240 femmes atteintes d'un cancer du sein non métastatique âgées de 18 à 45 ans sans aménorrhée au moment de l'inclusion et recevant une chimiothérapie adjuvante ou néoadjuvante ont été incluses dans l'essai. Les critères d'inclusion et de non inclusion sont détaillés dans le **Tableau 17**.

Tableau 17 - Les critères d'inclusion et de non inclusion de l'essai MENOCCOR

Critères d'inclusion	Critères de non inclusion
Femme âgée ≥ 18 ans et < 45 ans	Patient de sexe masculin
Performance status ≤ 2 (selon les critères de l'OMS)	Cancer au stade métastatique
Patiente sans aménorrhée au moment du diagnostic	Toute tumeur T4 (envahissement cutané, adhérence profonde, cancer du sein inflammatoire)
Patiente atteinte d'un cancer du sein histologiquement prouvé, non métastatique	Patiente ayant subi une castration chirurgicale du type ovariectomie ou hystérectomie
Stades cliniques I, IIA, IIB et IIIA	Patiente atteinte d'endométriose
Fonctions hématologiques, rénales et hépatiques satisfaisantes	Patiente enceinte ou allaitant
Obtention du consentement éclairé écrit, signé et daté	Patiente qui n'utilise pas une contraception efficace
Affiliation à un régime de Sécurité Sociale	Patiente ayant déjà eu une hormonothérapie ou une chimiothérapie
	Patiente ayant déjà pris des analogues de la Gn-RH ou de la LH-RH (castration chimique)
	Patiente dont la mère a été ménopausée précocement sans traitement particulier
	Présence de comorbidités en lien avec la fertilité ou antécédents médicaux en lien avec la fertilité du type insuffisance ovarienne ou encore stérilité
	Anomalies neurologiques ou psychiatriques significatives
	Impossibilité pour la patiente à remplir les questionnaires (barrière de la langue)
	Patiente privée de liberté par décision de justice ou administrative
	Patiente présentant une autre pathologie jugée comme incompatible avec l'entrée de la patiente dans le protocole
	Participation à un autre essai clinique nécessitant la castration chimique ou chirurgicale de la patiente
	Patiente non stable géographiquement dans les 6 mois suivants ou demeurant loin du centre de traitement et par là même rendant difficile son suivi

3.3. SCHEMA DE L'ETUDE

Les patientes incluses réaliseront 9 à 13 visites dans le cadre de l'étude MENOCOR (**Figure 29**). La visite de l'inclusion (V0) aura lieu avant la mise en route du traitement par chimiothérapie. Les patientes compléteront les questionnaires de l'étude et réaliseront un prélèvement sanguin pour le dosage des hormones sexuelles : AMH, FSH et œstradiol. Les patientes recevront ensuite 4 à 8 cycles de chimiothérapie. A l'issue de ce traitement, une visite de fin de traitement (V1) permettra de doser les hormones sexuelles et d'évaluer la qualité de vie des patientes à l'aide des questionnaires de l'étude. Trois visites de suivi auront lieu à 6 mois, 18 mois et 30 mois après la fin du traitement (Visite V2, V3 et V4) et permettront d'évaluer le statut ménopausique et la qualité de vie des patientes.

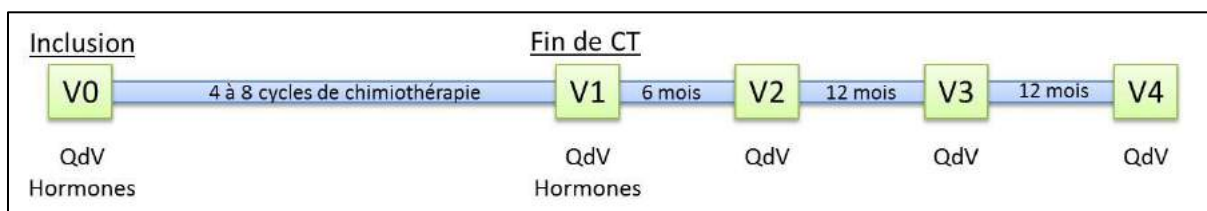


Figure 29 - Schéma de l'étude MENOCOR (CT : chimiothérapie ; QdV : questionnaires de qualité de vie)

3.4. CONSIDERATIONS STATISTIQUES

Pour ce protocole, nous supposons que la MCI a un effet au moins similaire à celui de la ménopause survenue naturellement sur la qualité de vie. Au début du traitement, nous supposons que les patientes vont avoir un score fonctionnel de 80 et au bout de 2 ans, deux groupes devraient être caractérisés :

- Un premier groupe où les patientes ne seront ni en aménorrhée ni en MCI. Elles devraient sensiblement garder leur score fonctionnel constant.
- Un deuxième groupe qui se divise en 2 selon les situations suivantes :
 - les patientes présenteront une aménorrhée suite au traitement et recouvreront leurs menstruations après un laps de temps.
 - les patientes seront en aménorrhée durant au moins 2 ans. Elles seront alors considérées comme ménopausées.

Pour ces deux derniers cas, nous avons émis l'hypothèse que le score fonctionnel de la qualité de vie devrait baisser à 75. Pour montrer une différence de 5 points sur 100

entre le groupe des patientes ménopausées et les autres, nous allons nous placer en situation unilatérale avec risque α à 5%, β à 20% et un écart-type de 15. Au total, 112 patientes seront nécessaires par groupe, soit environ 240 femmes en considérant que certaines d'entre elles sortiront de l'étude.

3.5. ETAT D'AVANCEMENT DE L'ETUDE

L'essai MENOCOR a été mis en place en avril 2014. La dernière patiente a été incluse le 10 juillet 2020. Au total, 124 patientes ont été incluses au CJP, 76 patientes à l'Institut de Cancérologie Lucien NEUWIRTH et 40 patientes à l'Institut Jean GODINOT. Au 16 juillet 2021, 143 patientes avaient terminé le suivi dans l'étude. Il est estimé que les suivis seront terminés pour l'ensemble des patientes en juin 2023 et les analyses finales de l'étude seront réalisées avant la fin de l'année 2023.

3.6. RESULTATS ATTENDUS

A partir des résultats obtenus dans l'étude MENOCOR, il sera possible ultérieurement de déterminer de façon précise les différents impacts de la MCI sur la qualité de vie et donc de proposer des traitements alternatifs et à terme d'améliorer la qualité de vie des patientes.

3.7. MISSIONS CONFIEES

Dans le cadre de l'étude MENOCOR, plusieurs missions m'ont été confiées.

3.7.1. Chefferie de projet

En tant que chef de projet de l'essai, j'ai été chargé de la gestion administrative. Cela concernait notamment la rédaction des procédures pour la gestion de l'essai, la recherche de financement et la gestion du budget, la commande de matériel, la réalisation des modifications substantielles et la soumission aux autorités réglementaires, la gestion des prestataires etc.

3.7.2. Attaché de recherche clinique

En tant qu'attaché de recherche clinique (ARC) j'ai participé à la pré-sélection des patientes éligibles et j'ai assisté les investigateurs lors des inclusions. De plus, j'ai été chargé de l'organisation des différentes visites prévues dans le protocole, le recueil des données et leur saisie dans le CRF de l'étude. Enfin, j'ai réalisé les envois des échantillons

biologiques et j'ai réalisé les corrections des données selon les demandes de l'ARC moniteur.

3.7.3. Attaché de recherche clinique moniteur

J'ai également eu l'opportunité de réaliser le monitoring de l'étude dans les deux centres extérieurs au CJP : à l'Institut de Cancérologie Lucien NEUWIRTH et à l'Institut Jean GODINOT. En tant qu'ARC moniteur, ma mission était de vérifier l'exactitude et l'intégrité des données recueillies dans le CRF en vérifiant les documents sources (dossier médical du patients, questionnaires etc.), ainsi que d'émettre des demandes de correction en cas de données erronées.

PARTIE 4
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le cancer du sein touche principalement les femmes ménopausées, cependant une grande partie des femmes atteintes de cette maladie sont diagnostiquées à un âge relativement jeune. Malgré un système immunitaire très performant, dû en partie à la protection par les hormones sexuelles, ces femmes ont tendance à présenter un cancer du sein agressif, souvent de sous-type moléculaire triple négatif, nécessitant un traitement par chimiothérapie. Ce traitement présente des toxicités importantes pour la fertilité et ne protège pas forcément contre les rechutes métastatiques, qui sont presque toujours fatales pour le CSTN. Dans ce cadre, j'ai mené le projet doctoral présenté dans ce rapport, avec un premier axe sur la recherche de biomarqueurs prédictifs à partir des paramètres de la formule sanguine, dans le CSTN, et un second axe sur l'étude de la ménopause chimio-induite et ses répercussions sur la qualité de vie des femmes jeunes atteintes de cancer du sein.

En conclusion de ces travaux, nous avons pu confirmer la valeur prédictive et pronostique des TILs évalués au diagnostic, dans le CSTN. Cela se rajoute aux nombreuses données de la littérature qui montrent des résultats similaires pour le CSTN. C'est pourquoi, nous pensons qu'il est important d'introduire l'analyse des TILs dans la pratique de routine de la prise en charge du cancer du sein et nous proposons que ce paramètre soit utilisé en clinique pour orienter la décision thérapeutique.

De plus, nous avons constaté que le PLR est un biomarqueur intéressant et utile pour prédire la « bonne réponse » des CSTN à la CTNA standard. Cependant, nos résultats doivent être validés dans des grandes cohortes prospectives. Dans cette optique, notre équipe a créé et mis en place l'étude clinique prospective PERCEPTION, qui cherche à évaluer la valeur prédictive des paramètres sanguins et des TILs, dans le CSTN. Si nos résultats sont confirmés par l'essai PERCEPTION et par d'autres essais thérapeutiques, les paramètres sanguins pourraient se voir utiliser dans la pratique clinique de la prise en charge du CSTN. De plus, si la valeur prédictive et pronostique de ces paramètres sanguins est confirmée, ils pourraient s'avérer très utiles dans les pays en voie de développement, où les moyens pour évaluer systématiquement les TILs ne sont pas suffisants.

Un autre outil qu'il serait intéressant d'utiliser dans la pratique clinique est la classification RCB de la réponse à la CTNA. Nos résultats qui montrent que les petites tumeurs résiduelles post-CTNA ont un bon pronostic, sont en phase avec les données de la littérature montrant un pronostic identique entre les patientes RCB-0 (pCR) et RCB-I (petites tumeurs résiduelles) dans le cancer du sein. La classification RCB pourrait être utilisée comme un critère d'évaluation dans les futurs essais cliniques évaluant les nouvelles thérapies et comme un critère pronostique dans la pratique clinique.

De plus, chez le sujet jeune, le traitement cytotoxique par chimiothérapie pourrait entraîner une ménopause précoce définitive, qui pourrait avoir des nombreuses répercussions sur la qualité de vie. Nos travaux sur l'étude MENOCOR nous permettront dans l'avenir d'apporter des réponses à cette question. Si en effet, la ménopause chimio-induite entraîne une dégradation de la qualité de vie, il serait important de proposer aux patientes des soins de support (sport, soutien psychologique), voire des traitements anti-cancéreux alternatifs et efficaces, mais dépourvus des importantes toxicités de la chimiothérapie.

L'immunothérapie est un traitement innovant en oncologie et pourrait devenir une alternative intéressante à la chimiothérapie. De nombreux essais cliniques sur le cancer du sein sont en cours, mais à ce jour, l'immunothérapie n'est pas utilisée en clinique pour traiter le cancer du sein. C'est pourquoi, il est important de développer nos connaissances sur la relation entre le système immunitaire (local et systémique) avec tous ses composants (cellules immunitaires, plaquettes, protéines) et le cancer et sa progression métastatique. Toutes ces connaissances permettront de développer des traitements efficaces et moins toxiques, ainsi que d'identifier des biomarqueurs prédictifs et pronostiques pour améliorer la prise en charge du cancer du sein.

REFLEXIONS PERSONNELLES

REFLEXIONS PERSONNELLES

Les trois années de mon projet doctoral ont été pour moi une expérience très enrichissante, aussi bien dans le plan professionnel que personnel. Tout d'abord, les thèses en recherche clinique, comme celles développées par le Centre Jean PERRIN et l'Université Clermont Auvergne, sont une formation assez rare en France, mais très instructive et bénéfique. Cette formation m'a permis de découvrir aussi bien la recherche clinique que la recherche translationnelle. En plus, j'ai eu la possibilité de gérer plusieurs essais cliniques, ce qui m'a donné l'occasion de découvrir et d'exercer plusieurs métiers de la recherche clinique (chef de projet, attaché de recherche clinique, ARC moniteur). Mes connaissances et compétences en recherche clinique ont été approfondies par la formation DIU FIEC (Formation des Investigateurs aux Essais Cliniques des Médicaments) qui m'a été proposée par le Centre Jean PERRIN.

De plus, cette expérience m'a permis d'apprendre le travail en équipe, ainsi que de travailler avec des partenaires académiques et industriels. Une étape clé dans mon projet doctoral, qui me sera sans doute très bénéfique pour mon futur projet professionnel, a été la gestion financière des projets, ainsi que la recherche et l'obtention de plusieurs subventions. J'ai eu également la possibilité de gérer des équipes et d'encadrer plusieurs étudiants. Enfin, la thèse m'a aussi aidé à développer ma réflexion scientifique.

En ce qui concerne mon futur projet professionnel, j'envisage de poursuivre mon travail en tant que chef de projet dans la recherche clinique et translationnelle en France. Je serais aussi désireux d'apporter ces connaissances et de contribuer à la création et au développement de la recherche scientifique dans mon pays d'origine, l'Albanie, lors des congrès, des conférences ou des formations.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Travaux de recherche, travaux collaboratifs et communications



ORIGINAL RESEARCH
published: 20 July 2021
doi: 10.3389/fonc.2021.678315



OPEN ACCESS

Edited by:

Takayuki Ueno,
Cancer Institute Hospital of Japanese
Foundation for Cancer Research,
Japan

Reviewed by:

Fabiana Napolitano,
University of Naples Federico II, Italy
Bora Lim,
Baylor College of Medicine,
United States

*Correspondence:

Nina Radosevic-Robin
nina.robin@clermont.uncancer.fr
Catherine Abrial
catherine.abrial@clermont.uncancer.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

[‡]These authors have contributed
equally to this work and
share last authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Breast Cancer,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 09 March 2021

Accepted: 29 June 2021

Published: 20 July 2021

Citation:

Lusho S, Durando X,
Mouret-Reynier M-A,
Kossai M, Lacrampe N,
Molnar I, Penault-Llorca F,
Radosevic-Robin N and Abrial C
(2021) Platelet-to-Lymphocyte Ratio Is
Associated With Favorable Response
to Neoadjuvant Chemotherapy in
Triple Negative Breast Cancer: A
Study on 120 Patients.
Front. Oncol. 11:678315.
doi: 10.3389/fonc.2021.678315

Platelet-to-Lymphocyte Ratio Is Associated With Favorable Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Triple Negative Breast Cancer: A Study on 120 Patients

Sejdi Lusho^{1,2,3}, Xavier Durando^{1,2,3,4}, Marie-Ange Mouret-Reynier^{1,2,3,4},
Myriam Kossai^{1,5†}, Nathalie Lacrampe^{1,5†}, Ioana Molnar^{1,2,3}, Frederique Penault-Llorca¹,
Nina Radosevic-Robin^{1,5*‡} and Catherine Abrial^{1,2,3*‡}

¹ Clermont Auvergne University, INSERM U1240 « Molecular Imaging and Theranostic Strategies », Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France, ² Delegation for Clinical Research and Innovation, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France, ³ Centre for Clinical Investigation, INSERM U501, Clermont-Ferrand, France, ⁴ Department of Medical Oncology, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France, ⁵ Department of Pathology, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France

Introduction: Triple negative breast cancer (TNBC) is highly heterogeneous, but still most of the patients are treated by the anthracycline/taxane-based neoadjuvant therapy (NACT). Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a strong predictive and prognostic biomarker in TNBC, however are not always available. Peripheral blood counts, which reflect the systemic inflammatory/immune status, are easier to obtain than TILs. We investigated whether baseline white cell or platelet counts, as well as, Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) or Platelet-to-Lymphocyte Ratio (PLR) could replace baseline TILs as predictive or prognostic biomarkers in a series of TNBC treated by standard NACT.

Patients and Methods: One hundred twenty patients uniformly treated by FEC/taxane NACT in a tertiary cancer care center were retrospectively analyzed. The presence of pathological complete response (pCR: ypT0/Tis, ypN0) or the presence of pCR and/small residual disease (ypT0/Tis/T1ab, ypN0) were considered as good responses in data analysis. Baseline/pre-NACT blood count, NLR, PLR and TILs were evaluated as predictors of response, distant recurrence rate and distant recurrence-free survival (DRFS).

Results: TILs $\geq 30\%$ and $\geq 1.5\%$ were best predictors of pCR and distant recurrence risk, respectively ($p = 0.007$, $p = 0.012$). However, in this cohort, pCR status was not significantly associated with recurrence. Only the ensemble of patients with pCR and small residual disease had lower recurrence risk and longer survival DRFS ($p = 0.042$, $p = 0.024$, respectively) than the rest of the cohort (larger residual disease). The only parameter which could predict the pCR/small residual disease status was PLR: patients with values lower than 133.25 had significantly higher chance of reaching that status after NACT ($p = 0.045$). However, no direct correlation could be established

between baseline PLR and metastatic recurrence. No correlation either was found between TIL and individual blood counts, or between TILs and NLR or PLR.

Conclusion: In this cohort, TILs retained their pCR predictive value; however PLR was a better predictor of the ensemble of responses which had good outcome in terms of less distant recurrences or longer DRFS (pCR or small residual disease). Thus, baseline PLR is worth further, prospective investigation together with baseline TILs, as it might indicate a good TNBC response to NACT when TILs are unavailable.

Keywords: neoadjuvant chemotherapy, pathologic complete response (pCR), peripheral blood counts, platelet-to-lymphocyte ratio (PLR), triple negative breast cancer (TNBC), tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), distant recurrence

INTRODUCTION

Treatment of triple negative breast cancer (TNBC) is currently one of the biggest challenges in oncology. TNBC is characterized by absence or very low expression of estrogen and progesterone receptor in tumor cells, associated with absence of *ERBB2* gene amplification. TNBC accounts for 10–15% of all breast cancers and tends to be more common among younger women and women carrying a *BRCA1* gene mutation (1, 2). As a group, this breast cancer type has a poorer prognosis compared to other breast cancer molecular subtypes; however triple negative tumors are very heterogeneous in terms of clinical behavior. In spite of this heterogeneity, therapeutic approach to TNBC is still limited to neoadjuvant chemotherapy (NACT), post-NACT surgery and adjuvant radiation therapy as no targeted therapies are available for the early phase of the disease (3). Distant recurrences are frequent within the first 5 years after the initial treatment completion (2) and the median survival of patients with metastatic disease is shorter than 15 months (1, 4, 5). Therefore, it is necessary to identify, as early as possible during the disease course, the biomarkers useful to determine the risk of metastatic relapse for a given patient. This can be used to monitor the disease evolution under NACT and to adapt the therapeutic strategy for high-risk patients.

In TNBC, a pathologic complete response (pCR) to NACT is considered to be the most powerful predictor of good disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) (6, 7), so it is used as the principal surrogate endpoint for patient outcome. However, new data suggest that TNBC patients with small residual tumors after NACT may have similar outcome as patients who reach pCR. Symmans et al. showed excellent prognoses for both TNBC patients with pCR and those having score 1 of the Residual Cancer Burden (RCB), after anthracycline/taxane-based NACT (8, 9). Similar results were obtained by Sharma et al. in TNBC patients treated by neoadjuvant carboplatin-docetaxel (10). Other studies have reported that pCR and near-pCR to NACT were significantly associated with better DFS and OS, and that the presence of a small residual tumor after NACT does not adversely affect TNBC outcome (11). Therefore, the presence of small residual post-NACT disease, together with pCR, has been increasingly considered as a favorable response to NACT and as an endpoint in clinical and translational TNBC trials. In line with

this, biomarkers which could predict such a response of a given TNBC to NACT, are actively sought for.

In the recent years, parameters reflecting the immune response to cancer, either within the tumor site, or in the circulation (blood), have been shown to have predictive or/and prognostic value in oncology. For example, high baseline numbers of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are associated with higher rates of TNBC pCR to NACT (12, 13). Other studies have demonstrated a correlation between high levels of TILs in post-NACT TNBC residual tumors and improved patient survival (14, 15). However, a TIL number is not routinely available to many breast oncologists, for several major reasons: need for a highly skilled pathologist to determine it, breast cancer diagnostic biopsy performed outside the institution which will treat the patient or small biopsy size not representative for TIL assessment although sufficient for breast cancer diagnosis. Moreover, there is a degree of inherent error in TIL number evaluation, especially when TIL quantity is moderate. For all this, either other biomarkers of the patient or/and tumor immune status are needed, easier to assess and more widely implemented in the clinic than TILs, or the efforts to meet the conditions for correct TIL assessment in routine breast oncology practice should be significantly intensified.

Numerous studies have suggested that parameters derived from peripheral blood counts, such as neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR), could predict response to treatment and prognosis in several cancers, including breast cancer. Peripheral white blood counts are indicators of systemic inflammation, which have been shown to have an impact on cancer development and metastatic progression (16). Indeed, high values of NLR and/or PLR have been shown to correlate with poor prognosis in various types of cancer, such as gastric, colorectal, ovarian, pancreatic and lung cancer (17–22).

Several studies have reported that low PLR is associated to higher pCR rates, and better DFS/OS in breast cancer patients treated with NACT (23, 24). Other studies have reported similar results for both PLR and NLR, either separately (16, 25) or combined (6). Interestingly, a relatively small number of such studies have been conducted on TNBC; most of them have shown stronger prognostic value for NLR than for PLR (26, 27).

In this study, we investigated whether the pre-treatment neutrophil, lymphocyte, monocyte or platelet count, as well as

NLR or PLR provides a better information than TILs about TNBC response to NACT or/and distant recurrence-free survival (DRFS), in a retrospective monocentric cohort uniformly treated by a standard-of-care anthracycline/taxane regimen.

PATIENTS AND METHODS

Ethics Statement

Patients were informed of the investigational nature of this study and were given the possibility to oppose to their data being used. All the data analyzed in the scope of this paper came from patients that were not opposed to such use.

The ethics approval of the study was obtained from the Ethical Committee of the Clinical Investigation Centre of the Rhone-Alpes-Auvergne region, Grenoble, France; approval number: IRB 5921.

Patients

Patient data were retrieved from the TNBC database of Centre Jean Perrin. Medical records of the patients carrying an early TNBC treated by NACT from 2008 to 2019 were reviewed and the patients were selected for this study according to three main criteria: (1) histologically proven non-metastatic TNBC at diagnosis, (2) anthracycline/taxane-based NACT only (no other drugs, no neoadjuvant radiotherapy) and (3) available blood counts before NACT, for evaluation of NLR and PLR.

Data Collection

Clinical, histological and biological data of the selected patients have been previously collected and entered, in a pseudonymized fashion, into the TNBC database of Centre Jean Perrin, and were extracted for the present analysis.

Blood Counts

Blood tests were performed on the day before the start of the NACT, in the reference university laboratory serving Centre Jean Perrin. NLR was defined as the ratio between the absolute number of neutrophils (ANC, number of cells $\times 10^{12}/L$) and the absolute number of lymphocytes (ALC, number of cells $\times 10^{12}/L$). PLR was defined as the ratio between the absolute number of platelets (APC, number of platelets $\times 10^{12}/L$) and ALC.

Pathological Assessments

The triple negative status of all biopsies and surgical specimens was determined by immunohistochemistry (IHC). Hormone receptor status was considered negative if 0–9% of tumor cells had nuclear receptor staining (28, 29), in conformity with the institution practices at the Centre Jean Perrin and in France in general. HER2 negativity was defined as score 0 or 1+ on IHC or the absence of *ERBB2* gene amplification by *in situ* hybridization, if the HER2 IHC score was 2 (30).

pCR was defined as the absence of residual invasive tumor in the breast and the lymph nodes (ypT0/Tis ypN0) and the absence of metastases (M0) (31).

Due to a lack of tissue blocks, we were not able to determine the RCB score. Therefore, we defined small residual disease, for purpose of this research, as all ypT1a ypN0 and ypT1b ypN0 responses to NACT. Further, we categorized the patients in two groups. First, small or absent residual disease group (hereafter defined as Group 1) included patients with pCR and small residual disease. The second group (hereafter defined as Group 2) included all other patients: small residual disease with lymph node involvement and large residual disease (ypT1c or greater) regardless of the lymph node status.

The amount of TILs in pre-NACT tumor biopsies was assessed according to recommendations of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer (32). In statistical analysis, TILs were taken into account as a continuous variable and as a binary variable by several prespecified cut-offs (5, 10, 30 and 50%), similarly to the cut-offs reported in the literature (33).

Study Endpoints

The primary goal of this study was to determine whether baseline NLR and/or PLR better predict TNBC response (pCR or [pCR + small residual disease]) to NACT than baseline TILs. The secondary goal was to determine whether baseline NLR and/or PLR have a greater prognostic value than TILs, for patient distant recurrence risk or DRFS.

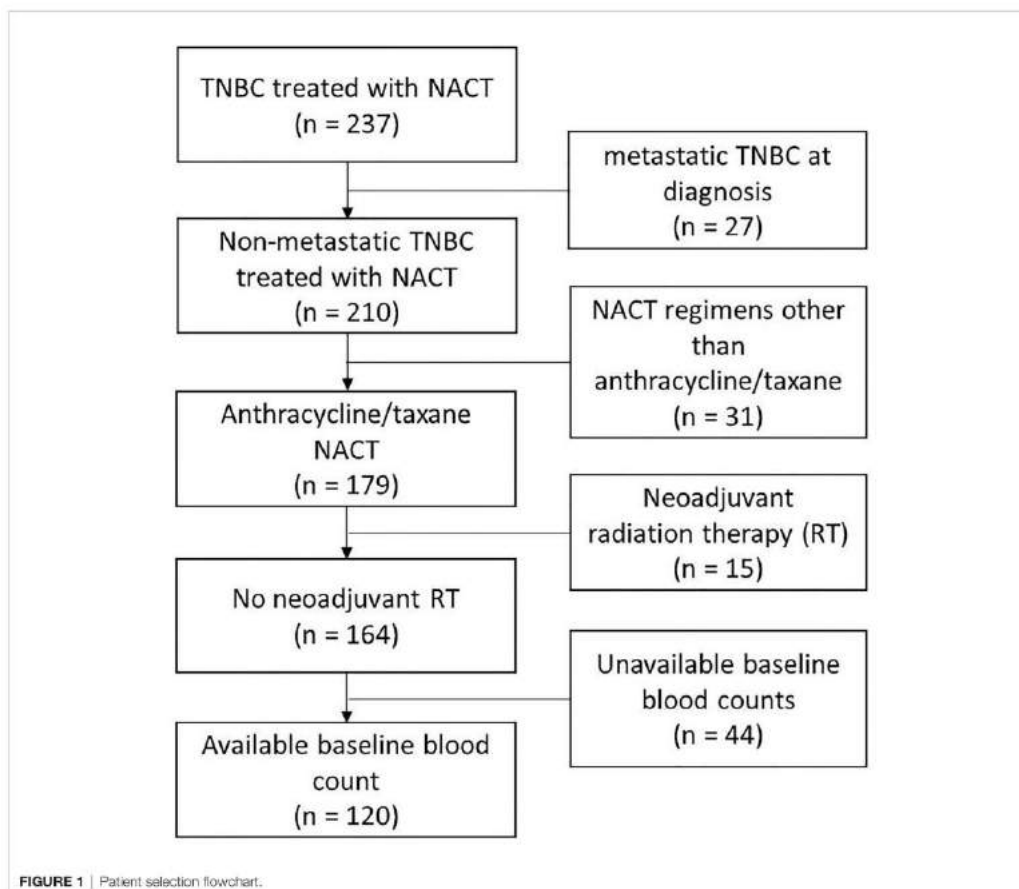
Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the R software, version 3.6.1 (R-Project, GNU GPL, <http://cran.r-project.org/>). The relationship between categorical variables was evaluated by contingency matrices and Fisher's exact test, whereas the Wilcoxon–Mann–Whitney test, Student's test and ROC curves were used to evaluate the relationship between continuous and categorical variables. The relationship between continuous variables and DRFS was evaluated using ROC curves and Cox regression models, Kaplan–Meier survival curves, and log-rank test.

RESULTS

Patient Characteristics

We identified 237 TNBC patients treated with NACT. After excluding the patients with metastatic cancer at diagnosis, the patients treated with chemotherapy regimens other than the anthracycline/taxane-based, the patients treated with neoadjuvant radiation therapy, and the patients without available baseline blood counts, 120 patients were available for further study (Figure 1). Table 1 shows clinical characteristics of those patients and histological features of their tumors. The median follow-up was 46 months [IC 95% (37–55)]. The median age at diagnosis was 56 years (range: 28 to 86). Almost all of the patients presented with infiltrating ductal carcinoma. The majority of the tumors were of intermediate or high histologic grade (40 and 55%, respectively). The prevalent tumor size and lymph node status at diagnosis were T2 (58%) and N0 (58%), respectively.



After NACT, 34 patients (28%) achieved pCR, whereas 24 patients presented with a small residual tumor (16 patients with ypT1a ypN0 and eight patients with ypT1b ypN0). Thus, 58 patients belonged to Group 1 and 62 patients to Group 2.

Out of 120 patients, 24 experienced distant recurrence.

Higher TIL Counts Are Associated With Higher Chance of pCR

TILs were assessed in pre-NACT tumor biopsy in 98 patients. The average and median values of TILs were 17.1 and 10% respectively (range: 1–80%). We observed a slightly significant correlation between baseline TIL levels as a continuous variable and pCR rate. The patients with TILs $\geq 12.5\%$ had a 2-fold higher chance of achieving pCR than patients with TILs $< 12.5\%$ (pCR rate 43.5% vs 21.0%, respectively, $p = 0.029$, **Figure 2**). When TILs were considered as a binary variable (high vs low, according

to different prespecified cut-offs), only the cut-off at 30% showed a statistically significant difference in pCR rate between patient groups. The patients with $\geq 30\%$ TILs had significantly higher pCR rate than the patients with $< 30\%$ TILs (53.9% vs 23.6%, respectively, $p = 0.007$). However, the fraction [pCR + small residual tumors] was not significantly different between patients with baseline TILs ≥ 30 and $< 30\%$. No other TIL cut-off (5, 10 or 50%) was able to demonstrate a significant difference in pCR or [pCR + small residual tumor] rate.

Low Baseline TIL Values Carry a Risk of Distant Recurrence

Out of the 98 patients with available TIL data, 20 patients experienced distant recurrence. The ROC curve approach showed that TIL value of 1.5% could statistically significantly discriminate between patients who developed distant recurrence

TABLE 1 | Patient baseline characteristics (n = 120).

Variable	n (%)
Age (years)	
>50	79 (65.8%)
≤50	41 (34.2%)
Histological type	
Infiltrating ductal carcinoma	98 (81.7%)
Infiltrating and <i>in situ</i> ductal carcinoma	21 (17.5%)
Infiltrating and <i>in situ</i> lobular carcinoma	1 (0.8%)
Histological grade (SBR grade)	
1	4 (3.3%)
2	48 (40%)
3	66 (55%)
Unknown	2 (1.7%)
HR expression	
0%	110 (91.7%)
1–9% (low positive)	10 (8.3%)
Ki67	53.8 ± 26.8 (mean ± SD)
<20%	17 (14.5%)
≥20%	100 (85.5%)
TNM classification	
T1	30 (25%)
T2	70 (58.3%)
T3	13 (10.8%)
T4	5 (4.2%)
Tx	2 (1.7%)
Inflammatory breast cancer	5 (4.2%)
Lymph node status	
N0	69 (57.5%)
N1	35 (29.2%)
N2	4 (3.3%)
N3	3 (2.5%)
Nx	9 (7.5%)
pCR	34 (28.3%)
TNM classification of surgical specimen	
ypT1a ypN0	10 (13.3%)
ypT1b ypN0	8 (6.7%)
ypT0/Tis ypN >0	8 (6.7%)
ypT1a ypN >0	3 (2.5%)
ypT1b ypN >0	3 (2.5%)
ypT1c ypN0	17 (14.2%)
ypT1c ypN >0	6 (5%)
ypT>2 ypN0	7 (5.8%)
ypT>2 ypN >0	18 (15%)

and those who did not. The patients with less than 1.5% TILs in pre-NACT biopsy had almost 3-fold higher risk of developing distant recurrence than patients with ≥1.5% TILs (rates 37.9% vs 13%, respectively, $p = 0.012$, **Figure 3**). No other tested cut-off (5, 10, 30, and 50% TILs) rendered patient groups significantly different in terms of distant recurrence rate. Similarly, no significant difference in DRFS was demonstrated between patient groups, no matter which cut-off was used.

Platelet-to-Lymphocyte Ratio Is the Only Blood Cell Count-Derived Parameter Associated With Response to NACT

There was no statistically significant association between pCR and any of the absolute baseline blood cell counts (neutrophil, lymphocyte, monocyte, platelet count), or blood cell count-derived parameters (NLR, PLR). However, when favorable response was defined as [pCR + small residual disease] the

only parameter significantly associated with that type of response was PLR. PLR was significantly lower in Group 1 (median 124.3, inter quartile range (IQR) 56) than in Group 2 (median 141.2, IQR 55), $p = 0.045$ (**Figure 4**). The ROC curve approach showed that the PLR cut-off at 133.25 best discriminates between favorable and unfavorable response patients (**Figure 5**).

Relationship Between Blood Counts and Distant Recurrence Rate

No association could be established between baseline absolute neutrophil, lymphocytes, monocyte or platelet counts, as well as NLR or PLR, and distant recurrence rate or DRFS in our patient cohort.

Relationship Between Blood Counts and TILs

In our cohort, no association could be found between baseline TIL levels and the baseline blood counts or blood count-derived parameters (NLR and PLR).

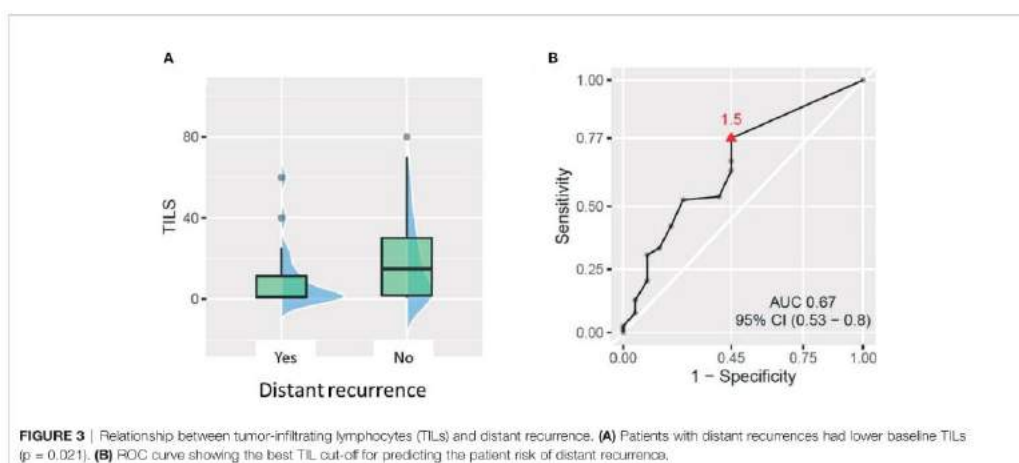
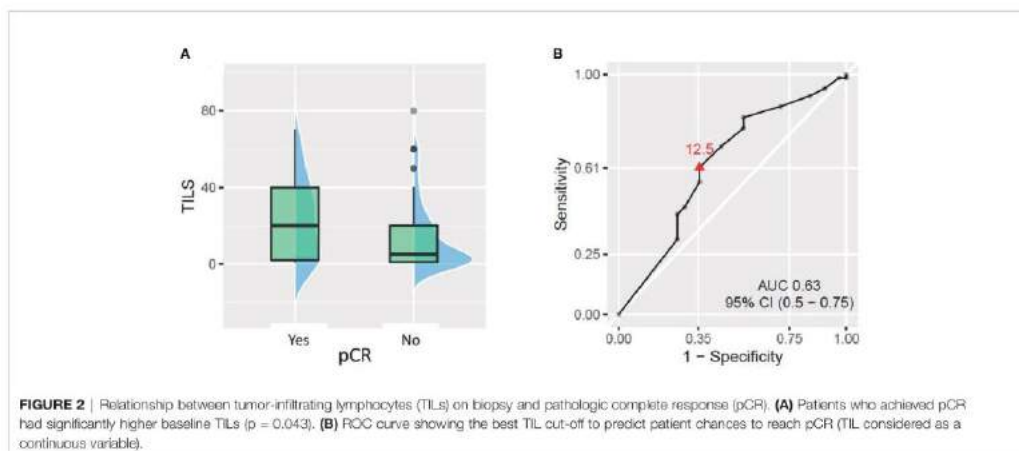
Patient Group With Absent or Small Post-NACT Residual Disease Has Lower Risk of Distant Recurrence

No significant difference in the risk of distant recurrence could be found between pCR and non-pCR patients. However, in our cohort, the ensemble of pCRs and small residual post-NACT tumors (Group 1) was associated with lower risk of distant recurrence ($p = 0.042$). The relative risk of developing a distant recurrence was 2.3 times higher for patients in Group 2 (17 patients with metastases out of 62) than in Group 1 (seven patients with metastases out of 58).

Patient Group With Absent or Small Post-NACT Residual Disease Have Longer DRFS

Patients presenting with small or absent residual disease after NACT also had longer DRFS than the patients with larger residual disease (**Figure 6**). The difference between the two groups remained statistically significant for DRFS at 24, 60 and 96 months after diagnosis ($p = 0.024$, 0.035 and 0.024 respectively). A statistically significant difference in DRFS was also observed at 60 and 96 months, but not at 24 months after surgery ($p = 0.036$, 0.025 and 0.054 respectively) (**Figure 7**).

Taken together, these results show that baseline counts of white blood cells (neutrophils, lymphocytes, monocytes) or platelets, as well as the derived parameters (NLR, PLR) do not have higher pCR predictive value than TILs. Similarly, the evaluated blood parameters were not stronger biomarkers of distant recurrence than TILs. In this TNBC cohort, pCR status was not associated with the risk of recurrence or DRFS. However the group comprised of the patients with pCR and the patients with small residual tumor had lower risk of distant recurrences and better DRFS than the patients with larger residual disease. PLR was the only parameter which significantly differed between these two groups of patients.

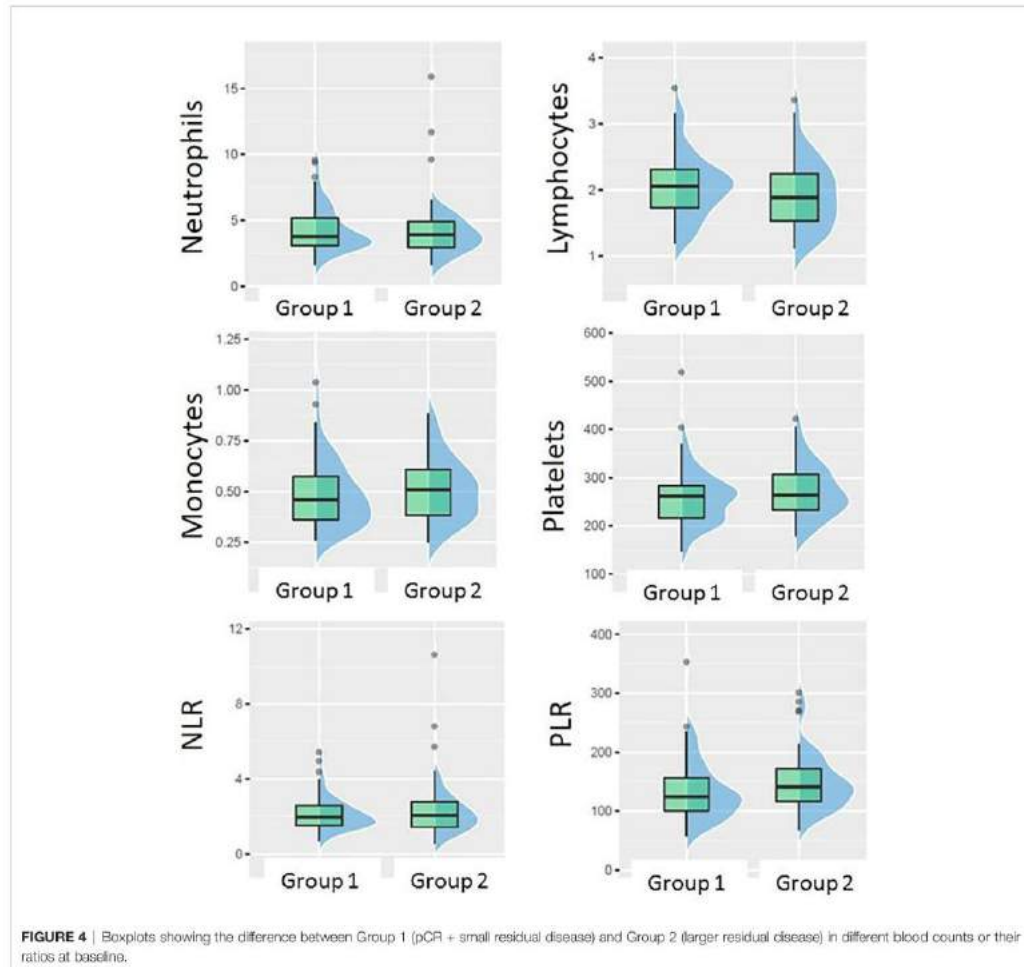


DISCUSSION

In this retrospective study, we first showed that baseline TILs were better biomarkers of TNBC response to standard NACT than any of the blood parameters studied (neither pre-treatment counts of neutrophils, lymphocytes, monocytes or platelets nor the derived parameters, NLR and PLR). This was observed when pCR was used as the criterion of favorable response to NACT. However, when both pCR (ypT0/is ypN0) and the presence of small residual tumor (ypT1a/b ypN0) were considered as favorable response, the only predictive biomarker was a blood cell count-derived one, the PLR.

This loss of predictive value for TILs but gain for PLR has not been reported before. One could argue that the more convincing

findings are the ones obtained when pCR was used as the criterion of good response. pCR is nowadays a universally accepted strong predictor of good outcome of TNBC patients (34), however it has been evoked that persistence of a minimal residual disease in TNBC offers the patients practically identical outcome as the pCR status. Namely, Symmans et al. proposed a histology-based measure of post-NACT breast disease, the Residual Cancer Burden (RCB) and showed that patients with RCB-0 (pCR) and RCB-I (minimal residual disease) have the same 5-year prognosis (9). We could not assess RCB in all our patients due to a lack of tissue material for some of them. For that reason, we arbitrarily defined the status ypT1ab ypN0 as small residual post-NACT disease. In our cohort, the fraction of patients with small residual disease was quite large (20% of the



entire cohort and 28% of the non-pCR patients), out of which only 2 (8.3%) experienced distant recurrence (data not shown). The recurrence rate of the patients left with a small residual tumor was almost 2-fold lower than the recurrence rate of the patients with pCR (5/35, 14.7%, data not shown). Moreover, these characteristics of the pCR patients and the patients with small residual tumors were the same in the subpopulation for which we had baseline TIL data (98 out of 120 pts): 31 pCR patients, out of which three recurred (9.6%), and 19 patients with small residual tumors out of which only one recurred (5.2%) (data not shown). This demonstrates that our cohort actually had many very good responders in the non-pCR group, the patients with the ypT1a/b ypN0 status. The first possible

explanations why TILs lost their predictive power when the good response group was enlarged by the patients with small residual tumors after NACT could be a particular intrinsic sensitivity to NACT of the patients with small residual disease and a development of TILs during NACT. In other words, these patients might have had lower baseline TILs, but increase their number during NACT and present only a small residue (near-pCR status) at the end of the treatment. Indeed, the patients left with small residual disease post-NACT, in our cohort, had significantly lower baseline TILs (median: 2, mean \pm SD: 14 ± 7) than the patients with pCR status post-NACT (median: 20, mean \pm SD: 23 ± 21) ($p < 0.05$, data not shown). The activation of the anti-tumor immune response during NACT is the basis of

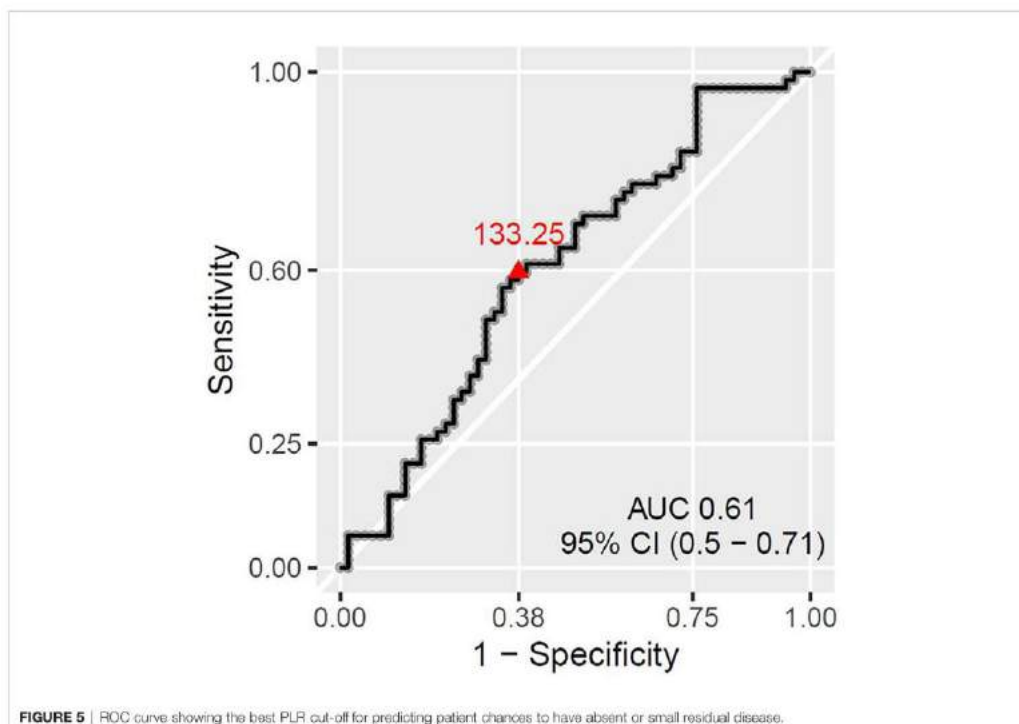


FIGURE 5 | ROC curve showing the best PLR cut-off for predicting patient chances to have absent or small residual disease.

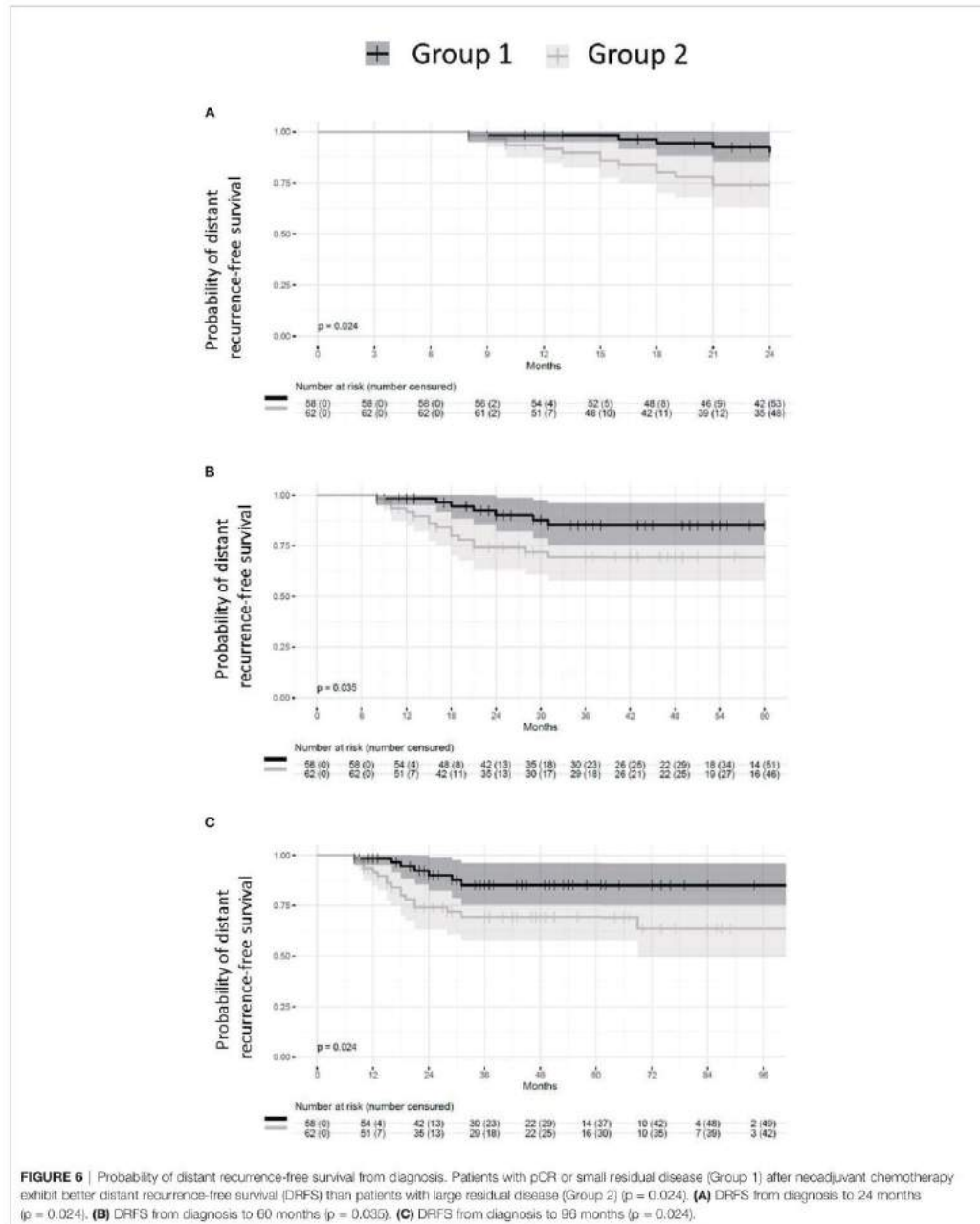
the cancer-immunity cycle and is actually initiated by destruction of the tumor cells sensitive to chemotherapy. This destruction liberates tumor neoantigens and damage-associated molecular pattern (DAMP) signals, thus attracting lymphocytes to the tumor bed. This phenomenon is the major factor responsible for good cancer response to cytotoxic chemotherapy and good long-term prognosis of cancer patients (35). Many studies, starting with the seminal work of Demaria et al. (36), have shown that TILs can develop during NACT (37). In some of them, like the one of Jovanovic et al., the pre-treatment TILs were not predictive at all, however mutations in the DNA damage response-related genes were, which indicates that TNBCs, as well as other cancers, may have an intrinsic sensitivity to DNA-damaging agents, which is behind a good response to DNA-damaging agents and the consequent TIL development (38).

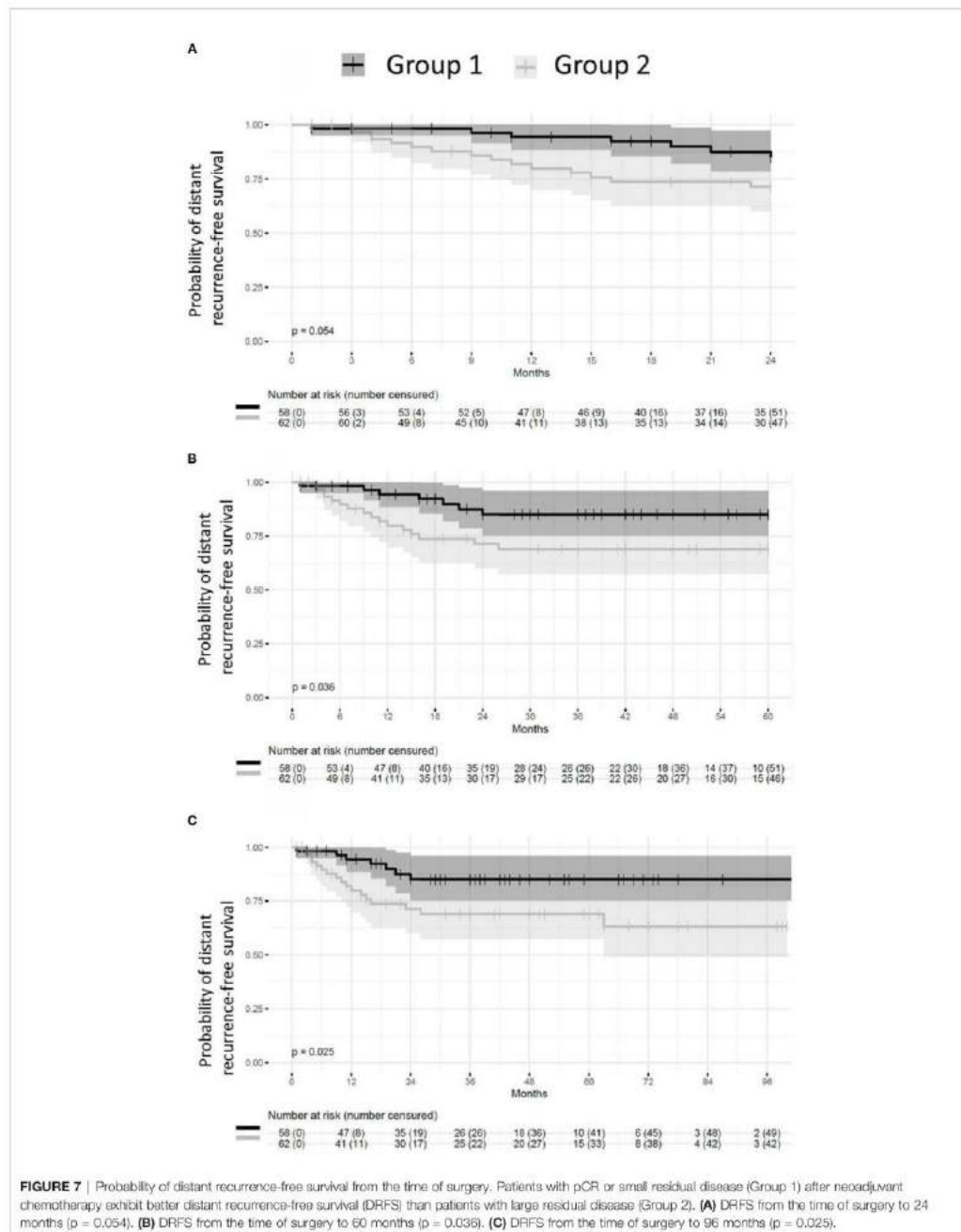
The strong predictive value of TILs in TNBC has been reported in numerous studies, however, in most of them the cut-offs of 50 or 60% best separated good responders (pCR) from the poor ones (non-pCR) (39, 40). In our study, 30% was the best-separating among the predefined cut-offs (5, 10, 30, and 50%), similarly to what was reported by Ono et al. (41). Some of the recent studies showed that lower cut-offs than the ones used for definition of lymphocyte-predominant breast cancer ($\geq 50\%$)

can also statistically significantly separate patient groups according to the pCR rate (42–45).

The presence of TILs in tumors reflects both systemic and local immunity (within the tumor bed). It has not been fully explored yet how the parameters of systemic immunity (white blood cell counts, circulating immune cell subpopulations) correlate with lymphocytic infiltration of cancers, including breast cancer. We did not find a correlation between any baseline blood count or blood count-derived parameter with TILs, which might indicate a distinct regulation of systemic and tumor-site immune response. Previous studies in metastatic breast cancer have shown inferior patient outcomes in patients with general or specific (CD4+) lymphopenia, however data on baseline blood count impact on early TNBC response to therapy and outcome are still scarce (46, 47).

To the best of our knowledge, this is the largest study of NACT-treated TNBC patients which showed predictive value of PLR. Graziano et al. found that a combination of low NLR (≤ 2.42) and low PLR (≤ 104.47) was associated with higher pCR rate in a population of 373 all-type breast cancer patients, including only 62 TNBC patients (6). Cuello-Lopez et al. showed that low pre-treatment PLR (PLR < 150) correlated with higher pCR rate in 272 breast cancer patients, however, no correlation could be found within the 62 TNBC patients of





their cohort (25). Asano et al. observed similar results in a population of 177 breast cancer patients, but only 61 of them had a TNBC (23). In this study, low PLR was defined as lower than 133.25, which is similar to the published data (25, 48). The particularity of our study is that low PLR was not significantly associated with pCR only but with pCR and the presence of small post-NACT residual tumor. As we already explained above, the group of patients with small residual tumors after NACT had an even better outcome than the pCR group, so PLR was the only predictor of the real good response in our cohort. Indeed, and contrary to TILs, PLR was practically identical in the pCR group (median: 125.3, mean \pm SD: 131.5 \pm 46.3) and the small residual disease group (median: 124.3, mean \pm SD: 139.4 \pm 62.4) (data not shown). One explanation for this superiority of PLR over TILs could be that PLR did not change the same way as TILs during NACT. TILs could have developed/increased during NACT, and thus contribute to good response even in the patients with low pre-treatment TIL values. PLR could have had dynamics with less change impacting the response. Studies about PLR dynamics during NACT are scarce; most of them were performed in esophageal or rectal cancer treated by chemoradiation and their results are conflicting. Some studies reported the association of PLR increase and pCR, whereas in others lowering of PLR was favorable for good response (49, 50). To better determine the time point during NACT at which the PLR value is most predictive, as well as to determine the predictive value of PLR change between different time-points during NACT, prospective studies are needed, like the one our group has recently initiated (PERCEPTION trial, NCT04068623) (51).

We also showed prognostic value of TILs, with regards to patient DRFS. The cut-off revealed by the ROC curve approach as the best separator between the patients at risk of distant recurrence and the ones without was quite low (1.5%) and 'artificial' in a certain sense (the value of 1.5% TILs cannot be obtained at TIL assessment). However, it could be viewed as an equivalent of the cut-off zero (presence/absence of TILs), indicating that TNBC totally devoid of TILs (the so-called immune-deserted type) have the worst outcome. One strong reason why the cut-off for TILs as prognosticators was so low in our study is the specificity of the analyzed cohort (selection bias). The fraction of patients with metastatic recurrence was relatively low (20%) and the DRFS/OS relatively long. It may suggest that our cohort was composed of patients with less aggressive TNBCs; for example, almost half of the patients (45%) had tumors of intermediate/low grade, which also could have more indolent clinical course.

Although PLR was well associated with good response to NACT, it was not a prognostic biomarker in our study. As we showed that the ensemble of patients with pCR and small residual disease had better outcome than the rest of the patients, and that PLR was predictive of that type of response, we are hypothesizing that a prognostic value of PLR could be confirmed in a larger study. Corbeau et al. demonstrated that higher PLR is associated to worse RFS and OS in 280 breast cancer patients, 72 of which were TNBC (52). One recent meta-analysis found that higher PLR was associated to worse disease-

free and overall survival in all-type breast cancer. Given that a few TNBC studies were included in this meta-analysis and their small size, no significant results could be established in TNBC (53). Other researchers have shown prognostic value of low PLR (<100–190). For example, Huszno et al. observed that low PLR was associated to improved OS in 86 TNBC patients (48). Studies have also been conducted on metastatic TNBC. Vernieri et al. found that PLR \geq 200 was associated with worse progression-free survival, but not with overall survival in 57 metastatic TNBC patients (54).

Besides their essential roles in hemostasis, platelets also support cancer progression and metastatic development, through the production and excretion of platelet-derived growth factors (PDGF A and B), platelet-derived angiogenesis factors and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), as well as by interacting with interleukins and myeloid metalloproteins (25, 55). PDGF is also produced and excreted by cancer cells, stimulating tumor progression and dissemination in an autocrine manner (16, 56). On the other hand, the release of inflammatory mediators, such IL-1, IL-3 and IL-6 by cancer cells, triggers the differentiation of megakaryocytes into platelets (57), thus fueling a vicious cycle where platelets and tumor cells continuously stimulate each other's growth. Romero-Cordoba et al. showed that PDGF are involved in the regulation of transmembrane proteins, such as CUG domain-containing protein 1 (CDCP1), which is overexpressed in TNBC and stimulates tumor progression (57). An increase in platelets can also lead to disseminated intravascular coagulation, favoring tumor metastasis in different cancers, such as gastric, colon, lung, kidney and prostate (58). We may therefore hypothesize that high PLR reflects a systemic status with more tumor-promoting and less tumor-suppressing action (by platelets and lymphocytes, respectively), allowing metastatic progression of TNBC.

A great majority of the studies assessing circulating blood cells and platelets as predictive or/and prognostic biomarkers in TNBC demonstrated stronger prognostic and predictive value of NLR (26, 27, 48, 59–63). These studies have been carried out either in the adjuvant setting or in less than 90 TNBC patients treated by NACT. In our cohort of 120 TNBC patients, no correlation was observed between the baseline NLR and response to NACT. Likely it is again the selection bias which is behind this finding. It should be noted that 95% of the analysed patients had normal neutrophil, lymphocytes and platelet counts before NACT, so we did not have many extremely high or low values for NLR or PLR, which likely was one of the major reasons for the lack in statistically significant differences between patient groups.

Our study has several limitations. It is a monocentric non-consecutive retrospective study with a relatively small cohort size. The peripheral blood cell counts can be affected by nutrition, medication and underlying medical conditions, such as infection or other diseases. Therefore, the findings of our study need to be validated in larger patient cohorts. In this line, our group has recently started a prospective translational trial, PERCEPTION, whose main objective is evaluation of predictive and prognostic value of blood cell counts, NLR, PLR

and TILs, before, during and after anthracycline/taxane-based NACT in TNBC patients (51).

CONCLUSION

This study confirms the predictive and prognostic value of TILs in TNBC patients treated by standard neoadjuvant chemotherapy; however the study also shows that they are not a perfect predictor of good response. In addition, in real-life situations, TILs might be difficult to assess if a patient is coming to a tertiary cancer care center after being diagnosed outside. In such situations, PLR might be a good orientation about the patient chance to respond well to NACT, either reaching pCR or the status with a small residual disease.

Our findings need to be validated both in larger retrospective studies, on cohorts similar to ours in terms of patient response, as well as in prospective studies. Compared to TILs, a peripheral blood examination is simpler, less expensive and less invasive and thus very suitable for dynamic assessment. Therefore, identifying reliable biomarkers from peripheral blood cell count should be continued, optimized and standardized, in order to introduce these easy-to-assess parameters into clinical practice. As TILs remain to be useful biomarkers in TNBC management, efforts should be intensified to introduce them into the routine practice, including the organizational adjustment which facilitates access to the pre-treatment tumor tissue samples.

REFERENCES

- Dent R, Trudeau M, Pritchard KL, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res* (2007) 13(15):4429–34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* (2010) 363(20):1938–48. doi: 10.1056/NEJMra1001389
- Sharma P, Connolly RM, Roussos Torres ET, Thompson A. Best Foot Forward: Neoadjuvant Systemic Therapy as Standard of Care in Triple-Negative and HER2-Positive Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet* (2020) 40:1–16. doi: 10.1200/EDBK_281381
- Kassam F, Enright K, Dent R, Dranitsaris G, Myers J, Flynn C, et al. Survival Outcomes for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: Implications for Clinical Practice and Trial Design. *Clin Breast Cancer* (2009) 9(1):29–33. doi: 10.3816/CBC.2009.n.005
- Pogoda K, Niwinska A, Murawska M, Pienkowski T. Analysis of Pattern, Time and Risk Factors Influencing Recurrence in Triple-Negative Breast Cancer Patients. *Med Oncol Northwood Lond Engl* (2013) 30(1):388. doi: 10.1007/s12032-012-0388-4
- Graziano V, Grassadonia A, Iezzi L, Vici P, Pizzuti L, Barba M, et al. Combination of Peripheral Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio Is Predictive of Pathological Complete Response After Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Breast Edinb Scotl* (2019) 44:33–8. doi: 10.1016/j.breast.2018.12.014
- Biswas T, Efrid JT, Prasad S, Jindal C, Walker PR. The Survival Benefit of Neoadjuvant Chemotherapy and pCR Among Patients With Advanced Stage Triple Negative Breast Cancer. *Oncotarget* (2017) 8(68):112712–9. doi: 10.18632/oncotarget.22521
- Symmans WF, Wei C, Gould R, Yu X, Zhang Y, Liu M, et al. Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. *J Clin Oncol* (2017) 35(10):1049–60. doi: 10.1200/JCO.2015.63.1010

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

Ethics approval of the study was obtained from the Ethical Committee of the Clinical Investigation Centre of the Rhone-Alpes-Auvergne region, Grenoble, France; approval number: IRB 5921. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NR-R and CA conceived the study and contributed equally to this work. SL and NR-R performed the literature research. NR-R, CA, XD, M-AM-R, FP-L, and SL designed the study. SL collected all the data and wrote the first draft of the manuscript. MK and NL performed the TILs assessment and contributed equally to this work. IM performed the statistical analysis. CA, NR-R, XD, IM, M-AM-R, and FP-L revised the article. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

- Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of Residual Breast Cancer Burden to Predict Survival After Neoadjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol* (2007) 25(28):4414–22. doi: 10.1200/JCO.2007.10.6823
- Sharma P, López-Tarruella S, García-Saenz JA, Khan QJ, Gómez HL, Prat A, et al. Pathological Response and Survival in Triple-Negative Breast Cancer Following Neoadjuvant Carboplatin Plus Docetaxel. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2018) 24(23):5820–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0585
- Penault-Llorca F, Abrial C, Raoufils I, Cayre A, Mouret-Reynier M-A, Leheurteur M, et al. Comparison of the Prognostic Significance of Chevallier and Sataloff's Pathologic Classifications After Neoadjuvant Chemotherapy of Operable Breast Cancer. *Hum Pathol* (2008) 39(8):1221–8. doi: 10.1016/j.humpath.2007.11.019
- Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients With Triple-Negative Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Cancer* (2020) 20:179. doi: 10.1186/s12885-020-6668-z
- Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Hatano T, et al. Prediction of Treatment Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer by Subtype Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Anticancer Res* (2018) 38(4):2311–21. doi: 10.21873/anticancer.12476
- Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* (2019) 37(7):559–69. doi: 10.1200/JCO.18.01010
- Dieci MV, Criscitello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes on Residual Disease After Primary Chemotherapy for Triple-Negative Breast Cancer: A Retrospective Multicenter Study. *Ann Oncol* (2014) 25(3):611–8. doi: 10.1093/annonc/mdt556
- Cho U, Park HS, Im SY, Yoo CY, Jung JH, Suh YJ, et al. Prognostic Value of Systemic Inflammatory Markers and Development of a Nomogram in Breast Cancer. *PLoS One* (2018) 13(7):e0200936. doi: 10.1371/journal.pone.0200936

17. Lee S, Oh SY, Kim SH, Lee JH, Kim MC, Kim KH, et al. Prognostic Significance of Neutrophil Lymphocyte Ratio and Platelet Lymphocyte Ratio in Advanced Gastric Cancer Patients Treated With FOLFOX Chemotherapy. *BMC Cancer* (2013) 13:350. doi: 10.1186/1471-2407-13-350
18. Kwon H-C, Kim SH, Oh SY, Lee S, Lee JH, Choi H-J, et al. Clinical Significance of Preoperative Neutrophil-Lymphocyte Versus Platelet-Lymphocyte Ratio in Patients With Operable Colorectal Cancer. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem* (2012) 17(3):216–22. doi: 10.3109/1354750X.2012.656705
19. Jung MR, Park YK, Jeong O, Seon JW, Ryu SY, Kim DY, et al. Elevated Preoperative Neutrophil to Lymphocyte Ratio Predicts Poor Survival Following Resection in Late Stage Gastric Cancer. *J Surg Oncol* (2011) 104(5):504–10. doi: 10.1002/jso.21986
20. Kemal Y, Yucel I, Ekiz K, Demirag G, Yilmaz B, Tekler F, et al. Elevated Serum Neutrophil to Lymphocyte and Platelet to Lymphocyte Ratios Could be Useful in Lung Cancer Diagnosis. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* (2014) 15(6):2651–4. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.6.2651
21. Chen G, Zhu L, Yang Y, Long Y, Li X, Wang Y. Prognostic Role of Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *Technol Cancer Res Treat* (2018) 17. doi: 10.1177/1533033818791500
22. Smith RA, Bosonnet L, Raraty M, Sutton R, Neoptolemos JP, Campbell F, et al. Preoperative Platelet-Lymphocyte Ratio Is an Independent Significant Prognostic Marker in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am J Surg* (2009) 197(4):466–72. doi: 10.1016/j.amjsurg.2007.12.057
23. Asano Y, Kashiwagi S, Onoda N, Noda S, Kawajiri H, Takashima T, et al. Platelet-Lymphocyte Ratio as a Useful Predictor of the Therapeutic Effect of Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *PLoS One* (2016) 11(7):e0153459. doi: 10.1371/journal.pone.0153459
24. Hu Y, Wang S, Ding N, Li N, Huang J, Xiao Z. Platelet/Lymphocyte Ratio Is Superior to Neutrophil/Lymphocyte Ratio as a Predictor of Chemotherapy Response and Disease-Free Survival in Luminal B-Like (HER2-) Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* (2020) 20(4):e403–9. doi: 10.1016/j.clbc.2020.01.008
25. Cuello-López J, Fidalgo-Zapata A, López-Agudelo L, Vásquez-Trespalacios E. Platelet-To-Lymphocyte Ratio as a Predictive Factor of Complete Pathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *PLoS One* (2018) 13(11):e0207224. doi: 10.1371/journal.pone.0207224
26. Patel DA, Xi J, Luo J, Hassan B, Thomas S, Ma CX, et al. Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio as a Predictor of Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2019) 174(2):443–52. doi: 10.1007/s10549-018-05106-7
27. Lee J, Kim D-M, Lee A. Prognostic Role and Clinical Association of Tumor-Infiltrating Lymphocyte, Programmed Death Ligand-1 Expression With Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Locally Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc* (2019) 51(2):649–63. doi: 10.4143/crt.2018.270
28. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med* (2020) 144(5):545–63. doi: 10.5858/arpa.2019-0904-SA
29. Balaton AL, Coindre JM, Collin F, Ettore F, Fiche M, Jacquemier J, et al. Recommendations for the Immunohistochemistry of the Hormonal Receptors on Paraffin Sections in Breast Cancer. Update 1999. Group for Evaluation of Prognostic Factors Using Immunohistochemistry in Breast Cancer (GEPFICS-ENCLCC). *Ann Pathol* (1999) 19(4):336–43.
30. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med* (2014) 138(2):241–56. doi: 10.5858/arpa.2013-0953-SA
31. Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. "Breast". In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. Cham: Springer International Publishing (2017). p. 589–636. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40618-3_48. doi: 10.1007/978-3-319-40618-3_48
32. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* (2015) 26(2):259–71. doi: 10.1093/annonc/mdl450
33. Beguinot M, Dauplat M-M, Kwiatkowski F, Lebouedec G, Tixier L, Pomel C, et al. Analysis of Tumour-Infiltrating Lymphocytes Reveals Two New Biologically Different Subgroups of Breast Ductal Carcinoma *In Situ*. *BMC Cancer* (2018) 18:129. doi: 10.1186/s12885-018-4013-6
34. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological Complete Response and Long-Term Clinical Benefit in Breast Cancer: The CTNeoBC Pooled Analysis. *Lancet Lond Engl* (2014) 384(9938):164–72. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62422-8
35. Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* (2013) 39(1):1–10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012
36. Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, Yee HT, Oratz R, Formenti SC, et al. Development of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer After Neoadjuvant Paclitaxel Chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2001) 7(10):3025–30.
37. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical Relevance of Host Immunity in Breast Cancer: From TILs to the Clinic. *Nat Rev Clin Oncol* (2016) 13(4):228–41. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.215
38. Jovanovic B, Mayer IA, Mayer EL, Abramson VG, Bardia A, Sanders ME, et al. A Randomized Phase II Neoadjuvant Study of Cisplatin, Paclitaxel With or Without Everolimus in Patients With Stage II/III Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): Responses and Long-Term Outcome Correlated With Increased Frequency of DNA Damage Response Gene Mutations, TNBC Subtype, AR Status, and Ki67. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2017) 23(15):4035–45. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3055
39. Wang K, Xu J, Zhang T, Xue D. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Predict the Response to Chemotherapy and Survival Outcome: A Meta-Analysis. *Oncotarget* (2016) 7(28):44288–98. doi: 10.18632/oncotarget.9988
40. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis in Different Subtypes of Breast Cancer: A Pooled Analysis of 3771 Patients Treated With Neoadjuvant Therapy. *Lancet Oncol* (2018) 19(1):40–50. doi: 10.1016/S1473-2045(17)30904-X
41. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Correlated With Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2012) 132(3):793–805. doi: 10.1007/s10549-011-1554-7
42. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-Associated Lymphocytes as an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* (2010) 28(1):105–13. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7370
43. Ruan M, Tian T, Rao J, Xu X, Yu B, Yang W, et al. Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes to Pathological Complete Response in Neoadjuvant Treated Triple-Negative Breast Cancers. *Diagn Pathol* (2018) 13(1):66. doi: 10.1186/s13000-018-0743-7
44. Russo L, Maltese A, Betancourt L, Romero G, Cialoni D, de la Fuente L, et al. Locally Advanced Breast Cancer: Tumor-Infiltrating Lymphocytes as a Predictive Factor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol* (2019) 45(6):963–8. doi: 10.1016/j.ejso.2019.01.222
45. Dieci MV, Tsvetkova V, Griguolo G, Miglietta F, Tasca G, Giorgi CA, et al. Integration of Tumour Infiltrating Lymphocytes, Programmed Cell-Death Ligand-1, CD8 and FOXP3 in Prognostic Models for Triple-Negative Breast Cancer: Analysis of 244 Stage I-III Patients Treated With Standard Therapy. *Eur J Cancer Oxf Engl* (2020) 136:7–15. doi: 10.1016/j.ejca.2020.05.014
46. Chmel H. Role of Monoclonal Antibody Therapy in the Treatment of Infectious Disease. *Am J Hosp Pharm* (1990) 47(11 Suppl 3):S11–15. doi: 10.1093/ajhp/47.11_Suppl_3.S11
47. Trédan O, Manuel M, Clapissou G, Bachelot T, Chabaud S, Bardin-dit-Couragot C, et al. Patients With Metastatic Breast Cancer Leading to CD4+ T Cell Lymphopenia Have Poor Outcome. *Eur J Cancer Oxf Engl* (2013) 49(7):1673–82. doi: 10.1016/j.ejca.2012.11.028
48. Huszno J, Kolosza Z. Prognostic Value of the Neutrophil-Lymphocyte, Platelet-Lymphocyte and Monocyte-Lymphocyte Ratio in Breast Cancer Patients. *Oncol Lett* (2019) 18(6):6275–83. doi: 10.3892/ol.2019.10966
49. Hyder J, Boggs DH, Hanna A, Suntharalingam M, Chuong MD. Changes in Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios During


- Chemoradiation Predict for Survival and Pathologic Complete Response in Trimodality Esophageal Cancer Patients. *J Gastrointest Oncol* (2016) 7 (2):189–95. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.080
50. Lee JH, Song C, Kang S-B, Lee HS, Lee K-W, Kim J-S. Predicting Pathological Complete Regression With Haematological Markers During Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *Anticancer Res* (2018) 38(12):6905–10. doi: 10.21873/anticancerres.13067
51. Lusho S, Durando X, Bidet Y, Molnar I, Kossai M, Bernadach M, et al. PERCEPTION Trial Protocol. *Med (Baltimore)* (2020) 99(50):e23418. doi: 10.1097/MD.00000000000023418
52. Corbeau I, Thezenas S, Maran-Gonzalez A, Colombo P-E, Jacot W, Guiu S. Inflammatory Blood Markers as Prognostic and Predictive Factors in Early Breast Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancers* (2020) 18:12(9). doi: 10.3390/cancers12092666
53. Guo W, Lu X, Liu Q, Zhang T, Li P, Qiao W, et al. Prognostic Value of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio for Breast Cancer Patients: An Updated Meta-Analysis of 17079 Individuals. *Cancer Med* (2019) 8(9):4135–48. doi: 10.1002/cam4.2281
54. Vernieri C, Mennitto A, Prisciandaro M, Huber V, Milano M, Rinaldi L, et al. The Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios Predict Efficacy of Platinum-Based Chemotherapy in Patients With Metastatic Triple Negative Breast Cancer. *Sci Rep* (2018) 8(1):8703. doi: 10.1038/s41598-018-27075-z
55. Sylman JL, Mitrugno A, Atallah M, Tormoen GW, Shatzel JJ, Tassi Yunga S, et al. The Predictive Value of Inflammation-Related Peripheral Blood Measurements in Cancer Staging and Prognosis. *Front Oncol* (2018) 8:78. doi: 10.3389/fonc.2018.00078
56. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and Cancer. *Nature* (2002) 420 (6917):860–7. doi: 10.1038/nature01322
57. Romero-Cordoba S, Meneghini E, Sant M, Iorio MV, Sfondrini L, Paolini B, et al. Decoding Immune Heterogeneity of Triple Negative Breast Cancer and Its Association With Systemic Inflammation. *Cancers* (2019) 11(7):911. doi: 10.3390/cancers11070911
58. Chen L, Kong X, Yan C, Fang Y, Wang J. The Research Progress on the Prognostic Value of the Common Hematological Parameters in Peripheral Venous Blood in Breast Cancer. *Oncotargets Ther* (2020) 13:1397–412. doi: 10.2147/OTT.S227171
59. Chae S, Kang KM, Kim HJ, Kang E, Park SY, Kim JH, et al. Neutrophil-Lymphocyte Ratio Predicts Response to Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Oncol Tor Ont* (2018) 25(2):e113–9. doi: 10.3747/co.25.3888
60. Bozkurt O, Karaca H, Berk V, Inanc M, Ocak Duran A, Ozaslan E, et al. Predicting the Role of the Pretreatment Neutrophil to Lymphocyte Ratio in the Survival of Early Triple-Negative Breast Cancer Patients. *J BUON Off J Balk Union Oncol* (2015) 20(6):1432–9.
61. Ren K, Yin Y, He F, Shao Y, Wang S. Prognostic Role of Derived Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Surgical Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Manag Res* (2018) 10:4891–8. doi: 10.2147/CMAR.S180695
62. Pistelli M, De Lisa M, Ballatore Z, Caramanti M, Pagliacci A, Battelli N, et al. Pre-Treatment Neutrophil to Lymphocyte Ratio may be a Useful Tool in Predicting Survival in Early Triple Negative Breast Cancer Patients. *BMC Cancer* (2015) 15:195. doi: 10.1186/s12885-015-1204-2
63. Asano Y, Kashiwagi S, Onoda N, Noda S, Kawajiri H, Takashima T, et al. Predictive Value of Neutrophil/Lymphocyte Ratio for Efficacy of Preoperative Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* (2016) 23:1104–10. doi: 10.1245/s10434-015-4934-0

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Lusho, Durando, Mouret-Reymier, Kossai, Lacrampe, Molnar, Penault-Llorca, Radošević-Robin and Abrial. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

PERCEPTION Trial protocol

Comparison of predictive and prognostic capacities of neutrophil, lymphocyte, and platelet counts and tumor-infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer

Sejdi Lusho, PhD^{a,b,c,*} , Xavier Durando, MD, PhD^{a,b,c}, Yannick Bidet, PhD^{a,d}, Ioana Molnar, PhD^{a,b,c}, Myriam Kossai, MD^{a,e}, Maureen Bernadach, MD^{a,b}, Nathalie Lacrampe, MD^{a,e}, Hugo Veysièrre, PhD^{a,b,c}, Mathias Cavaille, MD^{a,f}, Mathilde Gay-Bellile, MD^{a,f}, Nina Radosevic-Robin, MD, PhD^{a,e}, Catherine Abrial, PhD^{a,b,c}

Abstract

Background: Triple negative breast cancer affects 10% to 20% of all women diagnosed with breast cancer. Due to its characteristics, treatment strategies are limited and metastatic recurrences are common in the first 5 years after treatment. However, not all patients affected by this disease develop metastases. Tumor-infiltrating lymphocytes have shown to be reliable predictive biomarkers of treatment response and metastatic recurrences. However, we need to develop simpler and faster ways to predict response to cytotoxic treatment and the possibility of eventual cancer relapse by identifying new biomarkers. Recently, new studies are emerging, suggesting a predictive role of circulating blood cells in different types of cancer. In this study, we will assess the correlation between tumor-infiltrating lymphocytes and different elements of the blood count in patients diagnosed with triple negative breast cancer.

Methods: The main objective of this study is to evaluate the correlation between the peripheral neutrophil-to-lymphocyte ratio and the amount of tumor-infiltrating lymphocytes, assessed in triple negative breast cancer patients at diagnosis. Secondary objectives include evaluation of the correlation between tumor-infiltrating lymphocytes at diagnosis and the baseline absolute neutrophil, lymphocyte, and platelet counts, as well as the platelet-to-lymphocyte ratio. The triple negative breast cancer patients will be enrolled in the PERCEPTION trial during the first year after the treatment completion. Two supplementary blood tests, at 12 months after the end of treatment and at the time of the first metastatic recurrence, will be performed.

Discussion: The discovery of new prognostic and predictive biomarkers is crucial for triple negative breast cancer. We set up the PERCEPTION clinical trial in order to evaluate certain blood counts as early biomarkers and to assess their correlation with tumor-infiltrating lymphocytes. Demonstration of cooperative predictive and/or prognostic capacities of peripheral blood counts and tumor-infiltrating lymphocytes would allow introduction of the former as simple and cheap biomarkers in triple negative breast cancer patient management.

Trial registration: The PERCEPTION study has been registered in the French National Agency of Medical Security registry on the 2nd of July 2019 under the number 2019-A01861-56 and in the ClinicalTrials.org registry under the number NCT04068623.

NRR and CA contributed equally to this work.

This research has not received any specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The trial is managed by the Jean Perrin Centre, in Clermont-Ferrand, France.

The PERCEPTION study will be carried out at the Jean Perrin Centre, in Clermont-Ferrand, FRANCE. The study protocol was approved by the Clermont-Ferrand Validation Committee and the Montpellier Committee for the Protection of Persons. Written, informed consent to participate will be obtained from all participants.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analyzed during the current study.

^a Université Clermont Auvergne, INSERM UMR 1240 «Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques», Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, ^b Délégation Recherche Clinique & Innovation, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert, F-63011 Clermont-Ferrand, ^c Centre d'Investigation Clinique, UMR501, F-63001 Clermont-Ferrand, ^d Centre Jean PERRIN, Laboratoire d'oncologie moléculaire, ^e Centre Jean Perrin, Département d'anatomie et de cytologie pathologiques, ^f Centre Jean Perrin, Département d'oncogénétique, 58 rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand, France.

* Correspondence: Sejdi Lusho, Délégation Recherche Clinique & Innovation, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert, F-63011 Clermont-Ferrand, France (e-mail: sejdi.lusho@clermont.unibancer.fr).

Copyright © 2020 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc.

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License 4.0 (CCBY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article: Lusho S, Durando X, Bidet Y, Molnar I, Kossai M, Bernadach M, Lacrampe N, Veysièrre H, Cavaille M, Gay-Bellile M, Radosevic-Robin N, Abrial C. PERCEPTION Trial protocol: Comparison of predictive and prognostic capacities of neutrophil, lymphocyte and platelet counts and tumor-infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer. *Medicine* 2020;99:50(e23418).

Received: 26 October 2020 / Accepted: 30 October 2020

<http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000023418>

Abbreviations: ALC = absolute lymphocyte count, ANC = absolute neutrophil count, APC = absolute platelet count, ctDNA = circulating tumor DNA, HER2 = Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, NACT = neoadjuvant chemotherapy, NLR = neutrophil-to-lymphocyte ratio, pCR = pathologic complete response, PCR = polymerase chain reaction, PLR = platelet-to-lymphocyte ratio, RFS = recurrence-free survival, RT = radiation therapy, TILs = tumor-infiltrating lymphocytes, TNBC = triple negative breast cancer, WBC = white blood cells count.

Keywords: full blood count, metastatic recurrence, neutrophil-to-lymphocyte ratio, predictive factors, study protocol, triple negative breast cancer, tumor-infiltrating lymphocytes

1. Introduction

Triple negative breast cancer (TNBC) represents 10% to 20% of all breast cancers. Treatment strategies for this type of breast cancer are limited, due to the lack of hormone receptor expression (oestrogen receptors and progesterone receptors) and the absence of amplification for the gene coding for the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) protein, in tumor cells.^[1] As a result, patients diagnosed with TNBC cannot benefit from endocrine therapy or anti-HER2 therapy. Therefore, TNBC has an unfavorable prognosis with a high rate of metastatic recurrence during the first 5 years after treatment.^[2-4] However, not all TNBC patients develop metastatic recurrence and it is therefore crucial to identify biomarkers that would allow determining which patients will eventually relapse.

Several studies have demonstrated that higher amounts of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in the biopsy before treatment are associated with higher rate of pathologic complete response (pCR) to the neoadjuvant chemotherapy (NACT).^[5] Other studies have shown a correlation between the presence of high TIL quantity in the surgical specimen after NACT and a better relapse-free survival, as well as a significantly reduced death rate, in patients suffering from TNBC.^[6,7] For instance, Dieci et al have found that the 5-year overall survival rate for patients with high quantities of TILs in the neoadjuvant chemotherapy setting was 91% and significantly higher than that of patients with low quantities of TILs whose 5-year overall survival rate was 55%.^[6]

The assessment of TIL quantity in a cancer tissue specimen is a semi-quantitative method, which is still not in routine use due to the need for a highly skilled pathologist to perform it, and, also, due to certain level of the inherent error risk. Therefore, reliable quantitative biomarkers that are easy to measure and that could provide additional information to that of TILs or even replace them in predicting treatment response and disease relapse are still lacking.

Various blood cell counts and the ratios between them, such as neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) could be used as predictive biomarkers in several types of cancer, including breast cancer.^[1,8,9] The research conducted by Lee et al in 2019 suggests that low NLR at baseline is associated with a better overall survival in TNBC patients.^[1]

Besides the full blood count, several studies have shown a correlation between the presence of circulating tumor DNA (ctDNA) in the blood and treatment response or even metastatic recurrence.^[10,11] Despite the insufficient data in TNBC, studies have shown that ctDNA is a reliable marker in predicting cancer recurrence, due to its high sensitivity and specificity.^[12,13] Moreover, this circulating biomarker can be obtained and quantified from a simple blood test. Therefore, evaluation of

ctDNA as a predictor of metastatic relapse in TNBC is of great interest and it could provide additional information to that of TILs and/or the circulating blood cell counts.

2. Patients and methods

2.1. Study aim

The aim of this study is to evaluate the correlation between the absolute counts of blood neutrophils, lymphocytes, and platelets, as well as the NLR and PLR, and the amount of TILs assessed on hematoxylin and eosin (H&E)-stained breast tumor tissue sampled before treatment for women with TNBC. Evaluation of this correlation might provide important information whether peripheral blood counts and their ratios could replace TILs in the prediction of TNBC treatment response and metastatic recurrence. Another aim of this study is to assess ctDNA as a biomarker of metastatic cancer recurrence.

2.2. Primary objective and endpoints

The primary objective of the PERCEPTION study is to evaluate the correlation between the amount of TILs found in the biopsy, measured semi-quantitatively as the percentage of tumor stromal area occupied by lymphocytes^[14] and the NLR derived from the absolute blood counts of neutrophils and lymphocytes in TNBC patients, at the time of diagnosis. The primary endpoints are the value of NLR and the amount of TILs at diagnosis (before any treatment). NLR is defined as the ratio of the absolute neutrophil count (ANC) over the absolute lymphocyte count (ALC) ($NLR = ANC/ALC$).

2.3. Secondary objectives and endpoints

Secondary objectives of the present study include:

- Assessment of the correlation between the amount of TILs in the biopsy and the total white blood cell count (WBC), ANC, ALC, absolute platelet count (APC), and PLR routinely assessed in women with TNBC, at diagnosis.
- Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR), at the time of diagnosis, and the response to NACT according to Sataloff.^[15]
- Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR) at the time of diagnosis, and the TIL amount in the post-NACT surgical specimen.
- Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR) and the recurrence-free survival (RFS).
- Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR) before post-NACT surgery and TIL quantity in the surgical specimen post-NACT,

Table 1
Inclusion and exclusion criteria of the PERCEPTION trial.

Inclusion criteria	Exclusion criteria
Female	Unavailable biopsy tumor samples
Age ≥ 18 yr	Unavailable blood test results at the time of diagnosis
Primitive, non-metastatic triple negative breast cancer, diagnosed histologically	Pregnant or breastfeeding women, vulnerable persons, adults under legal protection, or unable to give their consent, according to the L.1121-6 article of the Public Health Code
Treated with chemotherapy, surgery, and radiation therapy	
French language fluency	
Affiliation to social security	
Able to provide a signed informed consent form	

depending on the time between surgery and the last administration of chemotherapy.

- Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR) and the presence of ctDNA.
- Assessment of the correlation between ctDNA and RFS.
- Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR) after cancer treatment and the RFS.

The secondary endpoints include the following:

- The absolute values of total white blood cells, neutrophils, lymphocytes, platelets measured in number of cells $\times 10^{12}/L$ and the PLR at diagnosis. PLR is defined as the ratio of the APC over the ALC (PLR = APC/ALC).
- The values of total white blood cells, neutrophils, lymphocytes, platelets, NLR, and PLR before post-NACT surgery.
- TIL amount in the biopsy before cancer treatment.
- TIL amount in the surgical specimen post-NACT.
- Response to NACT according to the Sataloff classification.
- The period of time between surgery and the last administration of chemotherapy.
- The amount of ctDNA.
- Metastatic recurrence.

2.4. Eligibility criteria

The participants should meet the inclusion criteria in order to be enrolled in the study (see Table 1). Only adult (over 18 years of age) female patients diagnosed for the first time with non-metastatic TNBC will be recruited. The eligible patients must be treated with chemotherapy, surgery, and radiation therapy (RT). The lack of tumor sample from biopsy, necessary for the evaluation of TILs and the lack of blood test results at diagnosis will render the inclusion impossible.

Patient may exit study prematurely following:

- Patient decision
- Investigator decision
- Patient death
- Patient lost to follow-up

2.5. Study design

Eligible patients will be selected out of a local database of TNBC patients and will be recruited during the first year following the end of RT. The data collected before inclusion, such as TILs evaluation at baseline and in the surgical specimen, as well as blood test results at different times (baseline, before surgery, before the start of RT, and 6 months after the end of RT) will also be analyzed. After inclusion in the PERCEPTION trial, patients will undergo 2 interventions. A blood test will be performed 12 months after the end of RT and another blood test will be performed at the time of the first metastatic recurrence, if applicable. WBC, ANC, ALC, APC, NLR, PLR, and ctDNA will be measured from these blood tests. The overall follow-up is 5 years (see Fig. 1).

2.6. Recruitment

Recruitment will be carried out in the Jean Perrin Centre by an oncologist. After checking the inclusion and exclusion criteria, the study will be thoroughly explained to the patient by the oncologist, and a consent form will be signed by both.

The recruitment period will last 3 years, from October 2019 to October 2022; 90 patients are expected to be included. After enrolment completion, the primary objective will be analyzed. The overall follow-up for each patient is 5 years, if no metastatic recurrences occur.



Figure 1. Timeline of the patients' treatment and follow-up. CT = chemotherapy, NACT = neoadjuvant chemotherapy, RT = radiation therapy. Patients are included in the trial 1 year after the end of radiation therapy, as indicated by the blue arrow.

2.7. Data collection and management

Most of the data will be available and will have been collected at the time of enrolment:

- Demographic data (age)
- Initial diagnosis of TNBC (date of diagnosis, histological characteristics of the tumor, hormone receptor and HER2 expression, TNM classification)
- Cancer treatment and response to the treatment
- Clinical characteristics of the tumor in the surgical specimen
- Blood test results at the time of diagnosis, before surgery, before the onset of RT, and 6 months post-RT
- TIL amount in the biopsy and in the surgical specimen

After patient enrolment, blood test results at 12 months post-RT and at the time of the first metastatic recurrence will be collected.

A comparison of the demographic and recurrence data of the recruited patients to those of eligible patients but not included in the study will be performed, to show that the studied population in this trial is no different from the general population of non-metastatic TNBC patients.

The assessment of TIL quantity will be independently performed by 2 breast pathologists. In case of the initial result discordance, the slides will be reviewed by both pathologists under a multi-headed microscope and the consensus will be reached after a concertation.

Tumor DNA mutations will be identified from tumor samples. Then, DNA will be extracted from the blood plasma and will be amplified by polymerase chain reaction (PCR), in order to select the DNA region carrying the mutation identified in the tumor sample and to measure the quantity of circulating tumor DNA.

Data will be collected and entered in the electronic Case Report Form (eCRF) by a Clinical Research Associate (CRA) in charge of the study, under the responsibility of the principal investigator.

2.8. Data confidentiality

Data collected and transmitted to the promoter by the investigators will be anonymized. Study data will not contain any names or other personal identifiers such as addresses. Patients included in the trial will be identified by a code specific to this trial. The investigator will have access to the correspondence table between the patient's last name, first name, date of birth, and the code assigned in the trial.

2.9. Statistical analysis

Given the scarcity of data in the literature concerning the correlation between TILs and NLR, our goal is to recruit as many patients as possible. A sample size of 90 patients would allow us to show an average effect size of 0.3 (with a 0.8 power and a 0.05 alpha risk). According to preliminary studies (not published), the variables present enough variability to allow for the detection of a correlation.

Statistical analysis will be performed with R software (v3.6 or newer, R-Project, GNU GPL, <http://cran.r-project.org/>). Each variable of interest will be expressed by conventional statistical summaries: the quantitative variables will be expressed through the most relevant position indicator (mean, median, quartiles, range) and dispersion indicators (standard deviation, interquartile range), and qualitative variables will be expressed by counts and percentages for each level.

Normality of continuous variables will be investigated and we will perform a description of the dependencies of the pairs of variables, where relevant. For hypothesis testing, alpha risk will be set at the conventional 5%, *P*-value corrections will be made for multiple comparisons, and effect sizes will be systematically specified. If relevant, post-hoc tests and comparisons in subgroups will also be performed for exploratory purposes and with adjustment for multiple testings.

2.10. Main objective analysis

In order to study the dependency relationship between NLR and TILs, we will perform a correlation analysis between these 2 continuous variables (graphical analysis, Spearman correlation coefficient, significance test, confidence interval).

2.11. Secondary objective analysis

- The relationship between the other blood counts and the TILs at different times will be assessed through a correlation analysis as for the main objective.
- The relationship between the absolute blood counts and the derived ratios (NLR, PLR), and the response to NACT will be evaluated by analyses of variance (or Kruskal–Wallis tests) and logistic regressions. A subgroup analysis will be performed based on the length of the period between the last cycle of NACT and surgery. A mixed model will also be considered to account for repeated measures and the time lag between the end of NACT and surgery.
- The relationship between the presence of ctDNA after the end of treatment and the relapse of TNBC will be analyzed by Fisher's exact test. Patients treated with NACT and first-line surgery will be analyzed separately.
- The elements of blood will be assessed as early markers of TNBC relapse using logistic regressions, possibly penalized (the LASSO method). Patients treated with NACT and first-line surgery will be analyzed separately.

3. Quality control

A CRA mandated by the promoter will ensure the proper conduct of the study, data collection, documentation, recording, and report, in accordance with the good clinical practices guidelines and the legal provisions in force.

The respect of the study protocol and procedures therein, and the quality of the collected data (accuracy, missing data, consistency with the source documents) will be regularly reviewed; monitoring reports will ensure traceability.

4. Amendment to the protocol

Changes to the protocol will be qualified as substantial or not. Depending on their nature, they will be the subject of a new review by the French ethical research committee and/or an authorization from the competent authority.

5. Discussion

Identifying new biomarkers that would allow for a quick, inexpensive, and reliable prediction of treatment response and metastatic recurrence of TNBC patients is still an important unsatisfied medical need. Such biomarkers would allow oncologists

to propose alternative treatment and enrolment into clinical trials to the TNBC patients carrying a high risk of resistance to the classical NACT or/and a high risk of metastatic recurrence.

The PERCEPTION clinical trial is designed to verify whether a peripheral blood count or a ratio of peripheral blood counts can provide similar prognostic information as TILs. However, this clinical trial has certain drawbacks. First of all, since it is conducted at a single site, the sample size will be relatively limited. Furthermore, this study will only assess the full blood count and ctDNA as predictors of relapse. Studying other elements, such as circulating proteins would be of great interest in the prediction of TNBC relapse.

In conclusion, the PERCEPTION trial will give us important information about the correlation between NLR and TILs before treatment in TNBC patients and at other time periods. It will allow us to determine if we can further explore the values of blood cells as predictive markers in TNBC, and propose further studies, assessing new biomarkers that could be of great value in the treatment of TNBC.

6. Trial status

As of this day 18 patients have been recruited in the PERCEPTION trial. Recruitment began on 4th of December 2019 and is ongoing, according to version 14 of the protocol of 9th October 2019. Recruitment is expected to be completed in October 2022.

Author contributions

NRR and XD conceived the study and contributed equally to this trial. NRR and SL performed the literature research. All authors designed the study. SL wrote the first draft of the article. CA, NRR, and XD revised the article. All authors read and approved the final manuscript. TILs evaluation will be carried out by MK and NL. Collection of data will be performed by SL. IM will be responsible for the data analysis.

Conceptualization: Xavier Durando, Yannick Bider, Maureen Bernadach, Mathias Cavaillé, Mathilde Gay-Bellile, Nina Radosevic-Robin, Catherine Abrial.

Funding acquisition: Sejdi Lusho, Xavier Durando.

Investigation: Xavier Durando, Myriam Kossai, Maureen Bernadach, Nathalie Lacrampe, Mathias Cavaillé, Mathilde Gay-Bellile, Nina Radosevic-Robin.

Methodology: Sejdi Lusho, Xavier Durando, Ioana Molnar, Maureen Bernadach, Nina Radosevic-Robin, Catherine Abrial.

Project administration: Sejdi Lusho, Hugo Veysiére.

Software: Ioana Molnar.

Supervision: Xavier Durando.

Visualization: Sejdi Lusho.

Writing – original draft: Sejdi Lusho.

Writing – review & editing: Xavier Durando, Ioana Molnar, Nina Radosevic-Robin, Catherine Abrial.

References

- Lee J, Kim D-M, Lee A. Prognostic role and clinical association of tumor-infiltrating lymphocyte, programmed death ligand-1 expression with neutrophil-lymphocyte ratio in locally advanced triple-negative breast cancer. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc* 2019;51:649–63. doi: 10.4143/crt.2018.270.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;13:4429–34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045.
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1938–48. doi: 10.1056/NEJMr1001389.
- Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer Discov* 2019;9:176–98. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1177.
- Loi S, Druhay D, Adams S, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: a pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2019;37:559–69. doi: 10.1200/JCO.18.01010.
- Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol* 2014;25:611–8. doi: 10.1093/annonc/mdt556.
- Luen SJ, Salgado R, Dieci MV, et al. Prognostic implications of residual disease tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden in triple-negative breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2019;30:236–42. doi: 10.1093/annonc/mdy547.
- Orditura M, Galizia G, Diana A, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) for prediction of distant metastasis-free survival (DMFS) in early breast cancer: a propensity score-matched analysis. *ESMO Open* 2016;1:e000038. doi: 10.1136/esmoopen-2016-000038.
- Soyano AE, Dholaria B, Marin-Acevedo JA, et al. Peripheral blood biomarkers correlate with outcomes in advanced non-small cell lung cancer patients treated with anti-PD-1 antibodies. *J Immunother Cancer* 2018;6:129doi: 10.1186/s40425-018-0447-2.
- Coombes RC, Page K, Salari R, et al. Personalized detection of circulating tumor DNA antedates breast cancer metastatic recurrence. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2019;25:4255–63. Published online April 16, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3663.
- Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2014;20:2643–50. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2933.
- Shang M, Chang C, Pei Y, et al. Potential management of circulating tumor DNA as a biomarker in triple-negative breast cancer. *J Cancer* 2018;9:4627–34. doi: 10.7150/jca.28458.
- Butler TM, Boniface CT, Johnson-Camacho K, et al. Circulating tumor DNA dynamics using patient-customized assays are associated with outcome in neoadjuvantly treated breast cancer. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2019;5: doi: 10.1101/mcs.a003772.
- Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015;26:259–71. doi: 10.1093/annonc/mdu450.
- Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, et al. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg* 1995;180:297–306.

Case Report

Sister Mary Joseph Nodules: A Case Report about a Rare Location of Skin Metastasis

Brice Leyrat^{a, b} Maureen Bernadach^{a, c, d, e} Angeline Ginzac^{c, d, e}
Sejdi Lusho^{c, d, e} Xavier Durando^{a, b, c, d, e}

^aDepartment of Medical Oncology, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France; ^bUFR Medicine, University Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France; ^cUniversity Clermont Auvergne, INSERM, U1240 Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France; ^dDivision of Clinical Research, Delegation of Clinical Research and Innovation, Centre de Lutte contre le Cancer, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France; ^eClinical Investigation Centre, UMR501, Clermont-Ferrand, France

Keywords

Umbilical skin metastases · Sister Mary Joseph nodules · Pancreatic adenocarcinoma · Chemotherapy · Oncology

Abstract

Umbilical skin metastases (or Sister Mary Joseph nodules) are rare. Their presence typically indicates the late manifestation of deep-seated abdominopelvic malignancy. They occur mainly in gynecological cancers, and gastrointestinal cancers in men. The most common histology is adenocarcinoma (~75% of cases), but it can also rarely be squamous cell or undifferentiated carcinoma. These metastases can be present at diagnosis or appear at disease recurrence, and are associated with a very poor prognosis with an average survival of 11 months. We report the clinical case of a 58-year-old man with metastatic pancreatic adenocarcinoma and umbilical cutaneous metastasis after receiving first-line chemotherapy. The diagnosis was established upon liver biopsy in July 2019, after the patient presented with a complaint of transfixing abdominal pain. The first-line treatment consisted of six cycles of modified FOLFIRINOX chemotherapy. However, in November 2019, computed tomography (CT) scan showed disease progression. Second-line treatment with gemcitabine (Gemzar®) led to a 16% decrease in target lesions. During the fourth cycle, three periumbilical indurated

The manuscript of this case report has been published as a preprint on ResearchSquare.com. Reference: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-141436/v1>.

Correspondence to:
Sejdi Lusho, sejdi.lusho@clermont.unicancer.fr

nodules appeared. After six cycles, skin infiltration had increased, and the patient reported his abdominal pain had intensified. Reassessment by CT scan showed an increase in both hepatic and peritoneal disease progression. Third-line treatment with FOLFIRI, started on April 15, 2020, could not control the disease, leading to greater induration and subcutaneous infiltration, which were responsible for the increased pain and ultimate death. Umbilical skin metastases are rare, and they are associated with advanced metastatic disease and a very poor prognosis. Cases reporting Sister Mary Joseph nodules are needed to better understand the conditions and mechanisms of their appearance and dissemination.

© 2021 The Author(s).
Published by S. Karger AG, Basel

Introduction

Umbilical skin metastases, also known as Sister Mary Joseph nodules, are rare. They are described in 1–3% of patients with neoplasia of abdominopelvic origin (gynecological or digestive) [1, 2]. Umbilical metastases are most common in gastric cancer (30%), colorectal cancer (25%), and pancreatic cancer (18%) in men, and in ovarian cancer (34%), endometrial cancer (12%), and colorectal cancer (12%) in women. There is a predominance of females who present with these nodules (male to female ratio of 0.69); however, the majority of male cases have digestive etiologies [1, 2]. In 14–33% of cases, the discovery of umbilical metastasis leads to the diagnosis of an unknown neoplasia [3]. In contrast, among those patients with known neoplasia, the umbilical nodules are an early sign of recurrence in about 40% and in about 59% of cases, the umbilical metastases occur after discovery of the primary tumor [3].

They can be present at diagnosis or appear at disease recurrence, and are associated with a very poor prognosis, patients having an average survival of 11 months [4]. Their presence typically indicates the late manifestation of deep-seated abdominopelvic malignancy.

Here, we report an original case of a patient with metastatic pancreatic adenocarcinoma at diagnosis, who developed periumbilical nodules during the course of his disease.

Case Presentation

Diagnosis

A 58-year-old man presented with transfixing abdominal pain on July 17, 2019. A corporeo-caudal lesion of the pancreas, containing the celiac trunk and associated with secondary hepatic lesions, was discovered in July 2019. The patient had no symptoms, signs, or findings prior to the abdominal pain that prompted presentation. Upon hospital admission, the patient underwent a physical examination by an oncologist. Regarding the personal history of past illnesses, the patient had undergone surgery and radiation therapy for a testicular seminoma in 2007.

Laboratory testing was performed and showed that plasma angiotensin-converting enzyme level was elevated (17.3 ng/mL; normal: <5.2 ng/mL) and the carbohydrate antigen 19-9 level was exceedingly elevated (7,329 IU/mL; normal: <27 IU/mL). Liver biopsy confirmed the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma and ruled out the possible recurrence of testicular seminoma. No deleterious mutations were identified in the tumor tissue for the *breast cancer 1/2 (BRCA 1/2)* genes.

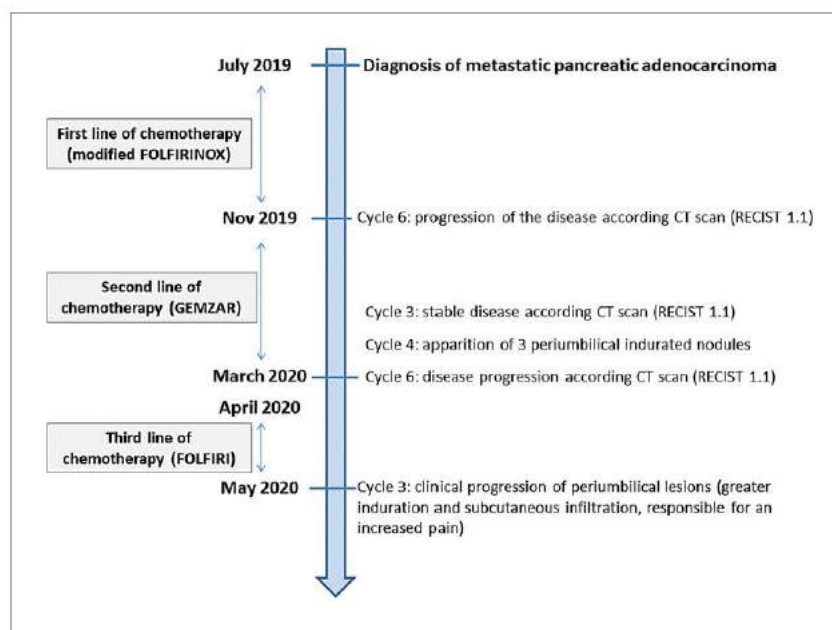


Fig. 1. Treatment timeline.

Computed tomography (CT) scan showed secondary hepatic lesions and peritoneal carcinomatosis. The final diagnosis was corporeo-caudal lesion of the pancreas, containing the celiac trunk and associated with secondary hepatic lesions.

Treatment

Figure 1 illustrates the treatment timeline.

First-Line Treatment

The patient received modified FOLFIRINOX (5-fluorouracil 1,200 mg/m² continuously for 46 h, levofolinate 200 mg/m², oxaliplatin 85 mg/m², irinotecan 150 mg/m²) as first-line chemotherapy [5]. After six cycles, in November 2019, the CT scan revealed an increase in pre-existing liver lesions as well as the appearance of new liver lesions and lesions of peritoneal carcinomatosis, indicating disease progression according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) 1.1. An incidental pulmonary embolism was also discovered.

Second-Line Treatment

Second-line treatment (1,250 mg/m²) was administered on days 1 and 8, and repeated on day 21, adapted to the patient's general condition [6]. After three cycles of treatment, the disease was deemed stable, according to the RECIST 1.1 criteria (i.e., a 16% decrease in target hepatic and pancreatic lesions). However, during the fourth cycle of gemcitabine (Gemzar®; Eli Lilly), three periumbilical indurated nodules appeared, two of which were erythematous

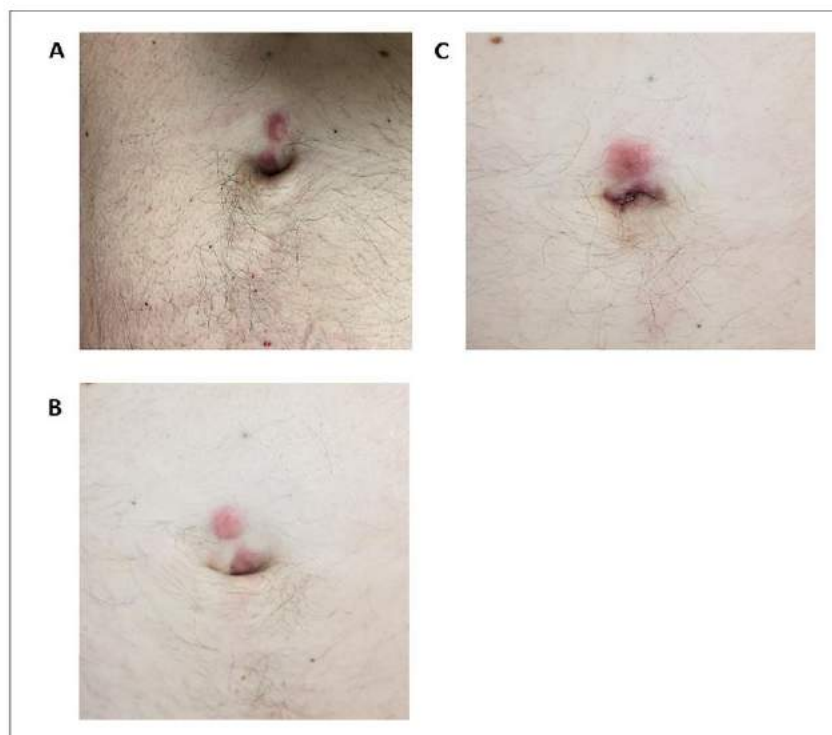


Fig. 2. Evolution of the metastatic periumbilical nodules of pancreatic adenocarcinoma throughout the Gemzar® treatment. **A** Fourth cycle of Gemzar®, started on February 12, 2020. **B** Fifth cycle of Gemzar®, started on March 4, 2020. **C** Sixth cycle of Gemzar®, started on March 25, 2020.

(Fig. 2A). During the fifth cycle of gemcitabine, these nodules remained visible and slightly increased in size (Fig. 2B). After six cycles, skin infiltration and abdominal pain associated with peritoneal carcinomatosis increased. The umbilical orifice showed unfolding of the umbilicus (Fig. 2C). Reassessment by CT scan also showed disease progression (according to RECIST 1.1), both hepatic and peritoneal.

Third-Line Treatment

Third-line treatment with FOLFIRI (5-fluorouracil bolus 400 mg/m² and then 1,200 mg/m² administered continuously for 46 h, irinotecan 180 mg/m²) was started on April 15, 2020 [7]. Under FOLFIRI, there was clinical progression of the periumbilical lesions (Fig. 3); in particular, greater induration and subcutaneous infiltration occurred, which were responsible for increased pain.

Outcome and Follow-Up

Unfortunately, the patient died from his illness on July 11, 2020, after receiving all three lines of treatment.

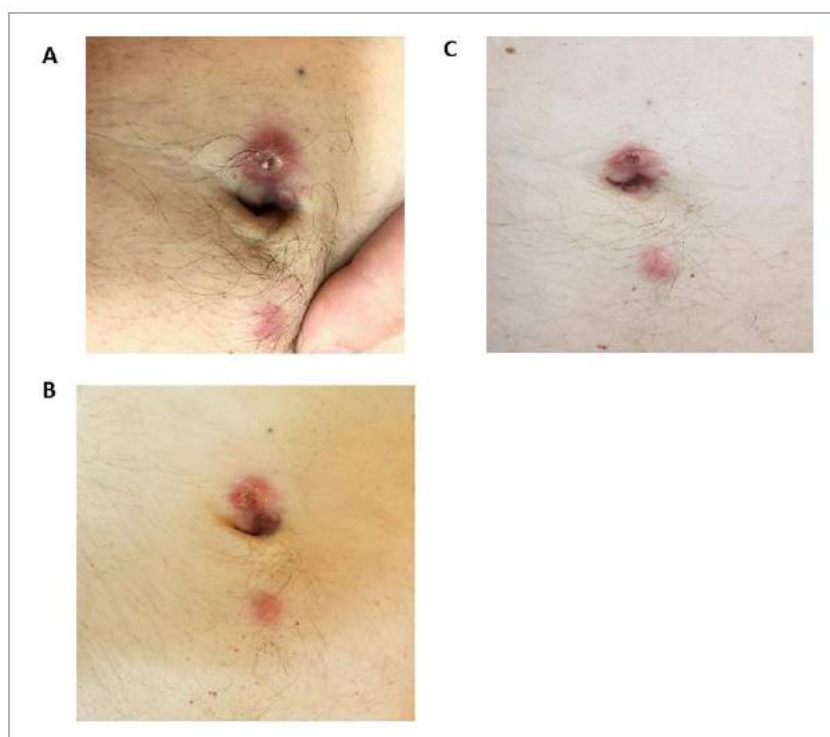


Fig. 3. Evolution of the metastatic periumbilical nodules of pancreatic adenocarcinoma throughout the FOLFIRI treatment. **A** First cycle of FOLFIRI, started on April 15, 2020. **B** Second cycle of FOLFIRI, started on April 28, 2020. **C** Third cycle of FOLFIRI, started on May 12, 2020.

Discussion

The most common histology of umbilical skin metastases is adenocarcinoma (accounting for ~75% of cases), but it can also (rarely) be squamous cell carcinoma or undifferentiated cancer [2]. Because of its vascularization, connections to embryological remnants, and proximity to the peritoneum, the umbilicus is predisposed to being a site of metastasis. As such, several hypotheses have been put forth to explain the underlying pathophysiology [2]. These mainly concern the umbilical region receiving rich arterial vascularization via the inferior epigastric artery and the iliac circumflex artery arising from the external iliac artery and via the superior epigastric artery arising from the internal mammary artery.

Under normal conditions, venous drainage occurs through the internal mammary vein to the axillary vein, and through the lower epigastric vein to the femoral vein. The umbilical region is also drained by a lymphatic system that follows the venous system. It comprises a deep network (involving para-aortic, internal mammary and external iliac nodes) and a superficial network (involving axillary and inguinal nodes) [8]. Lymphatic diffusion appears

to be the most likely mechanism of dissemination, exerting a major impact on prognosis and surgical management [2].

Tumor cells undergo both anterograde and retrograde diffusion, making the umbilicus a point of intersection of the lymphatic network [2, 9]. In addition, the umbilicus is separated from the peritoneum only by a single structure (the fascia transversalis) which may be strengthened by focal thickening of the fascia umbilicalis [2, 8]. This close connection between the umbilicus and anterior peritoneal surface may allow contiguous diffusion. The umbilicus is a scar that appears after birth when the umbilical cord falls off but retains connection to the embryonic remains, including Meckel's diverticulum (a remnant of the vitelline duct), the falciform ligament (from the umbilical veins, connecting the vena cava), the urachus (itself a remnant of the allantoid duct, connecting the umbilicus to the roof of the bladder), and the medial umbilical ligaments (on the sides of the urachus, arising from the umbilical arteries) [2]. Despite the many anatomical connections of the embryonic remnants, they do not seem to play an important role in the dissemination of tumor cells. The presence of an umbilical nodule is usually associated with advanced metastatic disease and, therefore, with a very poor prognosis (average survival of only 11 months) [2, 10].

Conclusion

In this case study, we followed a patient whose umbilical metastases appeared after first-line treatment, showing aggressive disease and a poor prognosis. Their appearance is strongly linked to the progression of peritoneal carcinomatosis, suggesting a mixed mechanism of dissemination, most likely by lymphatic diffusion and promiscuity.

Statement of Ethics

Written informed consent for publication was obtained from the patient on July 1, 2020, 10 days before he died.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding Sources

Not applicable.

Author Contributions

B.L., M.B., and X.D. were the patient's oncologists and were involved in patient's case management. B.L. and M.B. designed and wrote the case report. M.B., S.L., and X.D. were responsible for revising the manuscript for important intellectual content. S.L. and A.G. were responsible for the manuscript layout and submission. All authors read and approved the final manuscript and were involved in the review and editing of the manuscript.

References

- 1 Touraud JP, Lentz N, Dutronc Y, Mercier E, Sagot P, Lambert D. [Umbilical cutaneous metastasis (or Sister Mary Joseph's nodule) disclosing an ovarian adenocarcinoma]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2000;28(10):719–21.
- 2 Dubreuil A, Domp Martin A, Barjot P, Louvet S, Leroy D. Umbilical metastasis or Sister Mary Joseph's nodule. *Int J Dermatol*. 1998;37(1):7–13.
- 3 Galvani VG. Sister Mary Joseph's Nodule. *Ann Intern Med*. 1998;128(5):410.
- 4 De Angeli M, Carosi M, Vizza E, Corrado G. Sister Mary Joseph's nodule in endometrial cancer: A case report and review of the literature. *J Cancer Res Ther*. 2019;15(6):1408–10.
- 5 Conroy T, Paillot B, François E, Bugat R, Jacob JH, Stein U, et al. Irinotecan plus oxaliplatin and leucovorin-modulated fluorouracil in advanced pancreatic cancer--a Groupe Tumeurs Digestives of the Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer study. *J Clin Oncol*. 2005;23(6):1228–36.
- 6 Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*. 1997;15(6):2403–13.
- 7 Neuzillet C, Hentic O, Rousseau B, Rebours V, Bengrine-Lefèvre L, Bonnetain F, et al. FOLFIRI regimen in metastatic pancreatic adenocarcinoma resistant to gemcitabine and platinum-salts. *World J Gastroenterol*. 2012;18(33):4533–41.
- 8 Ching ASC, Lai CW. Sonography of umbilical metastasis (Sister Mary Joseph's nodule): from embryology to imaging. *Abdom Imaging*. 2002;27(6):746–9.
- 9 Glover RP, Waugh JM. The retrograde lymphatic spread of carcinoma of the rectosigmoid region; its influence on surgical procedures. *Surg Gynecol Obstet*. 1946;82:434–48.
- 10 Gabriele R, Conte M, Egidi F, Borghese M. Umbilical metastases: current viewpoint. *World J Surg Oncol*. 2005;3(1):13.



STUDY PROTOCOL

REVISED XENOBREAST Trial: A prospective study of xenografts establishment from surgical specimens of patients with triple negative or luminal b breast cancer [version 3; peer review: 2 approved]

Hugo Veysseyère ¹⁻³, Judith Passildas¹⁻³, Angeline Ginzac ¹⁻³, Sejdi Lusho¹⁻³, Yannick Bidet ^{1,4}, Ioana Molnar ¹⁻³, Maureen Bernadach ^{1-3,5}, Mathias Cavaille^{1,4}, Nina Radosevic-Robin^{1,6}, Xavier Durando ^{1-3,5}

¹Université Clermont Auvergne, INSERM UMR 1240 « Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques », Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, 63011, France

²Division de Recherche Clinique, Délégation Recherche Clinique & Innovation, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, 63011, France

³Centre d'Investigation Clinique, UMR501, F-63001, Clermont-Ferrand, 63011, France

⁴Département d'oncogénétique, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, 63011, France

⁵Département d'Oncologie Médicale, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, 63011, France

⁶Département d'anatomie et de cytologie pathologiques, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, 63011, France

v3 First published: 09 Oct 2020, 9:1219
<https://doi.org/10.12688/f1000research.26873.1>
 Second version: 10 Mar 2021, 9:1219
<https://doi.org/10.12688/f1000research.26873.2>
 Latest published: 21 Jun 2021, 9:1219
<https://doi.org/10.12688/f1000research.26873.3>

Abstract

Introduction: Patient-derived xenografts (PDX) can be used to explore tumour pathophysiology and could be useful to better understand therapeutic response in breast cancer. PDX from mammary tumours are usually made from metastatic tumours. Thus, PDX from primary mammary tumours or after neoadjuvant treatment are still rare. This study aims to assess the feasibility to establish xenografts from tumour samples of patients with triple negative or luminal B breast cancer in neoadjuvant, adjuvant or metastatic setting.

Methods: XENOBREAST is a single-centre and prospective study. This feasibility pilot trial aims to produce xenografts from tumour samples of patients with triple negative or luminal B breast cancer. Patient enrolment is expected to take 3 years: 85 patients will be enrolled and followed for 28 months. Additional blood samples will be taken as part of the study. Surgical specimens from post-NAC surgery, primary surgery or surgical excision of the metastases will be collected to establish PDX. Histomolecular characteristics of the established PDX will be investigated and compared with the initial histomolecular profile of the collected tumours to ensure that they are well-

Open Peer Review

Reviewer Status

	Invited Reviewers	
	1	2
version 3		
(revision)		report
21 Jun 2021		↑
version 2		
(revision)	report	report
10 Mar 2021	↑	
version 1		
09 Oct 2020	report	

1. **Jessica Finlay-Schultz** , University of Colorado Anschutz Medical Campus, Aurora, USA

2. **Fares Al-Ejeh** , QIMR Berghofer Medical

established.

Ethics and dissemination: XENOBREAST belongs to category 2 interventional research on the human person. This study has been approved by the Sud Méditerranée IV – Montpellier ethics committee. It is conducted notably in accordance with the Declaration of Helsinki and General Data Protection Regulation (GDPR). Study data and findings will be published in peer-reviewed medical journals. We also plan to present the study and all data at national congresses and conferences.

Registration: ClinicalTrials.gov ID [NCT04133077](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04133077); registered on October 21, 2019.

Keywords

Patient-Derived Xenografts, Triple negative breast cancer, Luminal B breast cancer, Interventional research

Research Institute, Royal Brisbane Hospital,
Herston, Australia
Qatar Biomedical Research Institute, Doha,
Qatar

Any reports and responses or comments on the article can be found at the end of the article.

Corresponding author: Hugo Veyssi re (Hugo.VEYSSIERE@dermont.unicancer.fr)

Author roles: **Veyssi re H:** Writing – Original Draft Preparation; **Passildas J:** Conceptualization, Methodology, Project Administration; **Ginzac A:** Writing – Review & Editing; **Lusho S:** Conceptualization, Writing – Review & Editing; **Bidet Y:** Conceptualization, Writing – Review & Editing; **Molinar I:** Methodology, Writing – Review & Editing; **Bernadach M:** Investigation, Writing – Review & Editing; **Cavaille M:** Investigation; **Radosevic-Robin N:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing – Review & Editing; **Durando X:** Conceptualization, Investigation, Writing – Review & Editing

Competing interests: No competing interests were disclosed.

Grant information: The author(s) declared that no grants were involved in supporting this work.

Copyright:   2021 Veyssi re H *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article: Veyssi re H, Passildas J, Ginzac A *et al.* **XENOBREAST Trial: A prospective study of xenografts establishment from surgical specimens of patients with triple negative or luminal b breast cancer [version 3; peer review: 2 approved]** F1000Research 2021, **9**:1219 <https://doi.org/10.12688/f1000research.26873.3>

First published: 09 Oct 2020, **9**:1219 <https://doi.org/10.12688/f1000research.26873.1>

REVISED Amendments from Version 2

We added relevant literature in the introduction section. We also cited five new references: Bruna *et al.* (2016) (PMID: 27641504), DeRose *et al.* (2011) (PMID: 22019887), Sachs *et al.* (2018) (PMID: 29224780), Rosenbluth *et al.* (2020) (PMID: 32249764) Ben-David *et al.* (2017) (PMID: 28991255). Some details have been added about the PDXs commercialization and production.

Any further responses from the reviewers can be found at the end of the article

Introduction

Breast cancer can be classified into different molecular subtypes according to gene expression: luminal A (Hormone Receptor positive (HR+)/human epidermal growth factor receptor 2 negative (HER2-), with high HR expression and low levels of the protein Ki-67), luminal B (HR+ either HER2+ or HER2- with high levels of Ki-67 and with low HR expression), HER2-enriched (amplification of *ERBB2* gene, regardless of HR status) and triple-negative (HR-/HER2-). Luminal B and triple-negative tumours account respectively for approximately 20% and 10–15% of all breast cancers¹⁻³. Although rarer than luminal A breast cancers, luminal B and triple-negative tumours are often high-grade tumours with a poorer prognosis¹.

The establishment of patient derived xenografts (PDX) could be useful to discover new treatments and strategies needed in the fight against these subtypes of breast cancer. PDX are derived from tumour tissue in which the tumour architecture and the proportion of cancer and stromal cells are both maintained: advantages not found in cell lines. Therefore, PDX effectively model intra- and inter-tumoural heterogeneity^{1,2}. It is important to note that PDXs have been shown to undergo mouse-specific tumour evolution⁴.

Thus, PDX are used to answer questions such as the contribution of tumour heterogeneity to therapeutic response, patterns of tumour progression during metastatic progression and mechanisms of treatment resistance^{5,6}.

Most of the available PDX or organoids, which have been xenografted into mice and recapitulate the primary tumours, are generated from primary breast cancer tissue^{5,9-11}. In contrast, generated PDX from metastatic tumours remain rarer and may allow the identification of eventual molecular therapeutic targets in metastatic setting.

It is also necessary to have PDX models from primary breast lesions that are resistant to neoadjuvant therapies. Recent prospective studies show that PDX can be obtained from neoadjuvant breast tumours and demonstrate the feasibility of tumour sequencing in these situations^{12,13}. Breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy (NAC) have an increased risk of recurrence. Similarly, high-grade breast tumours treated by primary surgery are very rare, poorly known, and aggressive.

The production of PDX from post-NAC residual breast tumours or from high-grade breast tumours will provide data on the molecular characteristics of these tumours with a high risk of recurrence.

In this study, we want to establish PDX from tumour samples of patients with triple-negative and luminal B breast cancers in neoadjuvant, adjuvant or metastatic settings. In addition, to verify whether or not the PDX obtained is consistent with the original tumour, we will study the tumour exomes of both the PDX and the original tumour. The study of the patients' constitutional exome will serve as the basis for this comparison and is an essential element in the overall somatic analysis.

Methods**Study design**

This is a single-centre prospective trial designed to establish xenografts from surgical specimens of patients with triple negative or luminal B breast cancer in neoadjuvant, adjuvant or metastatic setting. Patient enrolment is expected to take 3 years: 85 patients will be enrolled and followed during 28 months.

Study design is presented in Figure 1. The management of patients in the study may vary depending on the setting: neo-adjuvant, adjuvant or metastatic. In all the settings and as a part of their medical follow-up, patients will go through a pre-operative biological assessment. For patients in metastatic setting, this assessment will be performed before surgical excision of the metastases. Blood samples will be used to perform sequencing of the patient's constitutional exome. At the end of the surgery, one sample of the surgical specimen will be taken to generate PDX and another one to sequence the patient's tumour exome.

Participants can withdraw at any time. Data obtained will be retained with consent, and any reasons given for withdrawal will be recorded.

PDX generation

The patient-derived tumour xenograft platform called XenTech will generate the PDX. All PDX will be established as approved by the ethical authorisation #16569: « Développement d'une collection de modèles de tumeurs humaines greffés sur souris (PDX) ». The different steps of the development of an established xenograft model are summarized in Figure 2. Overall, fresh surgical tissue will be cut into small fragments and grafted into the inter-scapular region or into the renal capsule of 6- to 13-week-old female immunodeficient or severe-combined immuno-deficiency (SCID) or non-obese diabetic SCID mice. The inter-scapular site allows easy access to a well vascularized region with tissue that in female mice is in continuity with the mammary gland. Although the use of extracellular matrix tends to increase xenograft take rates, tumor fragments will be implanted without any matrix. Mice should weigh 18g at 6 months. At the onset of tumour growth, a latency period of 1 to 9 months is expected. The mouse generation with the patient derived graft will be called F0 and the following generations will be numbered F1, F2, and F3. When the tumour

F1000Research 2021, 9:1219 Last updated: 05 JUL 2021

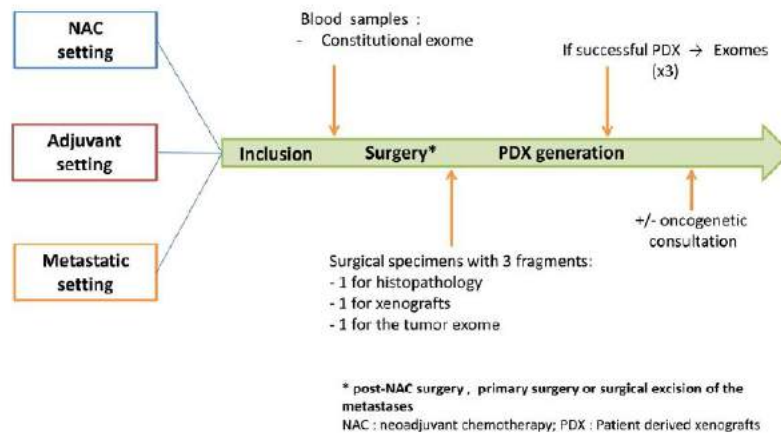


Figure 1. Design of the XENOBREAST study. Adult women with triple negative or luminal B breast cancer in neoadjuvant, adjuvant or metastatic setting will be included. In all the settings, patients will go through a pre-operative biological assessment. Blood samples will be used to perform sequencing of the patient's constitutional exome. At the end of the surgery (post-NAC surgery, primary surgery or surgical excision of the metastases), a sample of the surgical specimen will be taken to generate patient-derived xenografts (PDX) and another one to sequence the patient's tumour exome.

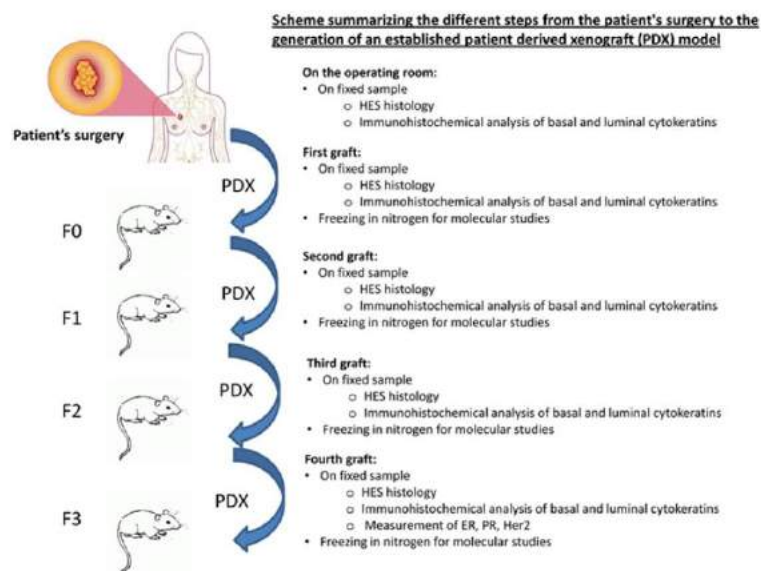


Figure 2. Scheme summarizing the different steps from the patient's surgery to the generation of an established patient-derived xenografts (PDX) model. Fresh surgical tissue will be grafted into the inter-scapular region or into the renal capsule of immunodeficient or severe-combined immuno-deficiency mice. When the tumour volume reaches the ethical limit, the tumour is removed and fragmented as follows: a part is grafted to a new set of mice; a second part is fixed in formalin and embedded in paraffin for histological studies; a third part is frozen in liquid nitrogen for molecular studies; and a last part is frozen in a 10% DMSO solution to generate a viable tissue stock. These steps are repeated for the F1, F2 and F3 generation. A xenograft will be considered as well-established in the third generation (F3).

Page 4 of 15

volume reaches the ethical limit (10% of the total weight of the mouse), the tumour is removed and fragmented as follows: a part is grafted to a new set of mice; a second part is fixed in formalin and embedded in paraffin for histological studies; a third part is frozen in liquid nitrogen for molecular studies; and a last part is frozen in a 10% DMSO solution to generate a viable tissue stock. These steps are repeated for the F1, F2 and F3 generation. A xenograft will be considered as well-established in the third generation (F3). When it is necessary, the animal will be sacrificed by cervical dislocation. For the duration of the study, mice will be housed, by a maximum of 6, in individually ventilated cages. They will be housed in a light-dark cycle with temperature and hygrometry control. The mice will have throughout the duration of the project a complete diet and drinking water. For the ER+ PDX models, mice will receive 17 β -estradiol supplementation in the drinking water, useful for the establishment of these models¹⁴. No estrogen pellets will be implanted.

Sample selection

Inclusion and exclusion criteria are presented in Table 1. Briefly, adult women (18 years or older) with triple-negative or luminal B breast cancer in neoadjuvant, adjuvant or metastatic setting will be included.

Recruitment and consent

Eligible patients will be offered the opportunity to participate in the study by their oncologist or their surgeon. Patients who agree to participate in this study will provide written informed consents (clinical consent and genetic consent) for enrolment. XenTech is allowed to commercialize the PDX generated in this project. The patients will be made aware of that during consent.

Sample size calculation

This feasibility study aims to obtain xenografts from tumours that are either rare or tumours that are resistant to treatment and therefore difficult to establish. We consider that a minimum of five successful grafts would meet this objective. Under these conditions, knowing the graft success rate specific to each histological type and the proportion of luminal B (2/3) and triple-negative breast cancers (1/3), we calculate the number of subjects required so that the lower bound of the 95% confidence interval (CI) of the success rate multiplied by the number of subjects is ≥ 5 .

To obtain a xenograft, the average rate is 30% from triple-negative tumours and 10% from luminal B tumours. Taking these data into account, we will include 2/3 luminal B tumours and 1/3 triple negative tumours: the expected rate of successful

Table 1. Inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria	<ul style="list-style-type: none"> • Female • Age ≥ 18 years • ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performance status ≤ 2 • Women with : <ul style="list-style-type: none"> ◦ high grade metaplastic triple-negative (TN) breast cancer, histologically proven before treatment, receiving neoadjuvant chemotherapy and having, after treatment, a breast residue of at least 15 mm on the specimen. The mammary residue will measure at least 15 mm on the mammography performed at the end of neoadjuvant treatment OR ◦ high grade metaplastic triple-negative (TN) breast cancer, histologically proven before treatment, treated by primary surgery with a tumour size of at least 15 mm on the specimen OR ◦ inflammatory TN breast cancer (T4d), histologically proven prior to treatment, receiving neoadjuvant chemotherapy and having, after treatment, a breast residue of at least 15 mm on the specimen. The mammary residue will measure at least 15 mm on the mammography performed at the end of the neoadjuvant treatment OR ◦ TN breast cancer other than non-metaplastic or inflammatory, histologically proven prior to treatment, receiving neoadjuvant chemotherapy and having, after treatment, a mammary residue of at least 30 mm on the specimen. The mammary residue will measure at least 15 mm on the mammography performed at the end of the neoadjuvant treatment OR ◦ Luminal B breast cancer, histologically proven prior to treatment, receiving neoadjuvant chemotherapy and having, after treatment, a mammary residue of at least 30 mm on the specimen. The mammary residue will measure at least 15 mm on the mammography performed at the end of the neoadjuvant treatment OR ◦ Metastatic TN or luminal B breast cancer, histologically proven at diagnosis, with an operable metastasis and having after chemotherapy a residue of at least 10 mm on the surgical specimen. Residual metastasis will measure at least 15 mm on imaging. • Patients in a metastatic situation can be included regardless of the therapeutic line • Affiliation to social security • Signature of the participation consent of the study
Exclusion criteria	<ul style="list-style-type: none"> • Pregnant woman • Patient deprived of liberty by court or administration decision • In neoadjuvant situation: neoadjuvant treatment by radiotherapy or hormone therapy • Refusal to participate to the study

xenografts will be approximately 17%. The number of patients needed to be included is therefore at least 65: lower bound of the CI-95% of 17% for 65 subjects = 8% or 5 patients ($8\% \times 65 = 5.2$).

Since for some patients the tumour will be of sufficient size for imaging, but of insufficient size in the operating room, we consider that this number should be increased by 30%, to a total number of 85 patients.

Study objectives and data collections

The primary objective of the XENOBREAST trial is to establish xenografts from tumour samples of patients with triple negative or luminal B breast cancer in neoadjuvant, adjuvant or metastatic setting. Furthermore, the study aims to investigate histomolecular characteristics of the established PDX and to compare these characteristics with the initial histomolecular profile of the collected tumours.

Data collected are the patient's age (month and year of birth), pathology, treatments received, response to treatments, date and nature of surgery (primary tumour, metastasis), data concerning exomes (constitutional and tumour), as well as histomolecular profiles of the initial tumour and of the different xenograft generations. To define these histomolecular profiles we will quantify the expression of the oestrogen, progesterone and androgen receptors by immunohistochemistry, the amplification status of the *ERBB2* gene, and the fraction of tumour cells expressing Ki67. Finally, tumours will be classified into molecular classes according to the above-mentioned data: luminal A, luminal B, HER2-enriched or triple negative.

Data collected and transmitted to the sponsor of the study by the investigators will be pseudonymized. Study data will not contain any names or other personal identifiers such as addresses. Patients included in the trial will be identified by a code specific to this trial. The investigator will have access to the correspondence table between the patient's last name, first name, date of birth and the code assigned in the trial.

Statistical analysis

Primary analysis. The main outcome of this feasibility trial is the number of successful xenografts obtained, a xenograft being considered successful when it reaches the F3 generation and its molecular subtype defined by immunohistochemistry has remained identical to the original tumour. The percentage of tumours yielding a successful xenograft will also be calculated, along with a 95% confidence interval. The feasibility will be considered acceptable if at least five successful transplants are obtained.

Secondary analysis. A diversity analysis of genomic data from the tumour exomes and the constitutional exome will be performed. Differential analyses using bioinformatics tools adapted to these data could be envisaged if the number of patients allows it. We will describe in detail the collected

tumours (description of the population, histomolecular profile, anatomopathological data, etc.). Qualitative characteristics will be described using their number and frequency, and quantitative characteristics (age at diagnosis, tumour size, etc.) using standard distribution parameters: mean, median, standard deviation, extremes, normality.

The characteristics of the tumours will also be described according to whether or not a xenograft was successful. These characteristics will also be compared, if the sample sizes allow it, using Fisher's exact test, and Welch's t-test or the non-parametric Mann-Whitney U-test if needed. All tests will be two-sided and the statistical significance threshold will be generally set at 0.05 except in case of differential analyses on the exome data where multiple testing corrections will be applied.

Ethical considerations

The XENOBREAST trial has been approved by an ethics committee (Sud Méditerranée IV – Montpellier) on April 2020 (Reference: 20 03 02 and ID-RCB number: 2020-A00398-31). It is conducted notably in accordance with the Declaration of Helsinki and General Data Protection Regulation (GDPR).

Study data and finding will be published in peer-reviewed medical journals. We plan to present the study and all data at national congresses and conferences.

Trial status

Participant recruitment is expected to begin in October 2020 and to finish in October 2023. The approved protocol is version 02, 24/03/2020.

Conclusion

The XENOBREAST study a feasibility pilot trial that will allow us to estimate the success rate of xenografts and to estimate PDX drift by comparing the histomolecular profile of the PDX to that of the tumour. In perspective, the generation of PDX from rare and chemo-resistant tumours would allow for testing new treatments before their administration *in vivo*. In the long term, the establishment of PDX from primary mammary tumours or after neoadjuvant treatment would allow a better understanding of the therapeutic response. Moreover, it could be a great model to explore tumour evolution patterns during metastatic progression and to observe tumour resistance mechanisms in non-metastatic tumours.

Data availability

No data are associated with this article.

Acknowledgements

The authors thank the patient-derived xenografts platform XenTech for their help in the study design and in the PDX xenografts establishment. The authors also thank the Laboratoire d'Oncogénétique of the Jean PERRIN centre of Clermont-Ferrand.

References

1. Dent R, Trudeau M, Pritchard K, *et al.*: **Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence.** *Clin Cancer Res.* 2007; **13**(15 Pt 1): 4429–4434.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
2. Prat A, Pineda E, Adamo B, *et al.*: **Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer.** *Breast.* 2015; **24** Suppl 2: S26–35.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
3. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, *et al.*: **Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse.** *J Clin Oncol.* 2010; **28**(10): 1684–1691.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
4. Varešija D, Cocchiglia S, Byrne C, *et al.*: **Patient-Derived Xenografts of Breast Cancer.** In: Martin F, Stein T, Howlin J (eds). *Methods Mol Biol.* Springer, New York, NY. 2017; **1501**: 327–336.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
5. DeRose YS, Wang G, Lin YC, *et al.*: **Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes.** *Nat Med.* 2011; **17**(11): 1514–1520.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
6. Ben-David U, He G, Tseng YY, *et al.*: **Patient-Derived Xenografts Undergo Mouse-Specific Tumor Evolution.** *Nat Genet.* 2017; **49**(11): 1567–75.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
7. Byrne AT, Alferez DG, Amant F, *et al.*: **Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts.** *Nat Rev Cancer.* 2017; **17**(4): 254–268.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
8. Dobrolede LE, Airhart SD, Alferez DG, *et al.*: **Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research.** *Cancer Metastasis Rev.* 2016; **35**(4): 547–573.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
9. Bruns A, Rueda OM, Greenwood W, *et al.*: **A Biobank of Breast Cancer Explants with Preserved Intra-Tumor Heterogeneity to Screen Anticancer Compounds.** *Cell.* 2016; **167**(1): 250–274.e22.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
10. Rosenbluth JM, Schackmann RCJ, Gray GK, *et al.*: **Organoid Cultures from Normal and Cancer-Prone Human Breast Tissues Preserve Complex Epithelial Lineages.** *Nat Commun.* 2020; **11**(1): 1711.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
11. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, *et al.*: **A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity.** *Cell.* 2018; **172**(1–2): 373–386.e10.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
12. Goetz MP, Kalari KR, Suman VJ, *et al.*: **Tumor Sequencing and Patient-Derived Xenografts in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer.** *J Natl Cancer Inst.* 2017; **109**(7): djw306.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
13. Yu J, Qin B, Moyer AM, *et al.*: **Establishing and characterizing patient-derived xenografts using pre-chemotherapy percutaneous biopsy and post-chemotherapy surgical samples from a prospective neoadjuvant breast cancer study.** *Breast Cancer Res.* 2017; **19**(1): 130.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
14. Kabos P, Firley-Schultz J, Li C, *et al.*: **Patient-derived luminal breast cancer xenografts retain hormone receptor heterogeneity and help define unique estrogen-dependent gene signatures.** *Breast Cancer Res Treat.* 2012; **135**(2): 415–32.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)



INSTIGO Trial: Evaluation of a Plasma Protein Profile as a Predictive Biomarker for Metastatic Relapse of Triple Negative Breast Cancer

Hugo Veysi re^{1,2,3*}, Sejdi Lusho^{1,2,3}, Ioana Molnar^{1,2,3}, Myriam Kossai^{1,4}, Maureen Bernadach^{1,2}, Catherine Abrial^{1,2,3}, Yannick Bidet^{1,5†}, Nina Radosevic-Robin^{1,4†} and Xavier Durando^{1,2,3†}

OPEN ACCESS

Edited by:

San-Gang Wu,
First Affiliated Hospital of Xiamen
University, China

Reviewed by:

Charles Cox,
University of South Florida,
United States
Juan Zhou,
Xiamen University, China

*Correspondence:

Hugo Veysi re
hugo.veysi re@clermont.unicancer.fr
orcid.org/0000-0003-2202-7362

†These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Breast Cancer,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 01 April 2021

Accepted: 09 June 2021

Published: 25 June 2021

Citation:

Veysi re H, Lusho S, Molnar I,
Kossai M, Bernadach M, Abrial C,
Bidet Y, Radosevic-Robin N and
Durando X (2021) INSTIGO Trial:
Evaluation of a Plasma Protein
Profile as a Predictive Biomarker
for Metastatic Relapse of Triple
Negative Breast Cancer.
Front. Oncol. 11:653370.
doi: 10.3389/fonc.2021.653370

¹ Université Clermont Auvergne, INSERM UMR 1240 « Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques », Centre Jean PERRIN, Clermont-Ferrand, France, ² Division de Recherche Clinique, Délégation Recherche Clinique & Innovation, Centre Jean PERRIN, Clermont-Ferrand, France, ³ Centre d'Investigation Clinique, UMF501, Clermont-Ferrand, France, ⁴ Département d'anatomie et de cytologie pathologiques, Centre Jean PERRIN, Clermont-Ferrand, France, ⁵ Département d'oncogénétique, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre Jean PERRIN, Clermont-Ferrand, France

Background: Triple negative breast cancer (TNBC) accounts for 10-20% of breast cancers but has no specific therapy. While TNBC may be more sensitive to chemotherapy than other types of breast cancer, it has a poor prognosis. Most TNBC relapses occur during the five years following treatment, however predictive biomarkers of metastatic relapse are still lacking. High tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) levels before and after neo-adjuvant chemotherapy (NAC) are associated with lower relapse risk and longer survival but TILs assessment is highly error-prone and still not introduced into the clinic. Therefore, having reliable biomarker of relapse, but easier to assess, remains essential for TNBC management. Searching for such biomarkers among serum/plasma proteins, circulating tumoral DNA (ctDNA) and blood cells appear relevant.

Methods: This single-centre and prospective study aims to discover predictive biomarkers of TNBC relapse and particularly focuses on plasma proteins. Blood samples will be taken at diagnosis, on the day of first-line or post-NAC surgery, on the day of radiotherapy start, then 6 months and one year after radiotherapy. A blood sample will be taken at the time of metastatic relapse diagnosis. Blood samples will be used for circulating protein quantification, blood cell counts and circulating tumour DNA quantification. A tumour RNA signature, based on the analysis of the RNA expression of 6 genes, will also be tested from the initial biopsy taken routinely. In NAC patients, TILs quantity will be assessed on TNBC pre-treatment biopsy and surgical specimen.

Ethics and Dissemination: INSTIGO belongs to category 2 interventional research on humans. This study has been approved by the SUD-EST IV ethics committee and is conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and General Data Protection Regulation (GDPR). Study findings will be published in peer-reviewed medical journals.

Clinical Trial Registration: ClinicalTrials.gov, Identifier NCT04438681.

Keywords: triple negative breast cancer, predictive biomarker, plasma proteins, metastatic relapse, ctDNA, TILs, RNA signature, blood cells

INTRODUCTION

Triple negative breast cancer accounts for approximately 10–20% of breast cancers and is characterized by the lack -or by very low - expression of oestrogen and progesterone receptors and the lack of amplification of the gene coding for HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) (1). TNBC has no specific therapy; chemotherapy, radiotherapy and surgery remain preferred modalities. While TNBC may be more sensitive to chemotherapy than other types of breast cancer, it has a poor prognosis due to its heterogeneity (2–4). Predictive biomarkers of metastatic relapse and type of relapse need to be discovered. Among these predictive biomarkers, it has been shown that a high level of TILs before and after NAC is associated with lower recurrence risk and longer recurrence-free survival (5, 6). However, TIL assessment is error-prone and subject to high inter-evaluator variability despite the existence of standardized recommendations (7, 8). It is also known that a complete pathological response to NAC is associated with a low risk of metastatic relapse in TNBC (9). The determination of biomarkers that are easily quantifiable at diagnosis is essential. The search for predictive biomarkers of metastatic progression among circulating molecules seems relevant (10, 11). It has been shown that high concentrations of proteins involved in inflammation, such as interleukins 6 and 8, or involved in angiogenesis, such as angiopoietin-like protein, are associated with a high risk of metastatic progression of breast cancer (12–14). In TNBC, high blood levels of transforming growth factor- β (TGF- β) and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) are associated with a high risk of relapse (15). Circulating proteins assays are part of routine clinical testing and have a high sensitivity. Targeted analysis of the blood proteome (serum/plasma), using high throughput techniques such as multiplex ELISA, appears to be an interesting approach for the discovery of new biomarkers. In this context, we propose to conduct a study that measures the concentrations of a set of plasma proteins to evaluate their ability to predict metastatic relapse in patients with TNBC.

The interest in circulating biomarkers also leads us to focus on blood cells which are easily quantifiable and accessible. Blood cells and their ratios [Platelet-to-lymphocyte Ratio (PLR) and Neutrophil-to-lymphocyte Ratio (NLR)] are predictive and prognostic biomarkers of breast cancer (16, 17). In patients with TNBC, a high NLR, reflecting a weak immune response, is associated with a poor response to NAC and a poor survival (18, 19). In addition, plasma from cancer patients contains circulating tumoral DNA (ctDNA) carrying tumour mutations. ctDNA is proving to be another biomarker of interest to study. ctDNA levels make it possible to anticipate the response to treatment and to

predict the risk of metastatic relapse (20, 21). They are also a predictive and prognostic biomarker in patients with metastatic breast cancer (22). Combining the characteristics of a plasma protein profile, blood cells levels (PLR, NLR) and ctDNA would provide information on the metastatic potential of a given tumour.

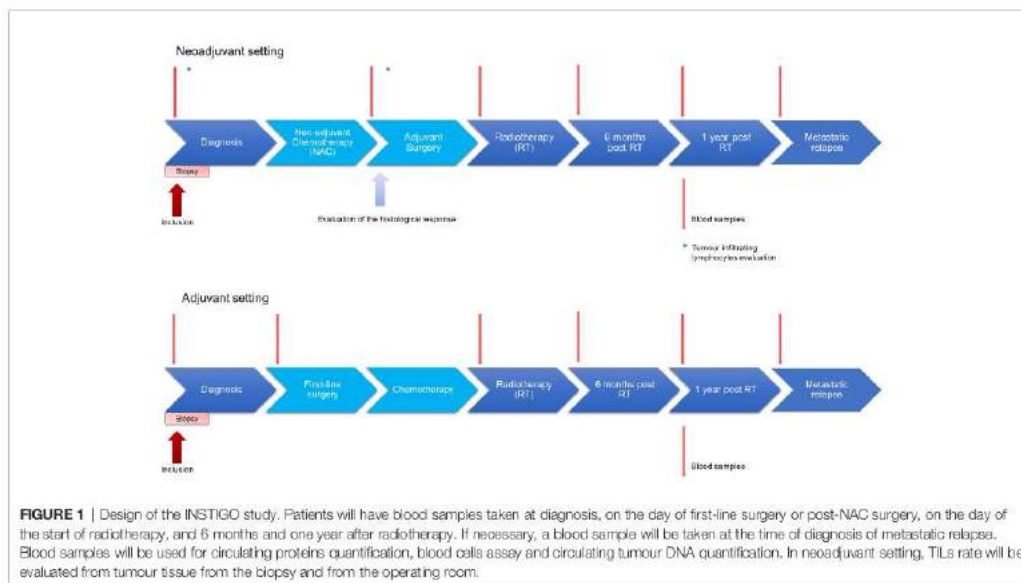
Finally, analyses of tumour RNA expression of a wide range of genes by PAM50 tests, EndoPredict tests, MammaPrint tests or even Blueprint tests allow clinicians to classify breast cancers into molecular subtypes, each corresponding to a specific prognosis and treatment proposal (23–27). However, no such tests exist for TNBCs. The validation of an RNA signature of triple negative breast tumours, established at the Centre Jean Perrin by the analysis of the RNA expression of 6 genes, could provide us an indication on the treatments to be preferred.

METHODS AND STUDY DESIGN

Study Design

This is a single-centre prospective trial designed to evaluate a plasma protein profile as a predictive biomarker for metastatic relapse of TNBC. The estimated duration of patients' enrolment is 3 years: 90 patients will be enrolled and followed from the patient inclusion until the first metastatic relapse or up to 5 years after the end of treatment if no relapse occurs. Study design is presented in **Figure 1**. TNBC patients will have blood samples taken at diagnosis, on the day of first-line surgery or post-NAC surgery, on the day of radiotherapy start, and 6 months and one year after the end of radiotherapy. Patients receiving neoadjuvant radiation will not be included in the trial. In case of recurrence, a blood sample will be taken at the time of diagnosis of metastatic relapse. Blood samples will be used for the quantification of plasma proteins, for the determination of blood cells and for the quantification of ctDNA. TILs rate evaluation will be performed on tumour tissue from the biopsy and from the operating specimen. The quantification of proteins will be done by multiplex ELISA. The identification of tumoral DNA mutations will be made from extracted DNA from tumour tissue from the operating specimen or from the biopsy. All coding regions, including exons borders and splicing sites, of the ten most frequently muted genes in breast tumours (including TP53, PTEN, PIK3CA, etc) will be captured from sample genomes. Then, targeted regions will be analysed by high throughput sequencing. Targeting several genes will ensure to discover at least one tumour-specific mutation. This mutation will later be quantified in peripheral blood samples. The RNA signature will be generated from transcripts extracted from tumour tissue from the surgical specimen or from the biopsy. A multiplex RT-qPCR will quantify the expression levels of the 6 genes of interest. The expression level of each gene will be multiplied by the corresponding coefficient in order to generate a prognostic score.

Abbreviations: ctDNA, circulating tumoral DNA; HER2, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2; NAC, Neoadjuvant chemotherapy; NLR, Neutrophil-to-lymphocyte Ratio; PLR, Platelet-to-lymphocyte Ratio; TILs, Tumour infiltrating lymphocytes; TNBC, Triple negative breast cancer.



Study Objectives

The primary objective of the INSTIGO trial is to discover a baseline plasma protein profile predictive of metastatic relapse in patients with TNBC (**Table 1**). It also aims to identify a plasma protein profile at different times during patient follow-up that could be predictive of metastatic relapse. Based on a review of the literature INSTIGO focuses on a specific group of proteins: Matrix metalloproteinase 9, tissue inhibitor of metalloproteinase 1, interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, programmed death-ligand 1, stromal cell-derived factor 1, GM-CSF, tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor-homology domains 2, TGF- β , VEGF-A, hepatocyte growth factor, fibroblast growth factor, CXCL5, CXCL12. Moreover, the INSTIGO study takes interest in others potential biomarkers such as ctDNA, blood cells, TILs, or tumour RNA expression (**Table 1**). Briefly, the objective is to evaluate the ability of those potential biomarkers to predict metastatic relapse in patients with triple-negative breast cancers.

Patient Selection

Inclusion and exclusion criteria are presented in **Table 2**. Briefly, women (18 years or older) with newly diagnosed, histologically proven and never treated primary triple negative breast cancer, and non-metastatic (M0) at diagnosis, will be included.

Recruitment and Consent

Eligible patients will be offered the opportunity to participate in the study by their oncologist or their surgeon. Patients who agree to participate in this study will provide written informed consent

TABLE 1 | Primary and secondary objectives.

Primary objective	<ul style="list-style-type: none"> To discover a baseline plasma protein profile predictive of metastatic relapse in patients with TNBC
Secondary objectives	<ul style="list-style-type: none"> To discover plasma protein profiles predictive of metastatic relapse in patients with TNBC, assessed at <ul style="list-style-type: none"> - the day of first surgery or post-CTNA surgery - the day of the radiotherapy start - 6 months and one year after radiotherapy To study the relationship between the quantity of tumour infiltrating lymphocytes at diagnosis and metastatic relapse To study the relationship between NLR and PLR and metastatic relapse, when those 2 parameters are assessed at <ul style="list-style-type: none"> - diagnosis - the day of first surgery or post-CTNA surgery To study the relationship between plasma levels of circulating tumoral DNA and metastatic relapse <ul style="list-style-type: none"> - at diagnosis - at the day of first surgery or post-CTNA surgery - at the day of the start radiotherapy start - 6 months and one year after radiotherapy
In neoadjuvant setting	<ul style="list-style-type: none"> To verify prognostic value of a baseline RNA signature To identify a baseline plasma protein profile predictive of histological response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) To study the relationship between variation in protein concentration, between diagnosis and end of NAC, and histological response to NAC To study the relationship between TIL quantity before and after NAC, as well as between the relationship between the baseline TIL level and the level of histological response to NAC To study the relationship between the variation of the PLR and the NLR before and after NAC, as well as between the relationship between the baseline PLR and NLR levels and the level of histological response to NAC

TABLE 2 | Inclusion and non-inclusion criteria.

Inclusion criteria	<ul style="list-style-type: none"> • Female • Age \geq 18 years • Newly diagnosed, histologically proven and never treated primary triple negative breast cancer, and non-metastatic (M0) at diagnosis • Speaking and understanding French • Affiliated to the French Social Security System • Able to give informed consent.
Non-inclusion criteria	<ul style="list-style-type: none"> • Patient deprived of liberty by court or administration decision • In neoadjuvant situation: neoadjuvant treatment by radiotherapy or hormone therapy • Refusal to participate to the study

for enrolment. Data obtained will be retained with consent, and any reasons given for withdrawal will be recorded. Participants can withdraw at any time.

Sample Size Calculation

Given the exploratory nature of the study, and the lack of sufficient data to provide hypotheses in order to perform sample size calculation, the objective is to recruit a maximum of patients. The recruitment capacity for this study is estimated at 90 patients (30 patients per year). An interim analysis at 30 patients will allow us to re-evaluate the recruitment capacity, and to assess the interest of extending the recruitment period, and to re-estimate the number of subjects needed in view of the amount of missing data and the variability of the protein data. A rough estimation allows us to evaluate that with a sample size of 90 patients we would obtain a 95% (Wilson's) confidence interval for the sensitivity of a 90% predictive score, with a precision of \pm 12%, assuming that the proportion of metastatic relapses at 5 years will be 1/3.

Data Collections

Data collected are the patient's age (month and year of birth), pathology, treatments received, response to NAC, clinical and molecular characteristics of the tumour on biopsy and surgical specimen and blood tests at diagnosis, on the day of the first-line surgery, before the start of radiotherapy, 6 months and 1 year after the end of radiotherapy and at the time of metastatic relapse. Data collected will be pseudonymized. Thus, study data will not contain any names or other personal identifiers such as addresses. Patients included in the trial will be identified by a code specific to this trial. The investigator will have access to the correspondence table between the patient's last name, first name, date of birth and the code assigned in the trial.

Statistical Analysis

Primary Analysis

The predictive plasma profile of metastatic relapse will be investigated using an approach based on the elastic-net method. Firstly, univariate analyses (Wilcoxon-Mann-Whitney tests with *p*-value correction for FDR control) will be performed to evaluate the relationship between the concentration of each protein and the occurrence of relapse. Then, a multivariate logistic regression model with elastic-net regularization will be constructed to allow an intrinsic selection of predictive variables (proteins). If necessary, a

selection stabilization algorithm will also be applied. The results of the analysis will therefore be the set of predictive variables selected by the selected model, their regression coefficients, as well as an estimation of the model performance (with associated confidence intervals). However, in the absence of a test dataset the performance of the model can only be estimated by cross-validation.

Secondary Analysis

To identify a plasma protein profile that is predictive of metastatic relapse, the same approach as for the main objective will be used.

The relationship between TILs, NLR and PLR levels measured at different times, or ctDNA plasma levels and metastatic relapse will be studied by Wilcoxon-Mann-Whitney tests and logistic regressions. Mixed models will be used to account for repeated data.

The relationship between, on the one hand, the variation in protein concentration, the variation in TILs, or the variation in PLR and NLR levels, between diagnosis and end of NAC, and, on the other hand, the histological response to NAC, will be studied as in the previous point. These aspects are also concerned by an intermediate analysis on the first 30 patients.

An RNA signature predictive of metastatic relapse will be assessed by applying a previously constructed model on the data obtained in the INSTIGO study. The classical indices for the evaluation of a classification (sensitivity, specificity, and precision, among others) will be calculated.

Trial Status

As of this day 2 patients has been recruited in the INSTIGO trial. Participant recruitment began on 9th November 2020 and is expected to finish in November 2023. The approved protocol is version 15, 04/09/2020.

Patient and Public Involvement

Neither patients nor the public were involved in the design of this research.

Ethics and Dissemination

The INSTIGO trial has been approved by an ethics committee (SUD-EST IV – Léon Bérard) on September 2020 (ID-RCB number: 2020-A01423-36). It is conducted notably in accordance with the Declaration of Helsinki and General Data Protection Regulation (GDPR). Study data and finding will be published in peer-reviewed medical journals. We plan to present the study and all data at national congresses and conferences.

DISCUSSION

The discovery of new inexpensive and reliable biomarkers to predict treatment response and metastatic recurrence in TNBC patients remain an important medical need. Such biomarkers would allow oncologists to offer an alternative treatment to TNBC patients with a high risk of metastatic recurrence. During the last years, many proteins appeared to predict clinical behaviour and new biomarkers have been proposed to predict survival and response to chemotherapy in many cases. The INSTIGO trial explores a group of blood proteins expected

to be reliable biomarkers. Thus, this study would allow us to determine whether a group of plasma proteins can predict response to neo-adjuvant chemotherapy and metastatic relapse in TNBC. Proteins are easily quantifiable and accessible biomarkers that could be used routinely.

Moreover, as many studies have demonstrated, the strength of a liquid biopsy is based on the association of several biomarkers (20). Thus, in the long term, this study and the discovery of various biomarkers such as plasma proteins, ctDNA, and blood cells would help clinicians choosing the best adapted treatment to each patient. More interestingly, the association of these biomarkers could provide a more reliable and powerful composite biomarker in TNBC.

AUTHOR'S NOTE

The trial is managed by the Jean Perrin Centre, in Clermont-Ferrand, France.

REFERENCES

- Lee J, Kim D-M, Lee A. Prognostic Role and Clinical Association of Tumor-Infiltrating Lymphocyte, Programmed Death Ligand-1 Expression With Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Locally Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res Treat* (2019) 51:649–63. doi: 10.4143/crt.2018.270
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res* (2007) 13:4429–34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* (2010) 363:1938–48. doi: 10.1056/NEJMra1001389
- Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights Into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov* (2019) 9:176–98. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1177
- Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol* (2019) 37:559–69. doi: 10.1200/JCO.18.01010
- Luen SJ, Salgado R, Dieci MV, Vingiani A, Curigliano G, Gould RE, et al. Prognostic Implications of Residual Disease Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Residual Cancer Burden in Triple-Negative Breast Cancer Patients After Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Oncol* (2019) 30:236–42. doi: 10.1093/annonc/mdy547
- Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Teres N, Penault-Llorca F, et al. Update on Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer, Including Recommendations to Assess TILs in Residual Disease After Neoadjuvant Therapy and in Carcinoma in Situ: A Report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol* (2018) 52:16–25. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.10.003
- Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in Breast Cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* (2015) 26:259–71. doi: 10.1093/annonc/mdv450
- von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J-U, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and Impact of Pathologic Complete Response on Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy in Various Intrinsic Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol* (2012) 30:1796–804. doi: 10.1200/JCO.2011.38.8595
- Ghajar CM. Metastasis Prevention by Targeting the Dormant Niche. *Nat Rev Cancer* (2015) 15:238–47. doi: 10.1038/nrc3910
- Redig AJ, McAllister SS. Breast Cancer as a Systemic Disease: A View of Metastasis. *J Intern Med* (2013) 274:113–26. doi: 10.1111/joim.12084

ETHICS STATEMENT

This study has been approved by the SUD-EST IV ethics committee and is conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and General Data Protection Regulation (GDPR).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

HV, XD, SL, YB, NR-R, IM, CA, and MB participated in the developing and conception of the study, and drafted the manuscript. XD is the coordinator of the study. XD and MB are medical leads. IM is the statistical lead, designed and will perform statistical analyses. HV is the project manager of the study and is involved in aspects of the day-to-day running of the trial. HV wrote the first draft of this manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

- Benoy IH, Salgado R, Dam PV, Geboers K, Marck EV, Scharpé S, et al. Increased Serum Interleukin-8 in Patients With Early and Metastatic Breast Cancer Correlates With Early Dissemination and Survival. *Clin Cancer Res* (2004) 10:7157–62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0812
- Endo M, Yamamoto Y, Nakano M, Masuda T, Odagiri H, Horiguchi H, et al. Serum ANGPTL2 Levels Reflect Clinical Features of Breast Cancer Patients: Implications for the Pathogenesis of Breast Cancer Metastasis. *Int J Biol Markers* (2014) 29:239–45. doi: 10.5301/ijbm.5000080
- Noman AS, Uddin M, Chowdhury AA, Nayeem MJ, Raihan Z, Rashid MI, et al. Serum Sonic Hedgehog (SHH) and Interleukin-(IL-6) as Dual Prognostic Biomarkers in Progressive Metastatic Breast Cancer. *Sci Rep* (2017) 7. doi: 10.1038/s41598-017-01268-4
- Bahhassy A, Mohamad M, Shaarawy S, Ismail MF, El-Bastawisy A, Ashmawy AM, et al. Transforming Growth Factor- β , Insulin-Like Growth Factor I/insulin-like Growth Factor I Receptor and Vascular Endothelial Growth Factor- α : Prognostic and Predictive Markers in Triple-Negative and non-Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Med Rep* (2015) 12:851–64. doi: 10.3892/mmr.2015.3560
- Ethier J-L, Desautels D, Templeton A, Shah PS, Amir E. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Breast Cancer Res BCR* (2017) 19. doi: 10.1186/s13058-016-0794-1
- Huszno J, Kolosza Z, Mrochem-Kwarciak J, Zajusz A. Prognostic Value of the Neutrophil-Lymphocyte, Platelet-Lymphocyte, and Monocyte-Lymphocyte Ratios in Male Breast Cancer Patients. *Oncology* (2020) 98:1–6. doi: 10.1159/000505627
- Chae S, Kang KM, Kim HJ, Kang E, Park SY, Kim JH, et al. Neutrophil-Lymphocyte Ratio Predicts Response to Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Oncol* (2018) 25:e113–9. doi: 10.3747/co.25.3888
- Patel DA, Xi J, Luo J, Hassan B, Thomas S, Ma CX, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio as a Predictor of Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2019) 174:443–52. doi: 10.1007/s10549-018-05106-7
- Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov* (2016) 6:479–91. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1483
- Beddowes E, Sammut SJ, Gao M, Caldas C. Predicting Treatment Resistance and Relapse Through Circulating DNA. *Breast* (2017) 34:S31–5. doi: 10.1016/j.breast.2017.06.024
- Fernandez-Garcia D, Hills A, Page K, Hastings RK, Toghiani B, Goddard KS, et al. Plasma Cell-Free DNA (cfDNA) as a Predictive and Prognostic Marker

- in Patients With Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Res BCR* (2019) 21. doi: 10.1186/s13058-019-1235-8
23. Chia SK, Bramwell VH, Tu D, Shephard LE, Jiang S, Vickery T, et al. A 50-Genes Intrinsic Subtype Classifier for Prognosis and Prediction of Benefit From Adjuvant Tamoxifen. *Clin Cancer Res* (2012) 18:4465–72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0286
24. Vieira AF, Schmitt F. An Update on Breast Cancer Multigene Prognostic Tests—Emergent Clinical Biomarkers. *Front Med* (2018) 5:248. doi: 10.3389/fmed.2018.00248
25. Wallden B, Storh f J, Nielsen T, Dowidar N, Schaper C, Ferree S, et al. Development and Verification of the FAM50-based Prosigna Breast Cancer Gene Signature Assay. *BMC Med Genomics* (2015) 8:54. doi: 10.1186/s12920-015-0129-6
26. Soliman H, Shah V, Sekalovic G, Mahtani R, Levine E, Mavromatis B, et al. MammaPrint Guides Treatment Decisions in Breast Cancer: Results of the IMPACT Trial. *BMC Cancer* (2020) 20:81. doi: 10.1186/s12885-020-6534-z
27. Mitterpergher L, Delahaye LJ, Witteveen AT, Snel MH, Mee S, Chan BY, et al. Performance Characteristics of the Blueprint[®] Breast Cancer Diagnostic Test. *Transl Oncol* (2020) 13:100756. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100756

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright   2021 Veysi re, Litsha, Molnar, Kassai, Bernadach, Abrial, Bidet, Radosevic-Robin and Durando. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Abstract ESMO 2021**Authors**

MA MOURET-REYNIER, MJ PAILLARD, L UWER, I MOLNAR, F KWIATKOWSKI, S LUSHO, N DOHOLLOU, T PETIT, N HAJJAJI, L BOUDIN, V LORGIS, JP JACQUIN, C ABRIAL, J PASSILDAS JAHANMOHAN

Title

National multicentre retrospective study on metastatic breast cancer patients to characterize long responder under eribulin – LORELIN study

Abstract

Background: Eribulin (ERI) can represent a therapeutic alternative for advanced breast cancer patients (pts) who have received at least one or two lines of anthracyclines-based chemotherapy and taxanes therapy. In this study, we focused on long responder patients, i.e. with objective response or stability ≥ 6 months (mo.) under ERI, in order to better characterize them (NCT03771183).


Methods: Metastatic breast cancer pts treated by ERI in 2nd, 3rd or 4th line between Sep-2011 and June-2018 were selected. The following parameters were assessed: primary tumor and metastasis characteristics, type of response and duration, disease progression, treatment received toxicities, survival (progression free survival (PFS), overall survival (OS) and predictive factors of PFS. A special focus was set on pts with hepatic disease (HD).

Results: Among the 98 pts included, analysis was conducted on 84 pts (median age 62) with a majority of HR+ tumor (89% HR+; 6% TN and 5% unknown), 81% of pts had visceral disease and 89% had non visceral disease. ERI was received in 2nd, 3rd and 4th line of metastatic treatment for respectively 21%, 44% and 35% pts. Complete response (CR), partial response (PR) and stable disease (SD) were observed respectively for 2.4%, 46.4% and 51.2% of pts. The median duration of response was 25.6 weeks (95 IC 22-27.7) with a median number of infusions of 6. Response was similar irrespective of ERI line number. HD was observed in 70.2% of pts with 3.4% of CR, 50.8% of PR and 45.8% of SD. The median PFS was 9 mo. (95 %CI 8-10). Subgroup analysis showed similar PFS irrespective of HD ($p=0.21$) and treatment line ($p=0.46$). The median OS was 24 mo. (95% IC 20-31). Predictive factors of PFS in univariate analysis were progesteron receptor expression ($p=0.014$), number of ERI infusions ($p=0.011$) and duration of response ($p<0.001$); in multivariate analysis the main predictive factor was duration of





response ($p=0.003$). The same predictive factors were found for pts with HD. Safety results and predictive factors of OS will be presented in the congress.

Conclusion: Response to ERI and PFS were independent of presence of hepatic metastasis and number of line by ERI. The duration of response, number of line by ERI and positive progesteron receptor are the main predictive factors of PFS in our cohort and in pts with HD.

Subgroups	PFS	
	Event (%)	Median (mo.) (95% CI)
All (n=84)	82 (98)	9 (8-10)
HD (n=59)	57 (97)	8 (7-10)
ERI in 2nd line (n=18)	16 (89)	8 (7-48)
ERI in 3rd line (n=37)	37 (100)	9 (8-12)
ERI in 4th line (n=29)	29 (100)	9 (7-12)



PERCEPTION TRIAL : CORRELATION BETWEEN PERIPHERAL BLOOD CELLS AND TUMOUR INFILTRATING LYMPHOCYTES IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

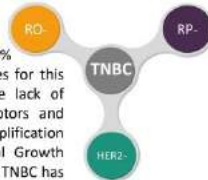
Sejdi LUSHO^{1,2}, Xavier DURANDO^{1,3}, Yannick BIDET^{1,4}, Ioana MOLNAR^{1,3}, Myriam KOSSAT^{1,3}, Maureen BERNADACH^{1,3}, Nathalie LACRAMPE^{1,3}, Hugo VEYSSIERE^{1,3}, Mathias CAVAILLE^{1,4}, Mathilde GAY-BELLULE^{1,4}, Nina RADOSEVIC-ROBIN^{1,5}, Catherine ABRIAL^{1,6}

¹ Université Clermont Auvergne, INSERM UMR 1246 - Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques v, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert, 63000 Clermont-Ferrand, France
² Délégation Recherche Clinique & Innovation, Centre Jean Perrin, 58 rue Montalembert F-63001 Clermont-Ferrand, France
³ Centre d'Investigation Clinique, UMR501, F-63001, Clermont-Ferrand, France
⁴ Centre Jean Perrin, Laboratoire d'oncologie moléculaire, 58 Rue Montalembert, 63001 Clermont-Ferrand, France
⁵ Centre Jean Perrin, Département d'anatomie et de cytologie pathologique, 58 rue Montalembert, 63001 Clermont-Ferrand, France
⁶ Centre d'Investigation Clinique, UMR501, F-63001, Clermont-Ferrand, France

¹ Centre Jean Perrin, Laboratoire d'oncologie moléculaire, 58 Rue Montalembert, 63001 Clermont-Ferrand, France
² Centre Jean Perrin, Département d'anatomie et de cytologie pathologique, 58 rue Montalembert, 63001 Clermont-Ferrand, France

BACKGROUND

TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER



Triple negative breast cancer (TNBC) represents 10% to 20% of all breast cancers. Treatment strategies for this type of breast cancer are limited, due to the lack of hormone receptor expression (oestrogen receptors and progesterone receptors) and the absence of amplification for the gene coding for the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) protein, in tumour cells. TNBC has an unfavourable prognosis with a high rate of metastatic recurrence during the first five years after treatment (1). However, not all TNBC patients develop metastatic recurrence.

NOVEL BIOMARKERS IN TNBC

Higher amounts of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in the biopsy before treatment are associated with higher rate of pathologic complete response (pCR) to the neoadjuvant chemotherapy (NACT) and better relapse-free survival (2-3).

TILs evaluation :

- Semi-quantitative assessment
- Not in routine use
- Inherent error risk

Various blood cell counts and the ratios between them, such as Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) and Platelet-to-Lymphocyte Ratio (PLR) could be used as predictive biomarkers in several types of cancer, including breast cancer (4-5).

Despite the insufficient data in TNBC, studies have shown that circulating tumor DNA (ctDNA) is a reliable marker in predicting cancer recurrence, due to its high sensitivity and specificity (6). Therefore, evaluation of ctDNA as a predictor of metastatic relapse in TNBC is of great interest and it could provide additional information to that of TILs and/or the circulating blood cell counts.


(1) Denev R et al. 2007 ; (2) Loi S et al. 2019 ; (3) Dileo MV et al. 2014 ; (4) Lee, Kim and Lee. 2019 ; (5) Oridaura M et al. 2019 ; (6) Sheng M et al. 2018.

SECONDARY OBJECTIVES

1. Assessment of the correlation between the amount of TILs in the biopsy and the total white blood cell count (WBC), absolute neutrophil count (ANC), absolute lymphocyte count (ALC), absolute platelet count (APC) and platelet-to-lymphocyte Ratio (PLR) routinely assessed in women with TNBC, at diagnosis.
2. Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR), at the time of diagnosis, and the response to NACT according to Sataloff.
3. Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR) at the time of diagnosis, and the TIL amount in the post-NACT surgical specimen.
4. Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR) and the recurrence-free survival (RFS).
5. Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR) before post-NACT surgery and TIL quantity in the surgical specimen post-NACT, depending on the time between surgery and the last administration of chemotherapy.
6. Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR) and the presence of ctDNA.
7. Assessment of the correlation between ctDNA and RFS.
8. Assessment of the correlation between the mentioned blood counts and their ratios (NLR and PLR) after cancer treatment and the RFS.

PRIMARY OBJECTIVE

Assessment of the correlation between the amount of TILs found in the biopsy, measured semi-quantitatively as the percentage of tumour stromal area occupied by lymphocytes and the NLR derived from the absolute blood counts of neutrophils and lymphocytes in TNBC patients, at the time of diagnosis.



PATIENTS AND METHODS

Main inclusion criteria :

- Adult female
- Primitive, non-metastatic TNBC, diagnosed histologically
- Treated with chemotherapy, surgery and radiation therapy

Main exclusion criteria :

- Unavailable biopsy tumor samples
- Unavailable blood test results at the time of diagnosis

Eligible patients will be selected out of a database of TNBC patients and will be recruited during the first year following the end of RT. The data collected before inclusion, such as TILs evaluation at baseline and in the surgical specimen, as well as blood test results at different times (baseline, before surgery, before the start of RT and 6 months after the end of RT) will also be analysed. After inclusion in the PERCEPTION trial, patients will undergo two interventions. A blood test will be performed 12 months after the end of RT and another blood test will be performed at the time of the first metastatic recurrence, if applicable. WBC, ANC, ALC, APC, NLR, PLR and ctDNA will be measured from these blood tests. The overall follow-up is 5 years.

Total number of patients : 90. As of January 2021, 22 patients have been enrolled
 Enrollment period : 3 years (December 2019 – October 2022)
 Follow-up period : 5 years

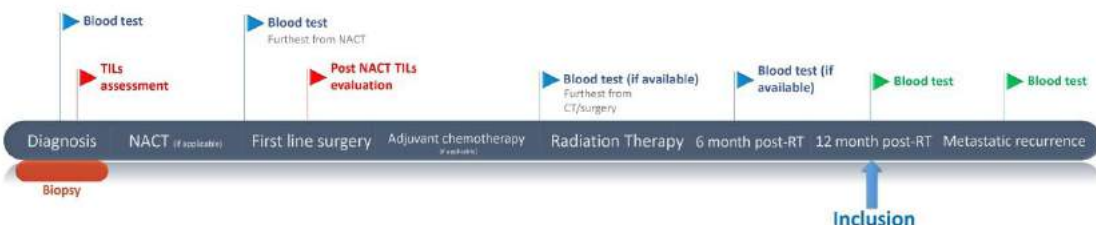
DISCUSSION AND FUTURE WORKS

The PERCEPTION clinical trial is designed to verify whether a peripheral blood count or a ratio of peripheral blood counts can provide similar prognostic information as TILs.

Drawbacks : The study is conducted at a single site. The sample size is not a very large one.

Advantages : Identifying new biomarkers would allow for a quick, inexpensive and reliable prediction of treatment response and metastatic recurrence of TNBC patients. Such biomarkers would allow oncologists to propose alternative treatment and enrolment into clinical trials to the TNBC patients carrying a high risk of resistance to the classical NACT or/and a high risk of metastatic recurrence.

Future works : Studying other elements, such as circulating proteins would be of great interest in the prediction of TNBC relapse.



Annexe 2 : Le stade clinique du cancer du sein selon la 8^{ème} édition de la classification TNM (Source : American Joint Committee on Cancer – Breast Cancer Staging System)

TNM	Grade SBR	Statut HER2	RO	RP	Stade clinique
TisN0M0	Tout	Tout	Tout	Tout	0
T1N0M0 T0N1miM0 T1N1miM0	G1 ou G2	Positif	Tout	Tout	IA
		Négatif	Positif	Tout	IA
			Négatif	Positif	IA
		Négatif	Négatif	IB	
	G3	Positif	Tout	Tout	IA
		Négatif	Positif	Positif	IA
			Négatif	Négatif	IB
		Négatif	Tout	IB	
T0N1M0 T1N1M0 T2N0M0	G1	Tout	Positif	Positif	IB
			Négatif	Négatif	IIA
			Négatif	Tout	IIA
	G2 ou G3	Positif	Positif	Positif	IB
			Négatif	Négatif	IIA
			Négatif	Tout	IIA
	G2	Négatif	Positif	Positif	IB
			Négatif	Négatif	IIA
			Positif	Positif	IIA
			Négatif	Négatif	IIB
	G3	Négatif	Positif	Positif	IIA
			Négatif	Négatif	IIB
			Positif	Positif	IIB
			Négatif	Positif	IIB
			Négatif	Négatif	IIB
	T2N1M0 T3N0M0	G1	Positif	Positif	Positif
Négatif				Négatif	IIA
Négatif				Positif	IIA
Négatif				Négatif	IIB
Négatif			Positif	Positif	IIA
			Négatif	Négatif	IIB
			Négatif	Tout	IIB
			Négatif	Tout	IIB
G2		Positif	Positif	Positif	IB
			Négatif	Négatif	IIA
			Négatif	Positif	IIA
			Négatif	Négatif	IIB
		Négatif	Positif	Positif	IIA
			Négatif	Négatif	IIB
			Positif	Positif	IIB
			Négatif	Négatif	IIIB
G3	Positif	Positif	Positif	IB	
		Négatif	Négatif	IIB	
	Négatif	Négatif	Tout	IIB	
		Positif	Positif	IIB	
Négatif	Positif	Positif	IIB		
Négatif	Négatif	III A			

			Négatif	Positif	IIIA
				Négatif	IIIB
T0N2M0 T1N2M0 T2N2M0 T3N1M0 T3N2M0	G1 ou G2	Positif	Positif	Positif	IIA
				Négatif	IIIA
			Négatif	Tout	IIIA
		Négatif	Positif	Positif	IIA
				Négatif	IIIA
			Négatif	Positif	IIIA
	G3	Positif	Positif	Positif	IIB
				Négatif	IIIA
			Négatif	Tout	IIIA
		Négatif	Positif	Positif	IIIA
				Négatif	IIIB
			Négatif	Positif	IIIB
			Négatif	IIIC	
T4N0M0 T4N1M0 T4N2M0 Tout T N3M0	G1 ou G2	Positif	Positif	Positif	IIIA
				Négatif	IIIB
			Négatif	Tout	IIIB
		Négatif	Positif	Positif	IIIB
				Négatif	IIIC
			Négatif	Positif	IIIB
	G3	Positif	Tout	Tout	IIIB
			Négatif	Positif	IIIB
		Négatif	Positif	Positif	IIIB
			Négatif	Tout	IIIC
Tout T, tout N, M1	Tout	Tout	Tout	Tout	IV

Annexe 3 : Classification des images mammographiques en fonction du degré de suspicion de leur caractère pathologique – correspondance avec le système BIRADS de l’American College of Radiology (ACR) (Source : Haute Autorité de Santé)

Catégorie	Interprétation
ACR - BIRADS 0	Des investigations complémentaires sont nécessaires : comparaison avec les documents antérieurs, incidences complémentaires, clichés centrés comprimés, agrandissement de microcalcifications, échographie, etc. C’est une classification « d’attente », qui s’utilise en situation de dépistage ou dans l’attente d’un second avis, avant que le second avis soit obtenu ou que le bilan d’imagerie soit complété et qu’ils permettent une classification définitive.
ACR - BIRADS 1	Mammographie normale.
ACR - BIRADS 2	Il existe des anomalies bénignes ne nécessitant ni surveillance ni examen complémentaire : <ul style="list-style-type: none"> • Opacité ronde avec macrocalcifications (adénofibrome ou kyste) • Ganglion intramammaire • Opacité(s) ronde(s) correspondant à un/des kyste(s) typique(s) en échographie • Image(s) de densité grasseuse ou mixte (lipome, hamartome, galactocèle, kyste huileux) • Cicatrice(s) connue(s) et calcification(s) sur matériel de suture • Macrocalcifications sans opacité (adénofibrome, kyste, adiponécrose, ectasie canalaire sécrétante, calcifications vasculaires, etc.) • Microcalcifications annulaires ou arciformes, semi-lunaires, sédimentées, rhomboédriques • Calcifications cutanées et calcifications punctiformes régulières diffuses
ACR - BIRADS 3	Il existe une anomalie probablement bénigne pour laquelle une surveillance à court terme est conseillée : <ul style="list-style-type: none"> • Microcalcifications rondes ou punctiformes régulières ou pulvérulentes, peu nombreuses, en petit amas rond isolé • Petit(s) amas rond(s) ou ovale(s) de calcifications amorphes, peu nombreuses, évoquant un début de calcification d’adénofibrome • Opacité(s) bien circonscrite(s), ronde(s), ovale(s) ou discrètement polycyclique(s) sans microlobulation, non calcifiée(s), non liquidiennes en échographie

	<ul style="list-style-type: none"> Asymétrie focale de densité à limites concaves et/ou mélangée à de la graisse
ACR - BIRADS 4	<p>Il existe une anomalie indéterminée ou suspecte qui indique une vérification histologique :</p> <ul style="list-style-type: none"> Microcalcifications punctiformes régulières nombreuses et/ou groupées en amas aux contours ni ronds, ni ovales Microcalcifications pulvérulentes groupées et nombreuses Microcalcifications irrégulières, polymorphes ou granulaires, peu nombreuses Image(s) spiculée(s) sans centre dense Opacité(s) non liquidienne(s) ronde(s) ou ovale(s) aux contours lobulés, ou masqués, ou ayant augmenté de volume Distorsion architecturale en dehors d'une cicatrice connue et stable Asymétrie(s) ou surcroît(s) de densité localisé(s) à limites convexes ou évolutif(s)
ACR - BIRADS 5	<p>Il existe une anomalie évocatrice d'un cancer :</p> <ul style="list-style-type: none"> Microcalcifications vermiculaires, arborescentes ou microcalcifications irrégulières, polymorphes ou granulaires, nombreuses et groupées Groupement de microcalcifications quelle que soit leur morphologie, dont la topographie est galactophorique Microcalcifications associées à une anomalie architecturale ou à une opacité Microcalcifications groupées ayant augmenté en nombre ou microcalcifications dont la morphologie et la distribution sont devenues plus suspectes Opacité mal circonscrite aux contours flous et irréguliers Opacité spiculée à centre dense
ACR - BIRADS 6	Malignité prouvée histologiquement. L'imagerie est réalisée après la chimiothérapie.

Annexe 4 : Les différents seuils des paramètres sanguins dans les études montrant une corrélation entre NLR, PLR et le pronostic.

Auteur	Année	NLR cut-off	PLR cut-off	Effectif	Type de cancer	Type de traitement
Corbeau et al. (187)	2020		150	280	Cancer du sein	CTNA (anthracyclines-taxanes)
Asano et al. (196)	2016		150	177	Cancer du sein	CTNA (anthracyclines-taxanes)
Cuello-Lopez et al. (132)	2018		150	288	Cancer du sein	CTNA (anthracyclines-taxanes)
Graziano et al. (198)	2019	2,42	104,47	373	Cancer du sein	CTNA
Takeuchi et al. (218)	2017		162,28	296	Cancer du sein	Chirurgie première
Krenn-Pilko et al. (219)	2016	3		762	Cancer du sein	Chirurgie première
Kim et al. (220)	2019	2,21	143,36	105	Cancer du sein	CTNA
Azab et al. (221)	2013	3,3	185	437	Cancer du sein	Non connu
Van Berckelaer et al. (188)	2020	4	210	127	Cancer du sein T4d	CTNA (anthracyclines-taxanes)
Liu et al. (222)	2017	3	147	318	Cancer du sein RH-	Chirurgie première ou CTNA
Vernieri et al. (199)	2018		200	57	CSTN métastatique	CTNA
Azab et al. (189)	2021	2		125	CSTN stade 1-3	CTNA
Bozkurt et al. (190)	2015	2		85	CSTN stade 1-3	Chirurgie première
Ren et al. (191)	2018	2.6		281	CSTN	Chirurgie première ou CTNA
Pistelli et al. (192)	2015	3		90	CSTN stade 1-3	Chirurgie première
Asano et al. (193)	2016	3		61	CSTN	CTNA (anthracyclines-taxanes)
Chae et al. (194)	2018	1,7		87	CSTN	CTNA (anthracyclines-taxanes)
Lee et al. (195)	2019	3,16		358	CSTN stade 1-3	Chirurgie première ou CTNA
Qiu et al. (223)	2018	2,85		406	CSTN	Chirurgie première ou CTNA
Huszno et al. (197)	2019		190,9	86	CSTN	CTNA

Annexe 5 : Les caractéristiques des patientes analysées

Variable	n (%)
Emboles sur la biopsie	
Oui	10 (8.3%)
Non	99 (82.5%)
Non connu	11 (9.2%)
Mutations	
BRCA1	10 (8.3%)
BRCA2	4 (3.3%)
Aucune	51 (42.5%)
Non connu	55 (45.8%)
Taille de la tumeur (mm) au diagnostic	
Clinique	36 ± 17.3
Mammographique	26.3 ± 14.6
Echographique	25.6 ± 13
Chirurgie	
Conservatrice	87 (72.5%)
Mastectomie	33 (27.5%)
Curage ganglionnaire	
Oui	71 (59.2%)
Non	49 (40.8%)
Histologie de la pièce opératoire	
Carcinome canalaire infiltrant	47 (39.2%)
Carcinome canalaire infiltrant + <i>in situ</i>	35 (29.2%)
Carcinome lobulaire infiltrant	1 (0.8%)
Carcinome canalaire <i>in situ</i>	6 (5%)
Pas de tumeur résiduelle	31 (25.8%)
Récepteurs aux œstrogènes sur la pièce opératoire	
0%	79 (65.8%)
< 10%	3 (2.5%)
< 20%	2 (1.7%)
Non applicable	36 (30%)
Récepteurs aux progestérones sur la pièce opératoire	
0%	82 (68.3%)

< 10%	1 (0.8%)
< 20%	1 (0.8%)
Non applicable	36 (30%)
Statut HER2 sur la pièce opératoire	
Négatif	83 (69.2%)
Equivoque	1 (0.8%)
Non applicable	36 (30%)
Emboles sur la pièce opératoire	
Oui	10 (8.3%)
Non	90 (75%)
Non connu	20 (16.7%)
Ki67 sur la pièce opératoire	39.9 ± 35.2
< 20%	30 (25%)
≥ 20 %	46 (38.3%)
Classification selon Chevallier de la réponse à la CTNA	
1	32 (26.7%)
2	9 (7.5%)
3	70 (58.3%)
4	9 (7.5%)
Classification selon Sataloff de la réponse à la CTNA	
TA	51 (42.5%)
TB	44 (36.7%)
TC	19 (15.8%)
TD	6 (5%)
NA	20 (16.7%)
NB	61 (50.8%)
NC	26 (21.7%)
ND	10 (8.3%)
Non connu	3 (2.5%)
Taille du résidu tumoral (mm)	11.8 ± 15.1
Nombre de ganglions prélevés	8.3 ± 6.2
Nombre de ganglions envahis	0.9 ± 2.1
Radiothérapie adjuvante	
Oui	116 (96.7%)

Non	4 (3.3%)
Chimiothérapie adjuvante	
Oui	3 (2.5%)
Non	117 (97.5%)
Hormonothérapie adjuvante	
Oui	3 (2.5%)
Non	117 (97.5%)
Thérapie ciblée adjuvante	
Oui	2 (1.7%)
Non	118 (98.3%)
Rechutes métastatiques	24 (20%)
Cérébrales	8 (33.3%)
Osseuses	12 (50%)
Hépatiques	12 (50%)
Pulmonaires	12 (50%)
Cutané	2 (8.3%)
Autres	7 (29.2%)
Rechute poly métastatique	19 (79.2%)
Dernières nouvelles	
Vivantes	99 (82.5%)
Décédées	21 (17.5%)
Bilan sanguin au diagnostic	
Neutrophiles	4.3 ± 2.04
Lymphocytes	2.01 ± 0.52
Monocytes	0.5 ± 0.16
Plaquettes	266.66 ± 59.3
NLR	2.29 ± 1.3
PLR	142.23 ± 51.44
TILs sur la biopsie de diagnostic	98 (81.7%)
Moyenne	17.11%
Médiane	10%
TILs dans le sous-groupe pCR	
Médiane	20%
Moyenne ± écart-type	23% ± 21%
TILs dans le sous-groupe ypT1ab ypN0	

Médiane	2%
Moyenne \pm écart-type	14% \pm 7%
PLR dans le sous-groupe pCR	
Médiane	125,3
Moyenne \pm écart-type	131,5 \pm 46,3
PLR dans le sous-groupe ypT1ab ypN0	
Médiane	124,3
Moyenne \pm écart-type	139,4 \pm 62,4

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Castro A, Pyke RM, Zhang X, Thompson WK, Day C-P, Alexandrov LB, et al. Strength of immune selection in tumors varies with sex and age. *Nat Commun.* 17 août 2020;11(1):4128.
2. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* oct 2000;80(4):1523-631.
3. Nussey S, Whitehead S. The gonad [Internet]. *Endocrinology: An Integrated Approach.* BIOS Scientific Publishers; 2001 [cité 7 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK29/>
4. Anatomie du sein - Cancer du sein [Internet]. [cité 7 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Anatomie-du-sein>
5. Breast Cancer Treatment (Adult) (PDQ®)-Patient Version - National Cancer Institute [Internet]. 2020 [cité 8 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq>
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4 mars 2011;144(5):646-74.
7. Les maladies du sein - Cancer du sein [Internet]. [cité 8 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Les-maladies-du-sein>
8. Schnitt SJ. Diagnosis of ductal carcinoma in situ in an era of de-escalation of therapy. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* janv 2021;34(Suppl 1):1-7.
9. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med.* 1 avr 2004;350(14):1430-41.
10. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res* [Internet]. 2 oct 2017 [cité 8 oct 2020];50. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5625777/>
11. Board WC of TE. Breast Tumours [Internet]. [cité 12 févr 2021]. Disponible sur: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Breast-Tumours-2019>
12. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al., éditeurs. *AJCC Cancer Staging Manual* [Internet]. 8^e éd. Springer International Publishing; 2017 [cité 26 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.springer.com/fr/book/9783319406176>
13. Sokolova A, Lakhani SR. Lobular carcinoma in situ: diagnostic criteria and molecular correlates. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* janv 2021;34(Suppl 1):8-14.

14. Sinn H-P, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care* Basel Switz. mai 2013;8(2):149-54.
15. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 21 déc 2015;8:23-31.
16. Limaiem F, Budh DP. Lobular Breast Carcinoma. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cité 12 févr 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554578/>
17. van Uden DJP, van Laarhoven HWM, Westenberg AH, de Wilt JHW, Blanken-Peeters CFJM. Inflammatory breast cancer: an overview. *Crit Rev Oncol Hematol*. févr 2015;93(2):116-26.
18. Limaiem F, Mlika M. Medullary Breast Carcinoma. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cité 10 févr 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542292/>
19. Limaiem F, Ahmad F. Mucinous Breast Carcinoma [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2020 [cité 15 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538334/>
20. Limaiem F, Mlika M. Tubular Breast Carcinoma [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2020 [cité 15 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542223/>
21. Rosen LE, Gattuso P. Neuroendocrine Tumors of the Breast. *Arch Pathol Lab Med*. 1 nov 2017;141(11):1577-81.
22. Tan PH, Schnitt SJ, Vijver MJ van de, Ellis IO, Lakhani SR. Papillary and neuroendocrine breast lesions: the WHO stance. *Histopathology*. 2015;66(6):761-70.
23. McKinnon E, Xiao P. Metaplastic Carcinoma of the Breast. *Arch Pathol Lab Med*. 1 juin 2015;139(6):819-22.
24. Benlemlih A, Bendahou M, Znati K, Sekkal M, Chahbouni S, Mahmoud S, et al. Carcinome métaplasique du sein avec différenciation osseuse extensive: à propos d'un cas. *Pan Afr Med J* [Internet]. 1 oct 2013 [cité 15 févr 2021];16. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3932117/>
25. Lim SZ, Ong KW, Tan BKT, Selvarajan S, Tan PH. Sarcoma of the breast: an update on a rare entity. *J Clin Pathol*. mai 2016;69(5):373-81.
26. Khattab A, Kashyap S, Monga DK. Male Breast Cancer [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2020 [cité 15 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526036/>
27. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 4 oct 2012;490(7418):61-70.

28. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet Lond Engl.* 18 2017;389(10074):1134-50.
29. Synthèse - Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Ref: SYNINCENAT2019 [Internet]. [cité 16 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Synthese-Estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-France-metropolitaine-entre-1990-et-20182>
30. INCA - Les cancers en France [Internet]. [cité 10 nov 2020]. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=64
31. Partridge AH. Chemotherapy in Premenopausal Breast Cancer Patients. *Breast Care.* oct 2015;10(5):307-10.
32. Le dépistage organisé du cancer du sein [Internet]. [cité 16 févr 2021]. Disponible sur: <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/Depistage/Le-depistage-organise-du-cancer-du-sein>
33. Colditz GA, Kaphingst KA, Hankinson SE, Rosner B. Family history and risk of breast cancer: Nurses' Health Study. *Breast Cancer Res Treat.* juin 2012;133(3):1097-104.
34. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;165(1):193-200.
35. Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 1 nov 2017;13(11):1387-97.
36. Antécédents personnels - Facteurs de risque [Internet]. [cité 18 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-de-risque/Antecedents-personnels>
37. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Przegląd Menopauzalny Menopause Rev.* sept 2015;14(3):196-202.
38. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW, Helzlsouer KJ, et al. Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *Br J Cancer.* 23 août 2011;105(5):709-22.
39. Kaaks R, Rinaldi S, Key TJ, Berrino F, Peeters PHM, Biessy C, et al. Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Endocr Relat Cancer.* déc 2005;12(4):1071-82.
40. Dall GV, Britt KL. Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Front Oncol* [Internet]. 26 mai 2017 [cité 17 févr 2021];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445118/>

41. Razzaghi H, Troester MA, Gierach GL, Olshan AF, Yankaskas BC, Millikan RC. Mammographic density and breast cancer risk in White and African American Women. *Breast Cancer Res Treat.* sept 2012;135(2):571-80.
42. Azam S, Lange T, Huynh S, Aro AR, von Euler-Chelpin M, Vejborg I, et al. Hormone replacement therapy, mammographic density, and breast cancer risk: a cohort study. *Cancer Causes Control.* 2018;29(6):495-505.
43. Cancer du sein [Internet]. [cité 17 févr 2021]. Disponible sur: /maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-sein
44. Barber TM, McCarthy MI, Wass J a. H, Franks S. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* août 2006;65(2):137-45.
45. de Boer MC, Wörner EA, Verlaan D, van Leeuwen PAM. The Mechanisms and Effects of Physical Activity on Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 1 juill 2017;17(4):272-8.
46. Schmidt T, van Mackelenbergh M, Wesch D, Mundhenke C. Physical activity influences the immune system of breast cancer patients. *J Cancer Res Ther.* sept 2017;13(3):392-8.
47. Brown JC, Winters-Stone K, Lee A, Schmitz KH. Cancer, Physical Activity, and Exercise. *Compr Physiol.* oct 2012;2(4):2775-809.
48. Physical activity [Internet]. [cité 18 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity>
49. Koh J, Kim MJ. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean J Radiol.* janv 2019;20(1):69-82.
50. Balleyguier C, Ayadi S, Van Nguyen K, Vanel D, Dromain C, Sigal R. BIRADS classification in mammography. *Eur J Radiol.* févr 2007;61(2):192-4.
51. Haute Autorité de Santé. ALD n° 30 - Cancer du sein [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 24 nov 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_927251/fr/ald-n-30-cancer-du-sein
52. Breast Imaging Reporting & Data System [Internet]. [cité 25 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.acr.org/Clinical-Resources/Reporting-and-Data-Systems/Bi-Rads>
53. Classification en six catégories des images mammographiques en fonction du degré de suspicion de leur caractère pathologique - Correspondance avec le système BIRADS de l'American College of Radiology (ACR) [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 21 janv 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_272162/fr/classification-en-six-categories-des-images-mammographiques-en-fonction-du-degre-de-suspicion-de-leur-caractere-pathologique-correspondance-avec-le-systeme-birads-de-l-american-college-of-radiology-acr

54. Diagnostic d'un cancer du sein - Cancer du sein [Internet]. [cité 19 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Diagnostic>
55. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* sept 2015;26 Suppl 5:v8-30.
56. Zeira R, Raphael BJ. Copy number evolution with weighted aberrations in cancer. *Bioinforma Oxf Engl.* 1 juill 2020;36(Supplement_1):i344-52.
57. Curtis C, Shah SP, Chin S-F, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 18 avr 2012;486(7403):346-52.
58. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 1 juin 2010;28(16):2784-95.
59. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 16 nov 2011;103(22):1656-64.
60. Alluri P, Newman L. Basal-like and Triple Negative Breast Cancers: Searching For Positives Among Many Negatives. *Surg Oncol Clin N Am.* juill 2014;23(3):567-77.
61. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* févr 2011;24(2):157-67.
62. Toft DJ, Cryns VL. Minireview: Basal-Like Breast Cancer: From Molecular Profiles to Targeted Therapies. *Mol Endocrinol.* févr 2011;25(2):199-211.
63. Carlson JJ, Roth JA. The impact of the Oncotype Dx breast cancer assay in clinical practice: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* août 2013;141(1):13-22.
64. Jensen M-B, Lænkholm A-V, Balslev E, Buckingham W, Ferree S, Glavicic V, et al. The Prosigna 50-gene profile and responsiveness to adjuvant anthracycline-based chemotherapy in high-risk breast cancer patients. *Npj Breast Cancer.* 26 févr 2020;6(1):1-9.
65. Almstedt K, Mendoza S, Otto M, Battista MJ, Steetskamp J, Heimes AS, et al. EndoPredict® in early hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2020;182(1):137-46.
66. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and Clinical Utility of a 70-Gene Prognostic Signature for Women With Node-Negative Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 6 sept 2006;98(17):1183-92.

67. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 1 août 2019;30(8):1194-220.
68. Morris AD, Morris RD, Wilson JF, White J, Steinberg S, Okunieff P, et al. Breast-conserving therapy vs mastectomy in early-stage breast cancer: a meta-analysis of 10-year survival. *Cancer J Sci Am.* févr 1997;3(1):6-12.
69. Gupta A, Ohri N, Haffty BG. Hypofractionated radiation treatment in the management of breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* août 2018;18(8):793-803.
70. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *Lancet.* 12 nov 2011;378(9804):1707-16.
71. Effets secondaires - Radiothérapie [Internet]. [cité 23 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Radiotherapie/Effets-secondaires>
72. Benveniste MF, Gomez D, Carter BW, Betancourt Cuellar SL, Shroff GS, Benveniste APA, et al. Recognizing Radiation Therapy-related Complications in the Chest. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc.* avr 2019;39(2):344-66.
73. Sporn MB, Lippman SM. Agents for Chemoprevention and Their Mechanism of Action. *Holl-Frei Cancer Med 6th Ed* [Internet]. 2003 [cité 24 févr 2021]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12522/>
74. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 27 août 2011;378(9793):771-84.
75. Krauss K, Stickeler E. Endocrine Therapy in Early Breast Cancer. *Breast Care Basel Switz.* août 2020;15(4):337-46.
76. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet Lond Engl.* 3 oct 2015;386(10001):1341-52.
77. Anti-œstrogènes - Hormonothérapie [Internet]. [cité 24 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Hormonotherapie/Anti-oestrogenes>
78. Hui R, de Boer R, Lim E, Yeo B, Lynch J. CDK4/6 inhibitor plus endocrine therapy for hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer: The new standard of care. *Asia Pac J Clin Oncol.* janv 2021;17 Suppl 1:3-14.
79. Stamatiades GA, Kaiser UB. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: signaling and gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 5 mars 2018;463:131-41.

80. Agonistes de la LH-RH - Hormonothérapie [Internet]. [cité 25 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Hormonotherapie/Agonistes-de-la-LH-RH>
81. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J-H, Sledge G, Geyer CE, et al. Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Planned Joint Analysis of Overall Survival From NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol*. 20 nov 2014;32(33):3744-52.
82. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H, Roman L, Tseng L-M, Liu M-C, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. janv 2012;13(1):25-32.
83. Pondé NF, Zardavas D, Piccart M. Progress in adjuvant systemic therapy for breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. janv 2019;16(1):27-44.
84. Heys SD, Sarkar T, Hutcheon AW. Primary docetaxel chemotherapy in patients with breast cancer: impact on response and survival. *Breast Cancer Res Treat*. mars 2005;90(2):169-85.
85. Chang HR, Glaspy J, Allison MA, Kass FC, Elashoff R, Chung DU, et al. Differential response of triple-negative breast cancer to a docetaxel and carboplatin-based neoadjuvant treatment. *Cancer*. 15 sept 2010;116(18):4227-37.
86. AJCC - Updated Breast Chapter for 8th Edition [Internet]. [cité 17 août 2020]. Disponible sur: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Pages/Breast-Cancer-Staging.aspx>
87. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurteloup P. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol*. juin 1993;16(3):223-8.
88. Penault-Llorca F, Abrial C, Raoelfils I, Cayre A, Mouret-Reynier M-A, Leheurteur M, et al. Comparison of the prognostic significance of Chevallier and Sataloff's pathologic classifications after neoadjuvant chemotherapy of operable breast cancer. *Hum Pathol*. 1 août 2008;39(8):1221-8.
89. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg*. mars 1995;180(3):297-306.
90. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of Residual Breast Cancer Burden to Predict Survival After Neoadjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1 oct 2007;25(28):4414-22.
91. Wang-Lopez Q, Chalabi N, Abrial C, Radosevic-Robin N, Durando X, Mouret-Reynier M-A, et al. Can pathologic complete response (pCR) be used as a surrogate marker of survival after neoadjuvant therapy for breast cancer? *Crit Rev Oncol Hematol*. juill 2015;95(1):88-104.

92. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet Lond Engl*. 12 juill 2014;384(9938):164-72.
93. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J-U, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mai 2012;30(15):1796-804.
94. Broglio KR, Quintana M, Foster M, Olinger M, McGlothlin A, Berry SM, et al. Association of Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Therapy in HER2-Positive Breast Cancer With Long-Term Outcomes: A Meta-Analysis. *JAMA Oncol*. 1 juin 2016;2(6):751-60.
95. Spring LM, Fell G, Arfe A, Sharma C, Greenup R, Reynolds KL, et al. Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy and impact on breast cancer recurrence and survival: a comprehensive meta-analysis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 juin 2020;26(12):2838-48.
96. Luen SJ, Salgado R, Dieci MV, Vingiani A, Curigliano G, Gould RE, et al. Prognostic implications of residual disease tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden in triple-negative breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 févr 2019;30(2):236-42.
97. Silva LCFF, de Arruda LSM, David WJ, Cruz FJSM, Trufelli DC, del Giglio A. Hormone receptor-negative as a predictive factor for pathologic complete response to neoadjuvant therapy in breast cancer. *Einstein [Internet]*. 17 janv 2019 [cité 1 avr 2021];17(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6355205/>
98. McGowan JV, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017;31(1):63-75.
99. Venkatesh P, Kasi A. Anthracyclines. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cité 30 mars 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538187/>
100. Ogino MH, Tadi P. Cyclophosphamide. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cité 1 avr 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553087/>
101. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, Mamounas EP, Fisher B, et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 mai 2006;24(13):2019-27.
102. Farha NG, Kasi A. Docetaxel [Internet]. *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing; 2020 [cité 6 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537242/>

103. Ward S, Simpson E, Davis S, Hind D, Rees A, Wilkinson A. Taxanes for the adjuvant treatment of early breast cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess Winch Engl.* oct 2007;11(40):1-144.
104. Loibl S, O'Shaughnessy J, Untch M, Sikov WM, Rugo HS, McKee MD, et al. Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 1 avr 2018;19(4):497-509.
105. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 janv 2015;33(1):13-21.
106. Loibl S, Weber KE, Timms KM, Elkin EP, Hahnen E, Fasching PA, et al. Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response—final results from GeparSixto. *Ann Oncol.* 1 déc 2018;29(12):2341-7.
107. Hahnen E, Lederer B, Hauke J, Loibl S, Kröber S, Schneeweiss A, et al. Germline Mutation Status, Pathological Complete Response, and Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncol.* oct 2017;3(10):1378-85.
108. Masuda N, Lee S-J, Ohtani S, Im Y-H, Lee E-S, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med.* 1 juin 2017;376(22):2147-59.
109. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chem.* juill 2019;88:102925.
110. Walko CM, Lindley C. Capecitabine: a review. *Clin Ther.* janv 2005;27(1):23-44.
111. Tao JJ, Visvanathan K, Wolff AC. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Breast Edinb Scotl.* nov 2015;24(0 2):S149-53.
112. Liem GS, Mo FKF, Pang E, Suen JJS, Tang NLS, Lee KM, et al. Chemotherapy-Related Amenorrhea and Menopause in Young Chinese Breast Cancer Patients: Analysis on Incidence, Risk Factors and Serum Hormone Profiles. *PLoS ONE [Internet].* 20 oct 2015 [cité 11 avr 2021];10(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4613138/>
113. Del Mastro L, Catzeddu T, Boni L, Bell C, Sertoli MR, Bighin C, et al. Prevention of chemotherapy-induced menopause by temporary ovarian suppression with goserelin in young, early breast cancer patients. *Ann Oncol.* 1 janv 2006;17(1):74-8.
114. Mar Fan HG, Houédé-Tchen N, Chemerynsky I, Yi Q-L, Xu W, Harvey B, et al. Menopausal symptoms in women undergoing chemotherapy-induced and natural menopause: a prospective controlled study. *Ann Oncol.* 1 mai 2010;21(5):983-7.

115. Passildas J, Collard O, Savoye A-M, Dohou J, Ginzac A, Thivat E, et al. Impact of Chemotherapy-induced Menopause in Women of Childbearing Age With Non-metastatic Breast Cancer - Preliminary Results From the MENOCOR Study. *Clin Breast Cancer*. 2019;19(1):e74-84.
116. Hiam-Galvez KJ, Allen BM, Spitzer MH. Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer*. 9 avr 2021;1-15.
117. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau C-S, et al. IL17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 18 juin 2015;522(7556):345-8.
118. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. juin 2014;106(6):dju124.
119. Casbon A-J, Reynaud D, Park C, Khuc E, Gan DD, Schepers K, et al. Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 févr 2015;112(6):E566-75.
120. Wu W-C, Sun H-W, Chen H-T, Liang J, Yu X-J, Wu C, et al. Circulating hematopoietic stem and progenitor cells are myeloid-biased in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 mars 2014;111(11):4221-6.
121. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*. déc 2015;15(12):731-44.
122. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 17 juill 2014;41(1):49-61.
123. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*. 1 oct 2018;32(19-20):1267-84.
124. Kersten K, Coffelt SB, Hoogstraat M, Verstegen NJM, Vrijland K, Ciampricotti M, et al. Mammary tumor-derived CCL2 enhances pro-metastatic systemic inflammation through upregulation of IL1 β in tumor-associated macrophages. *Oncoimmunology* [Internet]. 19 juin 2017 [cité 25 mai 2021];6(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5593698/>
125. Jaillon S, Ponzetta A, Di Mitri D, Santoni A, Bonecchi R, Mantovani A. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nat Rev Cancer*. sept 2020;20(9):485-503.
126. Iannello A, Thompson TW, Ardolino M, Marcus A, Raulet DH. Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. *Curr Opin Immunol*. févr 2016;38:52-8.
127. Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-

- analysis. BMC Cancer [Internet]. 4 mars 2020 [cité 13 janv 2021];20. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7057662/>
128. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 19 mars 2010;140(6):883-99.
129. Allaoui R, Hagerling C, Desmond E, Warfvinge C-F, Jirström K, Leandersson K. Infiltration of $\gamma\delta$ T cells, IL-17+ T cells and FoxP3+ T cells in human breast cancer. *Cancer Biomark Sect Dis Markers*. 8 déc 2017;20(4):395-409.
130. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 22 mars 2012;12(4):252-64.
131. Axelrod ML, Nixon MJ, Gonzalez-Ericsson PI, Bergman RE, Pilkinton MA, McDonnell WJ, et al. Changes in Peripheral and Local Tumor Immunity after Neoadjuvant Chemotherapy Reshape Clinical Outcomes in Patients with Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 nov 2020;26(21):5668-81.
132. Cuello-López J, Fidalgo-Zapata A, López-Agudelo L, Vásquez-Trespalcios E. Platelet-to-lymphocyte ratio as a predictive factor of complete pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *PloS One*. 2018;13(11):e0207224.
133. Patel DA, Xi J, Luo J, Hassan B, Thomas S, Ma CX, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of survival in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. avr 2019;174(2):443-52.
134. Cho U, Park HS, Im SY, Yoo CY, Jung JH, Suh YJ, et al. Prognostic value of systemic inflammatory markers and development of a nomogram in breast cancer. *PloS One*. 2018;13(7):e0200936.
135. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 19 déc 2002;420(6917):860-7.
136. Romero-Cordoba S, Meneghini E, Sant M, Iorio MV, Sfondrini L, Paolini B, et al. Decoding Immune Heterogeneity of Triple Negative Breast Cancer and Its Association with Systemic Inflammation. *Cancers*. juill 2019;11(7):911.
137. Chen L, Kong X, Yan C, Fang Y, Wang J. The Research Progress on the Prognostic Value of the Common Hematological Parameters in Peripheral Venous Blood in Breast Cancer. *OncoTargets Ther*. 2020;13:1397-412.
138. Zhang Y, Sun Y, Zhang Q. Prognostic value of the systemic immune-inflammation index in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int*. 9 juin 2020;20(1):224.
139. Bergin ART, Loi S. Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. F1000Research [Internet]. 2 août 2019 [cité 24 mars 2021];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6681627/>

140. Schmid P, Cortes J, Puzstai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 27 févr 2020;382(9):810-21.
141. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 mars 2008;26(8):1275-81.
142. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: Clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer.* 1 sept 2009;45:27-40.
143. Pareja F, Geyer FC, Marchiò C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *Npj Breast Cancer.* 16 nov 2016;2(1):1-11.
144. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 11 nov 2010;363(20):1938-48.
145. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol.* 1 août 2012;23:vi7-12.
146. Gretchen GL, Burke A, Anderson WF. EPIDEMIOLOGY OF TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCERS. *Breast Dis.* 2010;32(0):5-24.
147. Kwan ML, Kushi LH, Weltzien E, Maring B, Kutner SE, Fulton RS, et al. Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Res.* juin 2009;11(3):1-13.
148. Phipps AI, Buist DSM, Malone KE, Barlow WE, Porter PL, Kerlikowske K, et al. Family History of Breast Cancer in First-Degree Relatives and Triple-Negative Breast Cancer Risk. *Breast Cancer Res Treat.* avr 2011;126(3):671-8.
149. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clin Cancer Res.* 15 avr 2007;13(8):2329-34.
150. Pogoda K, Niwińska A, Murawska M, Pieńkowski T. Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients. *Med Oncol Northwood Lond Engl [Internet].* mars 2013 [cité 8 févr 2021];30(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586394/>
151. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res.* 1 août 2007;13(15):4429-34.
152. Dawood S, Broglio K, Esteva FJ, Yang W, Kau S-W, Islam R, et al. Survival among women with triple receptor-negative breast cancer and brain metastases. *Ann Oncol.* avr 2009;20(4):621-7.

153. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 juill 2010;28(20):3271-7.
154. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong Y-N, et al. Clinicopathological Features, Patterns of Recurrence, and Survival Among Women With Triple-Negative Breast Cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer*. 15 nov 2012;118(22):5463-72.
155. Urru SAM, Gallus S, Bosetti C, Moi T, Medda R, Sollai E, et al. Clinical and pathological factors influencing survival in a large cohort of triple-negative breast cancer patients. *BMC Cancer* [Internet]. 8 janv 2018 [cité 24 mai 2021];18. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5759886/>
156. Ho AY, Gupta G, King TA, Perez CA, Patil SM, Rogers KH, et al. Favorable prognosis in patients with T1a/T1bN0 triple-negative breast cancers treated with multimodality therapy. *Cancer*. 15 oct 2012;118(20):4944-52.
157. Bao J, Donovan C, Amersi F, Zhang X, Giuliano AE, Chung A. Outcomes in patients with small node-negative invasive breast cancer. *Breast J*. 2019;25(4):638-43.
158. Dalenc F, Penault-Llorca F, Cohen M, Houvenaeghel G, Piat J-M, Liegeois P, et al. Daily Practice Management of pT1a-b pN0 Breast Carcinoma: A Prospective French ODISSEE Cohort Study. *Clin Breast Cancer*. avr 2017;17(2):107-16.
159. Hernandez-Aya LF, Chavez-MacGregor M, Lei X, Meric-Bernstam F, Buchholz TA, Hsu L, et al. Nodal Status and Clinical Outcomes in a Large Cohort of Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 1 juill 2011;29(19):2628-34.
160. Wang X-X, Jiang Y-Z, Li J-J, Song C-G, Shao Z-M. Effect of nodal status on clinical outcomes of triple-negative breast cancer: a population-based study using the SEER 18 database. *Oncotarget*. 18 mai 2016;7(29):46636-45.
161. Bellon JR, Burstein HJ, Frank ES, Mittendorf EA, King TA. Multidisciplinary considerations in the treatment of triple-negative breast cancer. *CA Cancer J Clin*. nov 2020;70(6):432-42.
162. Pinard C, Debled M, Ben Rejeb H, Velasco V, Tunon de Lara C, Hoppe S, et al. Residual cancer burden index and tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in triple-negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. janv 2020;179(1):11-23.
163. Laas E, Labrosse J, Hamy A-S, Benchimol G, de Croze D, Feron J-G, et al. Determination of breast cancer prognosis after neoadjuvant chemotherapy: comparison of Residual Cancer Burden (RCB) and Neo-Bioscore. *Br J Cancer*. avr 2021;124(8):1421-7.
164. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Hatano T, et al. Prediction of survival after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer by evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden. *BMC Cancer*. 28 déc 2017;17(1):888.

165. Pruneri G, Vingiani A, Denkert C. Tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. *Breast Edinb Scotl.* févr 2018;37:207-14.
166. Tumor-Infiltrating Lymphocytes - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cité 27 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com.proxy.insermbiblio.inist.fr/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/tumor-infiltrating-lymphocytes>
167. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 janv 2010;28(1):105-13.
168. Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, Yee HT, Oratz R, Formenti SC, et al. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* oct 2001;7(10):3025-30.
169. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol.* mars 2014;25(3):611-8.
170. Loi S, Dushyanthen S, Beavis PA, Salgado R, Denkert C, Savas P, et al. RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 mars 2016;22(6):1499-509.
171. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 mars 2013;31(7):860-7.
172. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* août 2014;25(8):1544-50.
173. Pruneri G, Gray KP, Vingiani A, Viale G, Curigliano G, Criscitiello C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a powerful prognostic marker in patients with triple-negative breast cancer enrolled in the IBCSG phase III randomized clinical trial 22-00. *Breast Cancer Res Treat.* juill 2016;158(2):323-31.
174. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol.* 20 sept 2014;32(27):2959-66.

175. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Hatano T, et al. Prediction of Treatment Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer by Subtype Using Tumor-infiltrating Lymphocytes. *Anticancer Res.* avr 2018;38(4):2311-21.
176. Krishnamurti U, Wetherilt CS, Yang J, Peng L, Li X. Tumor-infiltrating lymphocytes are significantly associated with better overall survival and disease-free survival in triple-negative but not estrogen receptor-positive breast cancers. *Hum Pathol.* juin 2017;64:7-12.
177. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* janv 2018;19(1):40-50.
178. Ruan M, Tian T, Rao J, Xu X, Yu B, Yang W, et al. Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes to pathological complete response in neoadjuvant treated triple-negative breast cancers. *Diagn Pathol.* 31 août 2018;13(1):66.
179. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol.* oct 2018;52(Pt 2):16-25.
180. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* févr 2015;26(2):259-71.
181. Wu TD, Madireddi S, de Almeida PE, Banchereau R, Chen Y-JJ, Chitre AS, et al. Peripheral T cell expansion predicts tumour infiltration and clinical response. *Nature.* mars 2020;579(7798):274-8.
182. Mjaess G, Chebel R, Karam A, Moussa I, Pretot D, Abi Tayeh G, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in urological tumors: an umbrella review of evidence from systematic reviews and meta-analyses. *Acta Oncol Stockh Swed.* 15 févr 2021;1-10.
183. McLellan P, Henriques J, Ksontini F, Doat S, Hammel P, Desrame J, et al. Prognostic value of the early change in neutrophil-to-lymphocyte ratio in metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* mai 2021;45(3):101541.
184. Holub K, Busato F, Gouy S, Sun R, Pautier P, Genestie C, et al. Analysis of Systemic Inflammatory Factors and Survival Outcomes in Endometrial Cancer Patients Staged I-III FIGO and Treated with Postoperative External Radiotherapy. *J Clin Med.* 12 mai 2020;9(5).
185. Estrade F, Lescure C, Muzellec L, Pedrono M, Palard X, Pracht M, et al. Lymphocytes and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Variations After Selective

- Internal Radiation Treatment for HCC: A Retrospective Cohort Study. *Cardiovasc Intervent Radiol.* août 2020;43(8):1175-81.
186. Gorphe P, Bouhir S, Garcia GCTE, Alali A, Even C, Breuskin I, et al. Anemia and neutrophil-to-lymphocyte ratio in laryngeal cancer treated with induction chemotherapy. *The Laryngoscope.* avr 2020;130(4):E144-50.
187. Corbeau I, Thezenas S, Maran-Gonzalez A, Colombo P-E, Jacot W, Guiu S. Inflammatory Blood Markers as Prognostic and Predictive Factors in Early Breast Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancers.* 18 sept 2020;12(9).
188. Van Berckelaer C, Van Geyt M, Linders S, Rypens C, Trinh XB, Tjalma WAA, et al. A high neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio are associated with a worse outcome in inflammatory breast cancer. *Breast Off J Eur Soc Mastology.* 17 août 2020;53:212-20.
189. Azab B, Amundson JR, Cioci A, Stuart H, Yakoub D, Avisar E, et al. The Usefulness of the Pretreatment Neutrophil/Lymphocyte Ratio as a Predictor of the 5-Year Survival in Stage 1-3 Triple Negative Breast Cancer Patients. *Breast Care Basel Switz.* févr 2021;16(1):43-9.
190. Bozkurt O, Karaca H, Berk V, Inanc M, Ocak Duran A, Ozaslan E, et al. Predicting the role of the pretreatment neutrophil to lymphocyte ratio in the survival of early triple-negative breast cancer patients. *J BUON Off J Balk Union Oncol.* déc 2015;20(6):1432-9.
191. Ren K, Yin Y, He F, Shao Y, Wang S. Prognostic role of derived neutrophil-to-lymphocyte ratio in surgical triple-negative breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2018;10:4891-8.
192. Pistelli M, De Lisa M, Ballatore Z, Caramanti M, Pagliacci A, Battelli N, et al. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio may be a useful tool in predicting survival in early triple negative breast cancer patients. *BMC Cancer.* 28 mars 2015;15:195.
193. Asano Y, Kashiwagi S, Onoda N, Noda S, Kawajiri H, Takashima T, et al. Predictive Value of Neutrophil/Lymphocyte Ratio for Efficacy of Preoperative Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2016;23:1104-10.
194. Chae S, Kang KM, Kim HJ, Kang E, Park SY, Kim JH, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio predicts response to chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Curr Oncol Tor Ont.* 2018;25(2):e113-9.
195. Lee J, Kim D-M, Lee A. Prognostic Role and Clinical Association of Tumor-Infiltrating Lymphocyte, Programmed Death Ligand-1 Expression with Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Locally Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc.* avr 2019;51(2):649-63.
196. Asano Y, Kashiwagi S, Onoda N, Noda S, Kawajiri H, Takashima T, et al. Platelet-Lymphocyte Ratio as a Useful Predictor of the Therapeutic Effect of Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *PloS One.* 2016;11(7):e0153459.

197. Huszno J, Kolosza Z. Prognostic value of the neutrophil-lymphocyte, platelet-lymphocyte and monocyte-lymphocyte ratio in breast cancer patients. *Oncol Lett.* déc 2019;18(6):6275-83.
198. Graziano V, Grassadonia A, Iezzi L, Vici P, Pizzuti L, Barba M, et al. Combination of peripheral neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio is predictive of pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Edinb Scotl.* avr 2019;44:33-8.
199. Vernieri C, Mennitto A, Prisciandaro M, Huber V, Milano M, Rinaldi L, et al. The neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios predict efficacy of platinum-based chemotherapy in patients with metastatic triple negative breast cancer. *Sci Rep.* 07 2018;8(1):8703.
200. Chen L, Kong X, Wang Z, Wang X, Fang Y, Wang J. Pretreatment Systemic Inflammation Response Index in Patients with Breast Cancer Treated with Neoadjuvant Chemotherapy as a Useful Prognostic Indicator. *Cancer Manag Res.* 3 mars 2020;12:1543-67.
201. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* sept 2008;14(9):985-90.
202. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, Cochran R, Croessmann S, Zabransky DJ, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 mai 2014;20(10):2643-50.
203. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci.* avr 2000;906:161-8.
204. Panagopoulou M, Karaglani M, Balgkouranidou I, Biziota E, Koukaki T, Karamitrousis E, et al. Circulating cell-free DNA in breast cancer: size profiling, levels, and methylation patterns lead to prognostic and predictive classifiers. *Oncogene.* 2019;38(18):3387-401.
205. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* sept 2016;35(3):347-76.
206. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 28 mars 2013;368(13):1199-209.
207. Coombes RC, Page K, Salari R, Hastings RK, Armstrong A, Ahmed S, et al. Personalized Detection of Circulating Tumor DNA Antedates Breast Cancer Metastatic Recurrence. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 2019;25(14):4255-63.
208. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 25 juill 2013;39(1):1-10.

209. Wang K, Xu J, Zhang T, Xue D. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: A meta-analysis. *Oncotarget*. 12 juill 2016;7(28):44288-98.
210. Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. avr 2012;132(3):793-805.
211. Russo L, Maltese A, Betancourt L, Romero G, Cialoni D, De la Fuente L, et al. Locally advanced breast cancer: Tumor-infiltrating lymphocytes as a predictive factor of response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. juin 2019;45(6):963-8.
212. Dieci MV, Tsvetkova V, Griguolo G, Miglietta F, Tasca G, Giorgi CA, et al. Integration of tumour infiltrating lymphocytes, programmed cell-death ligand-1, CD8 and FOXP3 in prognostic models for triple-negative breast cancer: Analysis of 244 stage I-III patients treated with standard therapy. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. sept 2020;136:7-15.
213. Chmel H. Role of monoclonal antibody therapy in the treatment of infectious disease. *Am J Hosp Pharm*. nov 1990;47(11 Suppl 3):S11-15.
214. Trédan O, Manuel M, Clapisson G, Bachelot T, Chabaud S, Bardin-dit-Courageot C, et al. Patients with metastatic breast cancer leading to CD4+ T cell lymphopaenia have poor outcome. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. mai 2013;49(7):1673-82.
215. Hyder J, Boggs DH, Hanna A, Suntharalingam M, Chuong MD. Changes in neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios during chemoradiation predict for survival and pathologic complete response in trimodality esophageal cancer patients. *J Gastrointest Oncol*. avr 2016;7(2):189-95.
216. Lee JH, Song C, Kang S-B, Lee HS, Lee K-W, Kim J-S. Predicting Pathological Complete Regression with Haematological Markers During Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer. *Anticancer Res*. déc 2018;38(12):6905-10.
217. Lusho S, Durando X, Bidet Y, Molnar I, Kossai M, Bernadach M, et al. PERCEPTION Trial protocol. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 11 déc 2020 [cité 13 janv 2021];99(50). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7738079/>
218. Takeuchi H, Kawanaka H, Fukuyama S, Kubo N, Hiroshige S, Yano T. Comparison of the prognostic values of preoperative inflammation-based parameters in patients with breast cancer. *PloS One*. 2017;12(5):e0177137.
219. Krenn-Pilko S, Langsenlehner U, Stojakovic T, Pichler M, Gerger A, Kapp KS, et al. The elevated preoperative derived neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts poor clinical outcome in breast cancer patients. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. janv 2016;37(1):361-8.

220. Kim HY, Kim TH, Yoon HK, Lee A. The Role of Neutrophil-lymphocyte Ratio and Platelet-lymphocyte Ratio in Predicting Neoadjuvant Chemotherapy Response in Breast Cancer. *J Breast Cancer*. sept 2019;22(3):425-38.
221. Azab B, Shah N, Radbel J, Tan P, Bhatt V, Vonfrolio S, et al. Pretreatment neutrophil/lymphocyte ratio is superior to platelet/lymphocyte ratio as a predictor of long-term mortality in breast cancer patients. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. mars 2013;30(1):432.
222. Liu C, Huang Z, Wang Q, Sun B, Ding L, Meng X, et al. Usefulness of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in hormone-receptor-negative breast cancer. *OncoTargets Ther*. 2016;9:4653-60.
223. Qiu X, Song Y, Cui Y, Liu Y. Increased neutrophil-lymphocyte ratio independently predicts poor survival in non-metastatic triple-negative breast cancer patients. *IUBMB Life*. juin 2018;70(6):529-35.