



HAL
open science

Impact clinique de l'expression de STARD3 dans le cancer du sein HER2-positif chez la femme

Massimo Lodi

► **To cite this version:**

Massimo Lodi. Impact clinique de l'expression de STARD3 dans le cancer du sein HER2-positif chez la femme. Cancer. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAJ024 . tel-04197548

HAL Id: tel-04197548

<https://theses.hal.science/tel-04197548>

Submitted on 6 Sep 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.



Université de Strasbourg

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)

*Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)
CNRS UMR 7104 – INSERM U1258 – Université de Strasbourg – Illkirch, France*

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR LE DIPLÔME

DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

PAR

Massimo LODI

soutenue le : 30 juin 2023

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Impact clinique de l'expression de STARD3 dans le cancer du sein HER2-positif chez la femme

Directrice de thèse : Dr Catherine TOMASETTO, DR2 (Université de Strasbourg)

Rapporteurs externes : Dr Emmanuelle LIAUDET-COOPMAN, DR2 (Université de Montpellier), Pr Olivier GRAESSLIN, PU-PH (Université de Reims)

Examineur interne : Dr Valérie LAMOUR, MCU (Université de Strasbourg)

Examineurs externes : Pr François GOLFIER, PU-PH (Université de Lyon)

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ma thèse.

Tout d'abord, j'aimerais exprimer ma profonde gratitude envers ma directrice de thèse, le Dr Catherine-Laure Tomasetto. Depuis que vous m'avez accueilli dans votre équipe lors de mon master 2, votre encadrement, votre patience et votre rigueur m'ont fait énormément progresser. J'ai beaucoup d'estime non seulement pour vos qualités professionnelles, mais également pour votre façon de diriger l'équipe où on s'y sent écoutés et respectés.

Je tiens également à remercier les membres du comité de thèse, le Docteur Emmanuelle Liaudet-Coopman, le Professeur Olivier Graesslin, le Docteur Valérie Lamour et le Professeur François Golfier pour avoir consacré leur temps et leur expertise à l'évaluation de ma thèse.

Je remercie sincèrement Madame le Professeur Marie-Pierre Chenard, sans qui ne n'aurais pas pu mener à bien ce travail. Votre expertise au quotidien, votre disponibilité et votre engagement sont un vrai exemple pour moi. Merci pour toutes ces heures où nous avons travaillé ensemble, pour ce que vous m'avez appris et pour toutes les discussions que nous avons eu.

Je remercie l'Institut National du Cancer (INCa), la Ligue Contre le Cancer ainsi que les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg pour leur soutien financier de ce projet de recherche.

Mes remerciements vont également à toute l'équipe du laboratoire avec qui j'ai pu partager sur le plan professionnel et personnel depuis mon année-recherche : Fabien, Corinne, Laetitia, Martinette, Thomas, Thien-Nga, Amélie, Mehdi, Célestine (et ton rire).

Je tiens également à remercier les équipes des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg et de l'ICANS. Madame le Professeur Carole Mathelin : je vous remercie infiniment pour tout ce que vous m'avez appris au fil de ces années, merci de m'avoir accueilli dans votre équipe, de m'avoir transmis la passion pour la sénologie, de m'avoir guidé et soutenu. Je n'oublierai jamais tout ce que vous avez fait pour moi. Mousselim Gharbi : merci Mouss pour m'avoir guidé dès mes débuts en chirurgie, de m'avoir formé et d'être toujours disponible pour aider ou pour donner un bon conseil. Merci aussi pour tous les moments qu'on a partagé à manger entre deux bloc, ou les papotages avec le café. Carole Hild : merci Carole car même si on travaille ensemble depuis moins longtemps, toi aussi tu m'as beaucoup appris sur la sénologie et sur le plan chirurgical. Merci aussi pour tout le reste et ton soutien ! Toute l'équipe du service de sénologie,

notamment les IBODE et IADE. L'équipe de gynécologie-obstétrique des HUS, les sage-femmes d'Haute-pierre, les IBODE. L'équipe du laboratoire de pathologie des HUS, notamment Martine Muckensturm et Alexandre. Mes chefs pendant mon internat : Lise, Mary, Eric, Émilie, Thomas, Chérif, Antoine, Philippe... Mes co-chefs pendant le clinicat : Mado la rigolo, Ritchie, Camille, Patesss. Ma promo « d'origine » Strassele et ma promo d'accueil. Mes co-internes : super Lapointe, PLF, Petry, la mère Birckel, Baby, Axel... Mes anciens internes : Alexandre aka le Pr Pessaire, Dja & Nathan (des sacrés rigolos), Yohan (ça se prononce comme Johanne ou J-Lo), Gandalf, et toute la team ouvre-boites (bravo pour vos CAP césarienne). Mes externes préférés : Olivier (finis ton tour stp), Valentine aka Wadidou et Jean

Je remercie ma famille, en premier mes deux amours : Irene (la mini-belette) et Laure (la belle belette), sans qui rien n'aurait du sens. Merci à Mamma e Papà pour m'avoir créé et d'avoir fait ce que vous avez pu pour m'éduquer, pour votre amour et pour tout le reste. Merci aussi à ma belle-famille de m'avoir accepté (Isa & Antoine, Alexandre, Eliette, Olivier & Marie-Christine, Amaury & Odile, les 48 cousins que je connais tous maintenant)

Ensuite, je remercie tous mes amis qui me supportent depuis plus ou moins longtemps : Gio (YKWGWPKTCZQJUZOWPKVS, la chiave sei te), Giulio (c'era una papera nel campo) Justin (et tes femmes géniales) et Paul (et ta femme géniale), le club des Çorciers (Riton, Wabeth, Marie, Typhaine et Flowi ; les vieilles branches du lycée), Boris (je t'aime bien, c'est trop long sinon), Kevinou (mon co-équipier dans la forêt, et merci à Fanny sa future femme de me le prêter de temps en temps), Giulia (scusa per il gelato), Louise (pour la 1ère thèse et aussi pour m'avoir appris la définition d'un congre), Adrien (mais oui t'es beau), Diane (on va y arriver), Philou (j'attends toujours la soirée fondue), Vincent (mon deuxième prix de la coloc', merci de m'avoir toujours encouragé à travailler à l'hôpital), les gods de la gynéco, Titi (l'ancien futur témoin de Laure) et son Doudou.

Enfin, je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance envers toutes les patientes anonymes qui ont participé à ma recherche.

Merci du fond du cœur.

Massimo Lodi

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	1
1. GENERALITES	3
1.1. Le cancer du sein	3
1.1.1. Épidémiologie	3
1.1.2. Les facteurs de risque	5
1.1.3. Histoire naturelle	8
1.1.3.1. Anatomie macroscopique du sein	8
1.1.3.2. Anatomie microscopique du sein	11
1.1.3.3. Processus de cancérisation	13
1.1.4. Les capacités distinctives « hallmarks » du cancer	14
1.1.4.1. Maintien d'une signalisation proliférative	15
1.1.4.2. Évitement des suppresseurs de croissance	16
1.1.4.3. Résistance à la mort cellulaire	16
1.1.4.4. Immortalité réplivative	17
1.1.4.5. Induction de l'angiogenèse	18
1.1.4.6. Activation de l'invasion et des métastases	19
1.1.4.7. Reprogrammation du métabolisme énergétique	21
1.1.4.8. Évitement de la destruction immunitaire	22
1.1.4.9. Instabilité du génome	23
1.1.4.10. Inflammation	25
1.1.4.11. Déblocage de la plasticité phénotypique	25
1.1.4.12. Reprogrammation épigénétique non-mutationnelle	26
1.1.4.13. Polymorphisme du microbiome	27
1.1.4.14. Les cellules sénescentes	28
1.1.5. Micro-environnement tumoral	31
1.1.6. Diagnostic	33
1.1.6.1. Physiopathologie	33
1.1.6.2. Invasivité	34
1.1.6.3. Sous-types histologiques	36
1.1.6.4. Grade tumoral	39
1.1.6.5. Facteurs pronostiques et prédictifs	40
1.1.6.6. Classification moléculaire	43
1.1.6.7. Stadification	47
1.1.7. Traitements	52
1.1.7.1. Chirurgie	52
1.1.7.1.1. Historique de la chirurgie du cancer du sein	52
1.1.7.1.2. Chirurgie de l'aire mammaire	53
1.1.7.1.3. Chirurgie de l'aire axillaire	56
1.1.7.2. Traitements systémiques	58
1.1.7.2.1. Chimiothérapie	58
1.1.7.2.2. Hormonothérapie	60
1.1.7.2.3. Thérapies ciblées	62
1.1.7.2.4. Immunothérapie	64
1.1.7.3. Radiothérapie	65
1.2. Le cancer du sein HER2+	69
1.2.1. Le récepteur HER2	69
1.2.1.1. Historique d'HER2	69
1.2.1.2. Les récepteurs tyrosine kinase	73
1.2.1.3. Rôle physiologique d'HER2	74
1.2.1.4. Structure d'HER2	74

1.2.1.5.	Voies de signalisation d'HER2	75
1.2.2.	HER2 et cancer	77
1.2.2.1.	Amplification et surexpression d'HER2	77
1.2.2.2.	Diagnostic de l'amplification et de l'expression d'HER2 en cancérologie	77
1.2.3.	Thérapies ciblées anti-HER2	81
1.2.3.1.	Anticorps monoclonaux	81
1.2.3.1.1.	Trastuzumab	81
1.2.3.1.1.	Pertuzumab	82
1.2.3.1.1.	Margetuximab	83
1.2.3.2.	Anticorps conjugués	83
1.2.3.2.1.	Trastuzumab-emtansine (TDM-1)	84
1.2.3.2.2.	Trastuzumab-deruxtecan	85
1.2.3.3.	Inhibiteurs de tyrosine kinase	86
1.2.3.3.1.	Lapatinib	86
1.2.3.3.2.	Neraparib	88
1.2.3.3.1.	Pyrotinib	89
1.2.3.3.1.	Tucatinib	89
1.2.4.	Résistances aux thérapies ciblées	90
1.2.5.	Les thérapies anti-HER2 de nouvelle génération	93
1.3.	Le traitement systémique néoadjuvant (TSN)	96
1.3.1.	Schémas du TSN pour les cancers HER2+	96
1.3.2.	Indications du TSN pour les cancers HER2+	98
1.3.3.	Réponse au TSN	99
1.3.3.1.	Quantification et mesure	99
1.3.3.2.	Les taux de réponse histologique complète	102
1.3.3.3.	Pronostic : valeur la réponse histologique complète	103
1.3.3.4.	Prédiction : méthodes actuellement disponibles	104
1.4.	STARD3	107
1.4.1.	Historique	107
1.4.2.	Gène STARD3	107
1.4.3.	La protéine STARD3	108
1.4.3.1.	Structure et localisation	109
1.4.3.2.	Fonction : étude fonctionnelle de STARD3	111
1.4.4.	STARD3 et cancer du sein	128
2.	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE CETTE THESE	130
3.	RESULTATS	132
3.1.	Analyse préclinique de la vulnérabilité de HER2 à STARD3	132
3.1.1.	Hypothèses	132
3.1.2.	Méthodologie	133
3.1.3.	La croissance des tumeurs HER2+ est compromise par l'inhibition de STARD3	135
3.2.	Quantification immunohistochimique de STARD3 dans le cancer du sein HER2+	138
3.2.1.	Constitution de la cohorte	138
3.2.2.	Déclarations éthiques	139
3.2.3.	Développement de la technique d'immunohistochimie	140
3.2.3.1.	Désarchivage des blocs de pathologie et traitement initial	141
3.2.3.2.	Microtomie	141
3.2.3.3.	Système automatisé de coloration des lames IHC STARD3	143
3.2.3.4.	Post-traitement	144
3.2.3.5.	Lecture et sauvegarde des lames	145
3.2.4.	Étude de l'expression de STARD3 en immunohistochimie	145
3.2.4.1.	L'intensité du signal STARD3	146
3.2.4.2.	Le pourcentage de cellules cancéreuses STARD3-positives	147
3.2.4.3.	Le motif et de la distribution du signal STARD3	148

3.2.4.4.	Localisation de STARD3 dans le carcinome canalaire in situ	150
3.3.	Développement du score STARD3	151
3.3.1.	Comparaison de l'expression de STARD3 selon la réponse complète histologique	151
3.3.2.	Classifications supervisées par différents modèles de machine learning à partir des paramètres immunohistochimiques de STARD3	152
3.3.2.1.	Méthodologie	152
3.3.2.2.	Résultats	154
3.3.3.	Classification non supervisée par machine learning à partir des paramètres immunohistochimiques de STARD3	156
3.3.3.1.	Méthodologie	156
3.3.3.2.	Résultats	156
3.3.4.	Étude du poids des paramètres immunohistochimiques de STARD3	158
3.3.4.1.	Méthodologie	158
3.3.4.2.	Comparaison des modèles	159
3.3.4.3.	Pondération des variables dans la régression logistique	159
3.3.5.	Conclusion sur le score STARD3	160
3.4.	STARD3 : un nouveau biomarqueur dans le cancer du sein HER2-positif	161
3.4.1.	Corrélation entre l'amplification et l'expression de HER2 et STARD3 par analyse des banques de données publiques	161
3.4.2.	Valeur prédictive de STARD3 sur la réponse histologique complète	161
3.4.3.	Valeur pronostique de STARD3	161
3.4.4.	Impact du traitement systémique néoadjuvant sur l'expression de STARD3	161
3.5.	Valeur diagnostique de STARD3 dans les HER2 score 2+	184
3.5.1.	Constitution de la cohorte	184
3.5.2.	Paramètres associés à l'amplification d'HER2 en SISH	185
3.5.3.	Analyse immunohistochimique de STARD3	186
3.5.4.	Analyse multivariée	187
3.5.5.	Corrélation entre le signal granulaire de STARD3 et le nombre de copies d'HER2	189
3.5.6.	Performances diagnostiques de STARD3	191
3.5.7.	Développement d'un score multi-paramétrique de prédiction de l'amplification d'HER2 en cas de score immunohistochimique 2+	193
4.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	196
4.1.	La prédiction de la réponse thérapeutique avec STARD3	196
4.1.1.	Modifications du protocole du traitement systémique néoadjuvant	196
4.1.2.	Modifications de la séquence thérapeutique initiale	198
4.1.3.	Les autres moyens de prédiction de la réponse thérapeutique	198
4.2.	STARD3 est-il un marqueur de mauvais pronostic ?	199
4.3.	Utilisation du score immunohistochimique de STARD3 au moment du diagnostic	202
4.4.	STARD3 en tant que cible thérapeutique dans le cancer du sein HER2+	203
4.4.1.	Les inhibiteurs de STARD3 publiés dans la littérature	204
4.4.2.	Perspective : le développement d'un nouvel inhibiteur de STARD3	204
4.4.3.	Les applications potentielles des inhibiteurs de STARD3 en cancérologie mammaire	206
4.4.4.	Les autres applications possibles des inhibiteurs de STARD3	207
5.	CONCLUSION	208
6.	BIBLIOGRAPHIE	209

FIGURES

Figure 1. Risque cumulé de développer et de décéder un cancer chez la femme (0 à 74 ans) dans le monde et en France en 2020. Source : Globocan (gco.iarc.fr).....	4
Figure 2. Anatomie macroscopique et microscopique du sein. D'après P. Kamina (29)	9
Figure 3. Les capacités distinctives du cancer en 2022. Image reproduite d'après Hanahan (32)	15
Figure 4. Représentation de l'évolution génomique des cancers du sein métastatiques. Image reproduite d'après Yates et al. (33)	21
Figure 5. Schématisation du micro-environnement tumoral. Image reproduite d'après Hanahan et al. (31).....	32
Figure 6. Représentation schématique du processus de cancérisation et d'invasion (en sens horaire) ..	36
Figure 7. Historique de la chirurgie loco-régionale du cancer du sein	53
Figure 8. Évolution d'HER2 en tant que biomarqueur et cible thérapeutique. Image reproduite d'après Swain et al. (2023) (116).....	72
Figure 9. Évaluation d'HER2 dans le cancer du sein. D'après les recommandations de l'ASCO/CAP 2018 (disponibles sur www.asco.org/breast-cancer-guidelines).....	80
Figure 10. Mécanismes de résistance aux traitements anti-HER2. Image reproduite d'après Swain et al. (2023) (116).....	92
Figure 11. Taux de réponse histologique complète selon le sous-type moléculaire et selon le traitement, d'après Cortazar et al. (202).....	103
Figure 12. Expression de l'ARN de STARD3 selon le tissu chez l'humain. D'après The Human Protein Atlas (accessible sur www.proteinatlas.org)	108
Figure 13. STARD3, un transporteur du cholestérol dans les sites de contact membranaires entre le reticulum endoplasmique et les endosomes tardifs.....	110
Figure 14. STARD3 est nécessaire spécifiquement pour la croissance des cellules HER2+ et non pour les cellules HER2-.....	133
Figure 15. Analyse de la radiance des tumeurs HER2+ selon le groupe (siSTARD3/SiCtrl)	136
Figure 16. Comparaison de la taille clinique des tumeurs HER2+ selon le groupe siSTARD3/siCtrl	137
Figure 17. Diagramme de flux de la constitution de la cohorte.....	139
Figure 18. Matériel et automates utilisés pour le protocole d'immunohistochimie	142
Figure 19. Distribution de l'intensité du signal STARD3 dans les microbiopsies initiales (bleu) et pièces opératoires (gris)	147
Figure 20. Distribution du pourcentage de cellules positives pour STARD3 dans les microbiopsies initiales (rouge) et dans les pièces opératoires (gris).....	148
Figure 21. Motifs du signal de STARD3 en immunohistochimie.....	149
Figure 22. Workflow du développement des modèles prédictifs	154
Figure 23. Distribution du nombre de copies d'HER2 selon la présence d'un signal granulaire STARD3 en cas de HER2 score 2+	190
Figure 24. Arbre décisionnel obtenu à partir de l'algorithme pour la classification des tumeurs amplifiées ou non en cas de score HER2 2+	194

TABLEAUX

Tableau I. Score histopronostique de Scarff-Bloom-Richardson modifié par Eltson et Ellis (56)	40
Tableau II. Classification moléculaire des cancers du sein	46
Tableau III. Définitions de la classification T (TNM, UICC, AICC, 8 ^{ème} édition)	48
Tableau IV. Définitions de la classification cN (TNM, UICC, AICC, 8 ^{ème} édition).....	49
Tableau V. Définitions de la classification pN (TNM, UICC, AICC, 8 ^{ème} édition).....	50
Tableau VI. Définitions de la classification M (TNM, UICC, AICC, 8 ^{ème} édition).....	51
Tableau VII. Stades du cancer du sein selon la classification de l'UICC.	51
Tableau VIII. Les principales molécules cytotoxiques utilisées en cancérologie mammaire (traitements (néo)adjuvants).....	60
Tableau IX. Paramètres immunohistochimiques de STARD3.	146
Tableau X. Comparaison des caractéristiques de l'expression de STARD3 selon la réponse histologique	151
Tableau XI. Performances des modèles prédictifs basés uniquement sur les paramètres immunohistochimiques de STARD3.....	155
Tableau XII. Performances des modèles prédictifs basés sur les paramètres immunohistochimiques de STARD3 et les autres caractéristiques clinico-pathologiques initiales	155
Tableau XIII. Distribution en 10 clusters lors de l'analyse non supervisée.....	157
Tableau XIV. Comparaison des modèles de régression logistique du score immunohistochimique STARD3.....	159
Tableau XV. Paramètres associés à l'amplification d'HER2 dans la cohorte d'étude de la valeur diagnostique de STARD3.....	186
Tableau XVI. Paramètres de l'expression de STARD3 selon l'amplification d'HER2 à la SISH en cas d'HER2 score 2+	187
Tableau XVII. Analyse multivariée des paramètres immunohistochimiques associés avec l'amplification d'HER2.....	188
Tableau XVIII. Résultats des paramètres de la SISH selon la granularité du signal de STARD3 en cas de HER2 score 2+ et nombre de copies d'HER2 entre 4 et 6.....	191
Tableau XIX. Table de contingence de la valeur diagnostique du signal granulaire de STARD3 en cas d'HER2 score 2+	192
Tableau XX. Performances du signal granulaire de STARD3 en cas d'HER2 score 2+	192

ABREVIATIONS

AcM : les anticorps monoclonaux
ADC : antibody-drug conjugate
ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN : acide désoxyribonucléique
AIC : Akaike information criterion
AJCC : American Joint Committee on Cancer
AnDC : antibody neodegrader conjugate
ARN : acides ribonucléiques
ASCO: American Society of Clinical Oncology
BHE : barrière hémato-encéphalique
BHT : barrière hémato-tumorale
BIC : Bayesian Information Criterion
BLI bioluminescence
CA : curage axillaire
CAF : fibroblastes associés au cancer
CAP College of American Pathologists
CAR : Chimeric antigen receptors
CCIS carcinome canalaire in situ
CDC : Complement-mediated cytotoxicity
CDK4/6 : cyclin-dependent kinase 4/6
CEP17 : centromère du chromosome 17
CLIS : carcinome lobulaires in situ
DBD : DNA-Binding Domain
DIN : :Ductal In situ Neoplasia
EBCTCG : Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
ECD : extracellular domain
EGF / EGFR : epidermal growth factor et son récepteur
ERE / PRE : Estrogen / Progesterone Response Elements
ET : endosomes tardifs
FFAT : two phenylalanines in an acidic tract
FGF : Fibroblast Growth Factor
GEO : Gene Expression Omnibus
GEPIA : gene expression profile integrative analysis
GnRH : hormone de libération des gonadotrophines
HBOC : Hereditary Breast and Ovarian Cancer
HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HR : hazard ratio
RR : risque relatif
HSP : Heat Shock Protein
IC : intervalle de confiance
ICI : inhibiteurs de check-point immunitaire

IGF1R : insulin-like growth factor 1 receptor
IHC : immunohistochimie
INCa : Institut National du Cancer
ISH / FISH / CISH / SISH : hybridation in situ / par fluorescence / chromogène / argent
KO : Knock-out
LBD : Ligand-Binding Domain
LIN : Lobular In situ Neoplasia,
LTP : Lipid Transfer Proteins
MLN : Metastatic Lymph Node
MMP : métalloprotéases matricielles
mTOR : mammalian targets of rapamycin-riCTOR kinase
NOS : not otherwise specified » ou
NSM : nipple-sparing mastectomy
NTD : NH₂-terminal Domain
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PARP : poly(ADP-ribose) polymerase
pCR : réponse pathologique complète
PD-1/PD-L1 : Programmed Death receptor-1 et son ligand
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PSAS : phénotype sécrétoire associé à la sénescence
PTEN : phosphatase and tensin homolog
RCB : Residual Cancer Burden
RE : récepteurs aux estrogènes
RMI : reconstruction mammaire immédiate
ROI région d'intérêt
RP : récepteur à la progestérone
RTK : récepteurs tyrosine kinase
SCM sites de contact membranaire
SERD : Selective Estrogen Receptor Down regulator
SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator
SNC : système nerveux central
SSM : skin-sparing mastectomy
STARD3 : *Star-related lipid transfer Domain protein 3*
STROBE : Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology
T-DM1 : ado-trastuzumab emtansine
T-DXd : trastuzumab-deruxtecan
TC : traitement conservateur
TGF : Transforming Growth Factor
TIL : tumor-infiltrating lymphocytes
TKI : les inhibiteurs de la tyrosine kinase
TNM : tumor, node, metastasis
TSN : traitement systémique néoadjuvant
TSP-1 : thrombospondine-1

UDLT : unité ducto-lobulaire terminale

UICC : Union Internationale de Lutte contre le Cancer

VEGF-A : Vascular Endothelial Growth Factor-A

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications sur STARD3

- Lodi M, Voilquin L, Alpy F, Molière S, Reix N, Mathelin C, et al. STARD3: A New Biomarker in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15(2).
- Voilquin L, Lodi M, Di Mattia T, Chenard M-P, Mathelin C, Alpy F, et al. STARD3: A Swiss Army Knife for Intracellular Cholesterol Transport. *Contact*. 2019;2:251525641985673-.

Communications orales sur STARD3

- Lodi M, Chenard M-P, Alpy F, Mathelin C, Tomasetto C-L. STARD3 : un nouveau marqueur prédictif et pronostique de la réponse histologique complète dans le cancer du sein HER2-positif". Congrès national « Pari(s) Santé Femmes », Paris le mercredi 11 mai 2022

Autres publications en sénologie pendant la période de thèse (2019-2023)

en annexe

- Ouattara, D ; Mathelin, C ; Özmen, T ; Lodi, M , *Molecular Signatures in Ductal Carcinoma In Situ (DCIS): A Systematic Review and Meta-Analysis.*, **J Clin Med**, 2023, 12,
- Mathelin, C ; Domínguez-Gil, B ; Özmen, V ; Lodi, M , *European Guidelines Concerning the Transplantation of Organs from Donors with a History of Breast Cancer.*, **Eur J Breast Health**, 2023, 19, 106-109
- Lapointe, M ; Kerbaul, F ; Meckert, F ; Cognard, N ; Mathelin, C ; Lodi, M , *[Breast cancer and organ transplantation: Systematic review and meta-analysis].*, **Gynecol Obstet Fertil Senol**, 2023, 51, 60-72
- Mathelin, C ; Lodi, M ; Alghamdi, K ; Arboleda-Osorio, B ; Avisar, E ; Anyanwu, S & al , *The Senologic International Society Survey on Ductal Carcinoma In Situ: Present and Future.*, **Eur J Breast Health**, 2022, 18, 205-221
- Lodi, M ; Kiehl, A ; Qu, FL ; Gabriele, V ; Tomasetto, C ; Mathelin, C , *Lipid Intake and Breast Cancer Risk: Is There a Link? A New Focus and Meta-Analysis.*, **Eur J Breast Health**, 2022, 18, 108-126
- Mathelin, C ; Barranger, E ; Boisserie-Lacroix, M ; Boutet, G ; Brousse, S ; Chabbert-Buffet, N & al , *[Techniques and complications of non-genetic risk reducing mastectomies: Guidelines of the National College of French Gynecologists and Obstetricians (CNGOF)].*, **Gynecol Obstet Fertil Senol**, 2022, 50, 121-129
- Mathelin, C ; Barranger, E ; Boisserie-Lacroix, M ; Boutet, G ; Brousse, S ; Chabbert-Buffet, N & al , *[Non-genetic indications for risk reducing mastectomies: Guidelines of the National College of French Gynecologists and Obstetricians (CNGOF)].*, **Gynecol Obstet Fertil Senol**, 2022, 50, 107-120
- Al Masry, Z ; Zerhouni, N ; Gay, C ; Meraghni, S ; Lodi, M ; Mathelin, C & al , *[Connected bras for breast cancer detection in 2021: Analysis and perspectives].*, **Gynecol Obstet Fertil Senol**, 2021, 49, 907-912
- Mathelin, C ; Ame, S ; Anyanwu, S ; Avisar, E ; Boubnider, WM ; Breitling, K & al , *Breast Cancer Management During the COVID-19 Pandemic: The Senologic International Society Survey.*, **Eur J Breast Health**, 2021, 17, 188-196
- Mathelin, C ; Lodi, M , *[Covid-19 and breast cancer: First lessons of a pandemic].*, **Gynecol Obstet Fertil Senol**, 2021, 49, 651-652

- Mathelin, C ; Lodi, M , *Narrative review of sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a technique in constant evolution with still numerous unresolved questions.*, **Chin Clin Oncol**, 2021, 10, 20
- Reix, N ; Lodi, M ; Jankowski, S ; Molière, S ; Luporsi, E ; Leblanc, S & al , *A novel machine learning-derived decision tree including uPA/PAI-1 for breast cancer care.*, **Clin Chem Lab Med**, 2019, 57, 901-910

Autres publications réalisées pendant la période de thèse (2019-2023) en annexe (1^{ère} page uniquement)

- Thouvenin, J ; Alhalabi, O ; Carlo, M ; Carril-Ajuria, L ; Hirsch, L ; Martinez-Chanza, N & al , *Efficacy of Cabozantinib in Metastatic MiT Family Translocation Renal Cell Carcinomas.*, **Oncologist**, 2022, 27, 1041-1047
- Lecointre, L ; Verde, J ; Goffin, L ; Venkatasamy, A ; Seeliger, B ; Lodi, M & al , *Robotically assisted augmented reality system for identification of targeted lymph nodes in laparoscopic gynecological surgery: a first step toward the identification of sentinel node : Augmented reality in gynecological surgery.*, **Surg Endosc**, 2022, 36, 9224-9233
- Lecointre, L ; Lodi, M ; Martel, C ; Gallix, B ; Querleu, D ; Akladios, C , *A step-by-step demonstration of laparoscopic sentinel lymph node mapping according to current guidelines.*, **Int J Gynecol Cancer**, 2022,
- Lapointe, M ; Pontvianne, M ; Faller, E ; Lodi, M ; Fitcher, F ; Lecointre, L & al , *Impact of surgery for colorectal endometriosis on postoperative fertility and pregnancy outcomes.*, **J Gynecol Obstet Hum Reprod**, 2022, 51, 102348
- Osada, M ; Lecointre, L ; Lodi, M ; Faller, E ; Boisrame, T ; Host, A & al , *Nerve Anatomy Around Lumbo-aortic Lymphadenectomy by Retroperitoneal Approach.*, **J Minim Invasive Gynecol**, 2022, 29, 588
- Koch, A ; Vermel, M ; Hansmann, Y ; Lodi, M ; Mura, C ; Sananes, A & al , *3D-printed simulator for nasopharyngeal swab collection for COVID-19.*, **Infect Dis Now**, 2022, 52, 138-144
- Lecointre, L ; Venkatasamy, A ; Wehr, M ; Koch, A ; Sananes, A ; Debry, C & al , *Multicentric evaluation of a 3D-printed simulator for COVID- 19 nasopharyngeal swab collection in testing centers.*, **J Infect**, 2021, 83, 709-737

- Lecointre, L ; Dana, J ; Lodi, M ; Akladios, C ; Gallix, B , *Artificial intelligence-based radiomics models in endometrial cancer: A systematic review.*, **Eur J Surg Oncol**, 2021, 47, 2734-2741
- Lecointre, L ; Lodi, M ; Faller, É ; Boisramé, T ; Agnus, V ; Baldauf, JJ & al , *Diagnostic Accuracy and Clinical Impact of Sentinel Lymph Node Sampling in Endometrial Cancer at High Risk of Recurrence: A Meta-Analysis.*, **J Clin Med**, 2020, 9,
- Sananès, N ; Lodi, M ; Koch, A ; Lecointre, L ; Sananès, A ; Lefebvre, N & al , *3D-printed simulator for nasopharyngeal swab collection for COVID-19.*, **Eur Arch Otorhinolaryngol**, 2021, 278, 2649-2651
- Lecointre, L ; Velten, M ; Lodi, M ; Saadeh, R ; Lavoué, V ; Ouldamer, L & al , *Impact of neoadjuvant chemotherapy cycles on survival of patients with advanced ovarian cancer: A French national multicenter study (FRANCOGYN).*, **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 2020, 245, 64-72

AVANT-PROPOS

Le cancer du sein est le premier cancer en termes d'incidence et de mortalité chez la femme dans le monde entier. Le sous-type HER2-positif, caractérisé par une amplification du gène *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2)*, représente environ 15% des cancers du sein et se caractérise par un mauvais pronostic et des traitements spécifiques ciblant la protéine HER2. L'étude génétique des cancers du sein HER2+ a permis de mettre en évidence des altérations supplémentaires puisque plusieurs gènes voisins du gène HER2 au niveau du locus 17q12 sont co-amplifiés et co-surexprimés. Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse a identifié plusieurs de ces gènes, notamment le gène *StAR-related lipid transfer Domain protein 3 (STARD3)*, et a proposé que les gènes co-amplifiés et co-exprimés avec HER2 puissent contribuer à la biologie des cancers HER2+. STARD3 est une protéine impliquée dans la régulation intracellulaire du cholestérol, et les données de la littérature suggèrent que STARD3 joue un rôle unique dans la biologie des cellules cancéreuses HER2+ et pourrait être une cible thérapeutique ainsi qu'un biomarqueur prédictif. Cependant, l'implication de STARD3 dans le cancer du sein HER2+ n'a pas encore été pleinement caractérisée, notamment sur le plan clinique. Par conséquent, la première partie de cette thèse concerne des rappels bibliographiques sur l'état actuel des connaissances du cancer du sein en général, des spécificités du cancer du sein HER2+, du traitement systémique néoadjuvant puis de STARD3. Dans ce contexte, j'ai participé à la publication en 2019 d'une revue synthétisant les connaissances concernant STARD3 (1).

Dans la deuxième partie, nous examinons l'impact clinique de l'expression de STARD3 dans le cancer du sein HER2-positif chez la femme. Les résultats débutent par une étude de corrélation entre l'amplification et l'expression de HER2 et STARD3 fondée sur l'analyse de bases de données publiques. De plus, nous avons mené une analyse fonctionnelle *in vitro* mettant en évidence la dépendance des cellules cancéreuses HER2+ à STARD3, ainsi que la mise au point de la quantification immunohistochimique de STARD3 dans le cancer du sein HER2-positif. Ensuite, nous avons mené une étude de cohorte pour étudier la valeur prédictive de STARD3 sur la réponse histologique complète, la valeur pronostique de STARD3, ainsi que la valeur diagnostique de STARD3 dans les cas HER2 score 2+. Enfin, nous avons examiné l'impact du traitement systémique néoadjuvant sur l'expression de STARD3. Une partie de ces résultats a été publiée en 2023 (2).

En troisième partie, le manuscrit se termine par une discussion et perspectives, portant sur l'utilisation de STARD3 pour la prédiction de la réponse au traitement néoadjuvant dans le cancer du sein HER2+, de ses possibles implications dans le choix thérapeutique, de l'utilisation de STARD3 dans le diagnostic et en tant que cible thérapeutique.

Cette thèse apporte des éléments importants à la compréhension de l'implication de STARD3 dans le cancer du sein HER2+ et suggère que STARD3 pourrait être utilisé comme biomarqueur prédictif et pronostique pour guider les choix thérapeutiques dans cette pathologie complexe et hétérogène.

1. GENERALITES

1.1. Le cancer du sein

1.1.1. Épidémiologie

Le cancer du sein est le premier cancer chez la femme dans le monde en termes d'incidence et de mortalité. D'après le Global Cancer Observatory, programme de l'International Agency for Research on Cancer (division de l'Organisation Mondiale de la Santé [OMS]), en 2020 le nombre de nouveaux cas de cancer du sein diagnostiqués était estimé à plus de 2,2 millions dans le monde, soit 24,5% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme (3). De plus, il était responsable d'environ 685 000 décès annuels, soit 15,5% des décès imputables aux cancers chez la femme (3). La prévalence à 5 ans du cancer du sein était de 7,79 millions dans le monde (30,3% chez la femme) (3). Le risque cumulé de développer un cancer du sein chez la femme (de la naissance jusqu'à 74 ans) est de 5,2% dans le monde, et en France ce taux est estimé de 10,6% (Figure 1).

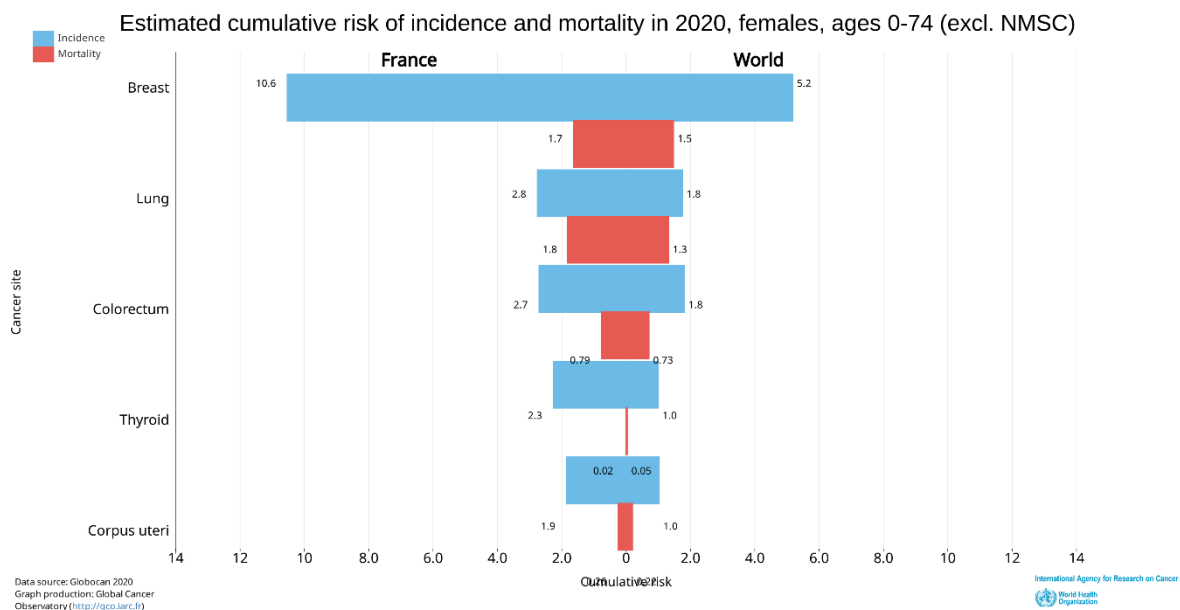


Figure 1. Risque cumulé de développer et de décéder un cancer chez la femme (0 à 74 ans) dans le monde et en France en 2020. Source : Globocan (gco.iarc.fr)

En France, le cancer du sein représentait 58 500 nouveaux cas en 2018, et était responsable de 12 100 décès (4). En 2017, la prévalence à 5 ans était estimée à 913 000 personnes (4). Les données épidémiologiques montrent que le nombre de nouveaux cas est en augmentation, avec +0,6% par an entre 2010 et 2018. Inversement, la mortalité est en diminution (-1,6% par an) sur la même période (4). L'âge médian au diagnostic et au décès en 2018 sont respectivement de 63 et 74 ans (4).

Le cancer du sein est donc un enjeu de santé public majeur au niveau mondial. Dans les pays à haut index de développement, l'incidence est plus importante du fait de différents facteurs, notamment du fait que la population soit plus âgée, mais également à cause de la prévalence plus importante de certains facteurs de risque tels que l'obésité, le régime alimentaire ou le mode de vie ainsi que ceux liés à la vie reproductive (5).

De plus, d'après les estimations l'incidence et la mortalité vont augmenter dans les prochaines décennies. En effet, selon le Global Cancer Observatory, en 2040 l'incidence du cancer du sein dans le monde sera de plus de 3,1 millions de nouveaux cas par an (+40,8%), et serait responsable de plus d'un million de décès par an (+51,9%) (6). Ces estimations sont similaires en France (+20,2% et +32,5%, respectivement) (6).

1.1.2. Les facteurs de risque

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle. La majorité des cancers du sein sont observée chez la femme, avec moins de 1% d'entre eux diagnostiqué chez l'homme (4). Le risque de cancer du sein augmente avec l'âge, avec un risque maximal entre 50 et 69 ans (4). Plusieurs familles de facteurs de risque existent : génétiques, hormonaux, liés au mode de vie et à l'environnement, et « histologiques ».

Sur le plan génétique, on estime communément qu'environ 5 à 10 % des cancers du sein sont associés à une prédisposition héréditaire avérée (7). En France, en 2019, le taux moyen de détection d'une altération génétique délétère chez un cas index dans un contexte de suspicion de syndrome seins-ovaires était de 8,0 % (8). En cas de suspicion d'une origine héréditaire, un panel de 13 gènes, dénommé panel HBOC (Hereditary Breast and Ovarian Cancer) est actuellement recommandé depuis 2018 par le Groupe Génétique et Cancer. Les 13 gènes sont les suivants : *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *CDH1*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM* (9). La présence d'au moins un variant délétère d'un des gènes de

prédisposition au cancer du sein permet de définir le très haut niveau de risque de cancer du sein chez une femme, indemne de cancer ou non. Cette stratification du risque a des implications thérapeutiques et de suivi, notamment pour la réalisation d'une chirurgie de réduction de risque et la surveillance mammaire (10).

Par ailleurs, l'exposition à des taux circulants plus importants d'hormones stéroïdes sexuelles endogènes telles que l'estradiol a été associée à un risque accru de cancer du sein. Ainsi la ménarche précoce, la ménopause tardive, les traitements hormonaux prolongés, la nulliparité ou les grossesses tardives sont des facteurs de risques du cancer du sein (11). L'allaitement maternel, du fait de la suppression ovulatoire, réduit le risque de cancer du sein chez la femme de manière modeste (12). Plus récemment, d'autres hormones comme l'insuline et les hormones thyroïdiennes ont été mises en cause dans la survenue du cancer du sein. Ainsi, les femmes présentant une hyperthyroïdie ou un diabète de type 2 peuvent faire l'objet d'une surveillance mammaire plus attentive (13, 14).

Ensuite, il existe également des facteurs de risque liés au mode de vie. L'obésité après la ménopause, la sédentarité, la consommation d'alcool, la carence en soleil (par le biais de la carence en vitamine D) ou bien encore la carence en sommeil (par le biais de la mélatonine) majorent le risque carcinologique mammaire (15). L'exposition aux rayonnements ionisants, notamment la radiothérapie thoracique avant 30 ans constitue un facteur de risque de cancer du sein (16). De plus, de nombreux arguments épidémiologiques et biologiques permettent de suspecter le rôle de l'environnement avec notamment les perturbateurs endocriniens et les métaux sur la carcinogénèse

mammaire (5, 17, 18, 19).

Enfin, des facteurs de risque dits histologiques ont également été décrits. Outre l'antécédent personnel de cancer du sein, in situ ou infiltrant, connu pour augmenter le risque de développer un cancer du sein ultérieur, la présence de lésions frontières histologiques est également associée à un surrisque. Les lésions frontières du sein constituent un groupe hétérogène de lésions épithéliales mammaires bénignes, à risque de cancérisation, comportant d'une part les carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS) et les hyperplasies lobulaires atypiques, et d'autre part les lésions canalaire avec atypies telles que la métaplasie cylindrique atypique et l'hyperplasie canalaire atypique (20). Ces lésions frontières traduisent un risque relatif de cancer du sein de 3 à 10 fois supérieur en comparaison à une absence de ces lésions (21, 22). En effet, il est estimé que les femmes avec une lésion atypique ont un risque relatif multiplié par 4-5 de développer un cancer du sein invasif ou in situ (22, 23), alors que ce risque est de 3 à 10 fois supérieur en cas de CLIS (24). En cas de lésions atypiques, ce risque est d'environ 30% [IC95% 23,7%-37,0%] à 25 ans (22, 25), alors que celles ayant un CLIS ont un risque estimé à 1-2%/an (26, 27) de développer un cancer du sein, avec un risque cumulé à 10% [IC95% 8%-12%] à 5 ans (26). Cette majoration de risque justifie le suivi régulier et prolongé chez ces femmes, et parfois même une chirurgie de réduction de risque selon certains critères (28). On note également que la densité mammaire a été décrite comme un facteur de risque du cancer du sein. Les femmes ayant une densité mammographique plus importante ont 4 fois plus de risque de développer un cancer du sein (11). En revanche, l'augmentation de la densité mammaire au cours du temps

chez une femme ne constitue pas en tant que tel un facteur de risque démontré (28).

1.1.3. Histoire naturelle

Le sein, du latin *sinus* (courbure, sinuosité, pli), est un organe pair contenant la glande mammaire et sa fonction principale est la sécrétion de lait. La glande mammaire se développe et fonctionne sous l'influence des hormones sexuelles, notamment les estrogènes et la progestérone. Les estrogènes sont impliqués dans le développement pubertaire et dans les modifications liées à la grossesse. La progestérone qui joue un rôle dans la différenciation des cellules épithéliales mammaires.

1.1.3.1. Anatomie macroscopique du sein

Le sein de l'adulte se situe entre la deuxième et la sixième côte dans l'axe vertical et entre le bord sternal et la ligne médio-axillaire dans l'axe horizontal. Le tissu mammaire se projette également dans l'aisselle sous la forme du prolongement axillaire (Figure 2B).

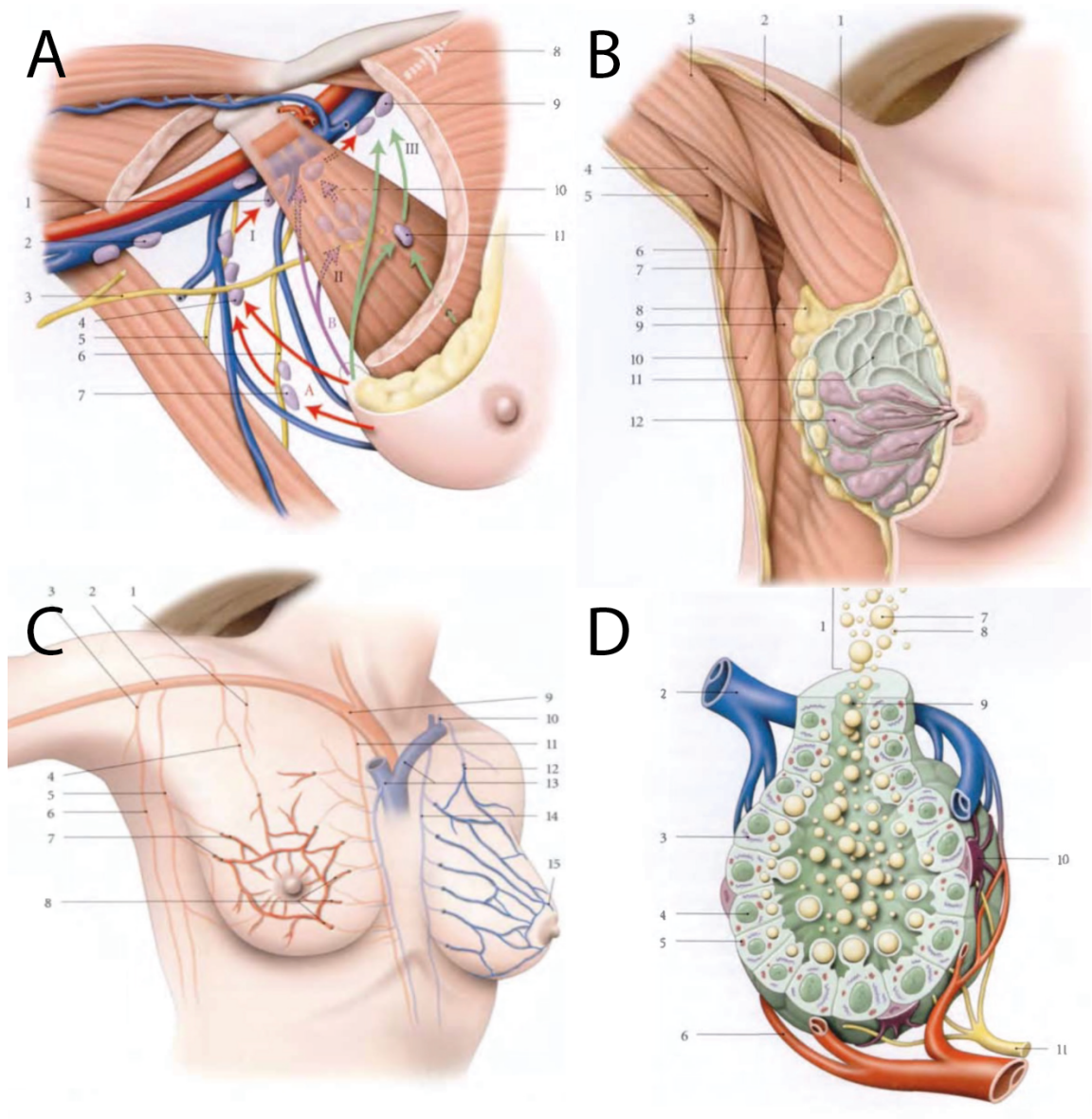


Figure 2. Anatomie macroscopique et microscopique du sein. D'après P. Kamina (29)

Légende : A. Drainage lymphatique ; B. Rapports du sein ; C. Vascularisation du sein ; D. Alvéole mammaire

Le sein comprend trois structures principales : la peau, le tissu sous-cutané et le tissu mammaire, qui est composé d'éléments épithéiaux et stromaux. Les éléments épithéiaux sont des canaux ramifiés qui relient les unités structurelles et fonctionnelles du sein (les lobules) au mamelon. Le stroma, qui représente la majorité du volume du

sein en l'absence de lactation, est composé de tissu adipeux et de tissu conjonctif fibreux. La peau du sein est fine et contient des follicules pileux, des glandes sébacées et des glandes sudoripares exocrines. Le mamelon et l'aréole ont des structures distinctes et spécialisées qui permettent de les identifier facilement à partir de leur aspect histologique. Le mamelon possède d'abondantes terminaisons nerveuses sensorielles et des glandes sébacées et apocrines, mais pas de follicules pileux. Le stroma est constitué de collagène dense enrichi en tissu musculaire lisse, responsables du thélotisme ou érection du mamelon. L'aréole est plus ou moins circulaire et pigmentée, mesurant de 15 à 60 mm de diamètre. Les tubercules (ou glandes) de Montgomery, situés à la périphérie de l'aréole, sont des élévations formées par les orifices des glandes sébacées.

Les canaux provenant du parenchyme mammaire convergent au niveau du mamelon et se dilatent pour former le sinus lactifère qui communique avec la surface du mamelon.

Le fascia pectoral superficiel enveloppe le sein et est en continuité avec le fascia abdominal superficiel. La face inférieure du sein repose sur le fascia pectoral profond, recouvrant le grand pectoral et le muscle grand dentelé (ou dentelé antérieur). Ces deux couches aponévrotiques sont reliées par des bandes fibreuses (les ligaments de Cooper) qui représentent un moyen de soutien naturel pour le sein.

La vascularisation du sein (Figure 2C) provient principalement de l'artère mammaire interne, qui comprend des branches latérales qui traversent les espaces intercostaux. Environ un tiers de l'apport sanguin (principalement dans le quadrant

supérieur externe) est assuré par l'artère thoracique latérale. Dans une moindre mesure, des branches de l'artère sous-clavière vascularisent la partie supérieure de la glande.

Le drainage lymphatique du sein se fait par les vaisseaux lymphatiques superficiels (sous-épithéliaux et sous-cutanés) et profonds, et la lymphe circule de façon unidirectionnelle du plexus superficiel au plexus profond (Figure 2A). Le flux lymphatique provenant des vaisseaux sous-cutanés profonds et intramammaires se déplace de manière centrifuge vers les ganglions lymphatiques axillaires, mammaires internes et claviculaires. Bien que la plupart des régions du sein se drainent vers les ganglions axillaires, le drainage peut également se faire simultanément ou uniquement vers les autres sites ganglionnaires. Les ganglions lymphatiques axillaires sont décrits en les divisant en niveaux anatomiques de Berg. Les ganglions lymphatiques de niveau I se situent latéralement par rapport au bord latéral du muscle petit pectoral, les ganglions de niveau II se situent derrière le muscle petit pectoral et les ganglions de niveau III se situent médialement par rapport au bord médial du muscle petit pectoral. Les ganglions lymphatiques mammaires internes se trouvent dans la graisse extrapleurale, dans les espaces intercostaux, à proximité des vaisseaux mammaires internes. Ces ganglions peuvent s'étendre du cinquième espace intercostal à la région rétroclaviculaire, mais les ganglions les plus fréquents se situent dans les trois espaces supérieurs

1.1.3.2. Anatomie microscopique du sein

La glande mammaire est composée de 15 à 20 compartiments séparés par du tissu

graisseux appelés lobes, et du tissu de soutien qui contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des structures fibreuses et du tissu adipeux. Chaque lobe est lui-même composé de 20 à 40 lobules, dont chacun contient de 10 à 100 acini organisés selon une architecture tubulo-alvéolaire (Figure 2B et D). Chaque acinus est bordé par une membrane basale sur laquelle reposent des cellules myoépithéliales (également appelées cellules basales) et des cellules épithéliales, appelées encore luminales, car elles sont au contact de la lumière des acini. Les acini se drainent dans les canaux intralobulaires, qui confluent pour former des canaux interlobulaires. Ces derniers forment ensuite les canaux galactophores, qui s'abouchent individuellement via des sini galactophoriques au niveau du mamelon.

Au microscope, le tissu mammaire est composé d'éléments épithéliaux et mésenchymateux. La partie épithéliale comprend des parties sécrétoires appelées acini qui se connectent à une série de canaux dont le diamètre augmente à mesure qu'ils s'approchent du mamelon.

L'unité ducto-lobulaire terminale (UDLT) est l'unité fonctionnelle et structurelle du sein (Figure 2D). Elle comprend les plus petits canaux distaux (canal terminal) et les acini qui leur sont rattachés. Les éléments épithéliaux de l'UDLT, les acini et le canal terminal, sont intégrés dans le stroma intralobulaire, qui est hautement spécialisé et plus sensible sur le plan cellulaire et hormonal que le stroma interlobulaire, qui est comparativement fibreux et moins sensible sur le plan hormonal.

Le revêtement spécialisé à deux cellules de l'ensemble du système canalaire et lobulaire se présente sous la forme de deux couches cellulaires clairement discernables

: les cellules cylindriques ou cuboïdales, plus grandes et plus hautes, tapissent la partie luminale du canal et des acini, tandis que la couche cellulaire externe, composée de cellules myoépithéliales plus petites et fusiformes, se trouve entre la couche de cellules épithéliales et la lame basale. La couche de cellules myoépithéliales est continue et parallèle au grand axe du système canalaire. Les propriétés contractiles des cellules myoépithéliales contribuent à l'écoulement du lait pendant la lactation.

1.1.3.3. Processus de cancérisation

Le cancer est défini selon l'Institut National du Cancer (INCa) comme une « maladie provoquée par la transformation de cellules qui deviennent anormales et prolifèrent de façon excessive. Ces cellules dérégées finissent par former une masse qu'on appelle tumeur maligne. Les cellules cancéreuses ont tendance à envahir les tissus voisins et à se détacher de la tumeur. Elles migrent alors par les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques pour aller former une autre tumeur (métastase) ».

Il existe deux types de cancers du sein : les cancers issus du tissu glandulaire, appelés adénocarcinomes, et les issus du tissu conjonctif, appelés sarcomes. Les adénocarcinomes constituent la très grande majorité des cancers du sein. Les adénocarcinomes sont issus des cellules luminales (85%) et des cellules myoépithéliales (15%, aussi appelées basales). Les sarcomes sont issus de cellules constituant le tissu adipeux (liposarcomes), le tissu vasculaire (angiosarcomes), du tissu fibreux (fibrosarcome), etc.

Lorsque les cellules cancéreuses restent à l'intérieur des acini et de l'arbre

galactophorique, il s'agit d'adénocarcinomes in situ. A partir du moment où les cellules adénocarcinomateuses franchissent la membrane basale et infiltrent le stroma mammaire, il s'agit d'adénocarcinomes infiltrants. Ensuite, l'extension du cancer du sein se fait :

- au niveau local avec un envahissement du tissu conjonctif et adipeux.
- au niveau régional vers les ganglions axillaires, les ganglions de la chaîne mammaire interne et les ganglions sus claviculaires.

à distance : les cellules cancéreuses peuvent migrer via la circulation lymphatique et sanguine vers divers sites et organes, constituant ainsi des métastases.

1.1.4. Les capacités distinctives « hallmarks » du cancer

Les capacités distinctives du cancer ont été proposées comme un ensemble d'aptitudes fonctionnelles acquises par les cellules humaines lorsqu'elles passent de l'état normal à l'état de croissance néoplasique, et plus précisément des capacités cruciales pour leur capacité à former des tumeurs malignes. Décrites initialement en 2000 par Hanahan et Weinberg (30) dans un article scientifique majeur publié dans Cell, elles ont été mises à jour en 2011 par les mêmes auteurs et comprenaient 10 capacités distinctives (31). En 2022, Hanahan a publié une deuxième mise à jour comprenant 4 capacités supplémentaires (32). En plus des cellules cancéreuses, les tumeurs présentent une autre dimension de complexité : elles contiennent un répertoire de cellules recrutées dites normales (non cancéreuses), qui contribuent à l'acquisition de traits caractéristiques en créant le microenvironnement tumoral. Le chapitre suivant

résume les 14 différentes capacités distinctives du cancer décrites par Hanahan et Weinberg (30, 31, 32).

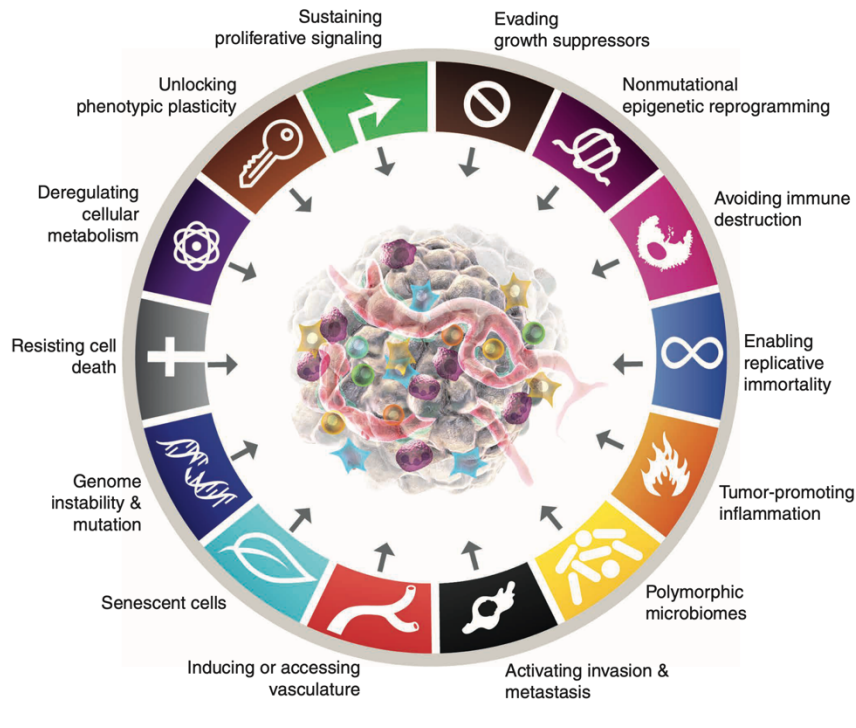


Figure 3. Les capacités distinctives du cancer en 2022. Image reproduite d'après Hanahan (32)

1.1.4.1. *Maintien d'une signalisation proliférative*

Les tissus normaux contrôlent soigneusement la production et la libération de signaux favorisant la croissance qui indiquent l'entrée et la progression dans le cycle de croissance et de division cellulaire, assurant ainsi une homéostasie du nombre de cellules et un maintien de l'architecture et de la fonction tissulaire. Les cellules cancéreuses, en dérégulant ces signaux, deviennent maîtresses de leur propre destin. Ces signaux sont souvent des facteurs de croissance qui se lient à un récepteur exprimé à la surface des cellules cancéreuses (comme les récepteurs à tyrosine-kinase). Les cellules cancéreuses peuvent acquérir la capacité de soutenir la signalisation proliférative de plusieurs façons

différentes : en produisant elles-mêmes des facteurs de croissance (voie autocrine), soit en envoyant des signaux pour stimuler la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules normales du micro-environnement tumoral, soit en augmentant la quantité de récepteurs à la surface des cellules cancéreuses (ce qui rend ces cellules hyper-réactives à des quantités limitées de ligand), soit suite à des altérations structurelles des récepteurs favorisant l'activation indépendamment du ligand. L'indépendance à l'égard du facteur de croissance peut également découler de l'activation constitutive des voies de signalisation en aval de ces récepteurs (31).

1.1.4.2. Évitement des suppresseurs de croissance

De nombreux gènes suppresseurs de tumeurs, qui agissent de diverses façons pour limiter la croissance et la prolifération cellulaire, ont été découverts par leur inactivation caractéristique dans l'une ou l'autre forme de cancer animal ou humain. Les cellules cancéreuses doivent aussi contourner ces puissants systèmes qui régulent négativement la prolifération cellulaire (31).

1.1.4.3. Résistance à la mort cellulaire

La cellule cancéreuse acquiert, via l'altération des mécanismes d'initiation et d'exécution de l'apoptose, une résistance à la mort cellulaire. Ceci lui permet de résister à des conditions de stress auxquelles toute cellule cancéreuse est exposée pendant le processus de cancérisation, mais aussi d'acquérir une résistance aux thérapies anticancéreuses (31).

1.1.4.4. *Immortalité réplivative*

Les cellules de la plupart des lignées cellulaires normales de l'organisme ont un nombre limité de cycles successifs de croissance et de division cellulaire. Cette limitation a été associée à deux obstacles distincts à la prolifération: la sénescence, une entrée généralement irréversible dans un état non prolifératif mais viable, et la crise cellulaire, qui implique la mort de la cellule (31).

Les télomères, composés de multiples répétitions hexanucléotidiques en tandem et qui protègent les extrémités des chromosomes, sont impliquées de façon centrale dans la capacité de prolifération illimitée. Au cours du temps, les télomères se raccourcissent progressivement dans les cellules normales, perdant finalement la capacité de protéger les extrémités des acides désoxyribonucléiques (ADN) chromosomiques des fusions « bout à bout » ; ces fusions produisent des chromosomes bi-centriques instables dont la résolution résulte en une altération du caryotype non viable pour la cellule. Par conséquent, la longueur de l'ADN télomérique d'une cellule détermine le nombre de générations cellulaires successives que sa filiation peut traverser avant que les télomères ne soient érodés et aient perdu leurs fonctions protectrices, ce qui déclenche l'entrée en crise cellulaire (31).

La télomérase, l'ADN polymérase ARN-dépendante qui ajoute des segments répétitifs télomériques aux extrémités de l'ADN télomérique, est presque absente dans les cellules non immortalisées, mais exprimée à des niveaux fonctionnellement significatifs dans la grande majorité des cellules spontanément immortelles, y compris

les cellules cancéreuses humaines. En étendant l'ADN télomérique, la télomérase est capable de contrer l'érosion progressive du télomère qui se produirait en son absence (31).

1.1.4.5. Induction de l'angiogenèse

Comme les tissus normaux, les tumeurs ont besoin de nutriments et d'oxygène, ainsi que d'une capacité à évacuer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. La néovascularisation associée à la tumeur, générée par le processus de l'angiogenèse, répond à ces besoins. Au cours de l'embryogenèse, le développement du système vasculaire implique la naissance de nouvelles cellules endothéliales et leur assemblage en tubes (vasculogenèse) en plus de la germination (angiogenèse) de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants. Au cours de la progression tumorale, un « interrupteur angiogénique » est presque toujours activé et reste en fonction, ce qui fait que les vaisseaux vasculaires normalement immobiles germent continuellement de nouveaux vaisseaux qui aident à soutenir la croissance néoplasique (31).

L'effet angiogénique est régi par un équilibre entre des facteurs qui induisent ou s'opposent à l'angiogenèse. Certains de ces régulateurs angiogéniques sont des protéines de signalisation qui se lient aux récepteurs de surface des cellules stimulatrices ou inhibitrices des cellules endothéliales vasculaires. Les prototypes bien connus d'inducteurs et d'inhibiteurs de l'angiogenèse sont respectivement le Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) et la thrombospondine-1 (TSP-1) (31).

Le gène VEGF-A code les ligands impliqués dans l'orchestration de la croissance

des nouveaux vaisseaux sanguins au cours du développement embryonnaire et postnatal, puis dans la survie homéostatique des cellules endothéliales, ainsi que dans des situations physiologiques et pathologiques chez l'adulte. Son expression peut être régulée à la fois par hypoxie et par signalisation oncogène. De plus, le VEGF-A peut être séquestré dans la matrice extracellulaire sous forme latente qui est libérée et activée par des protéases dégradant la matrice extracellulaire (par exemple la MMP-9). De plus, d'autres signaux pro-angiogéniques, comme les membres de la famille des Fibroblast Growth Factor (FGF), ont été impliqués dans le maintien de l'angiogenèse tumorale (31).

1.1.4.6. Activation de l'invasion et des métastases

La « cascade invasion-métastase » consiste en une succession de changements biologiques cellulaires. Tout d'abord on observe une invasion locale des cellules cancéreuses, puis une intravasation dans les vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques adjacents. Ensuite les cellules cancéreuses transitent par les systèmes lymphatique et hématogène puis échappent de la lumière de ces vaisseaux dans le parenchyme des tissus distants (extravasation). Le processus se poursuit par la formation de petits amas de cellules cancéreuses (micrométastases). Enfin la croissance des lésions micrométastatiques en tumeurs macroscopiques est appelée « colonisation » (31).

Les mécanismes génétiques sous-jacents à cette cascade invasion-métastase sont complexes et encore mal élucidés. Récemment, une équipe a réalisé le séquençage du génome d'un grand nombre de cancers du sein primaires et de leur métastases (33).

L'évolution du génome des cellules cancéreuses consiste en l'acquisition de mutations de gènes *drivers* dits « précoces », leur conférant un avantage par rapport aux autres clones tumoraux. Il existe de nombreux gènes *driver* bien connus : TP53, GATA3, PIK3CA, AKT1, ERBB2, etc. De manière intéressante, on note que les cellules cancéreuses continuent d'acquérir des mutations d'autres gènes, non présentes dans les tumeurs primaires : ce sont les gènes *drivers* « tardifs ». Auparavant considérés comme des entités rares, on observe que ces *drivers* tardifs sont en réalité communs dans les métastases de cancer du sein. Ces derniers peuvent conférer des résistances aux thérapies médicamenteuses (par exemple ESR1 confère une résistance à l'hormonothérapie), mais peuvent être eux-mêmes des cibles thérapeutiques potentielles non encore développées (par exemple JAK2-STAT3 ou SWI/SNF) (33). La figure suivante schématise l'évolution génomique des cancers du sein métastatiques.

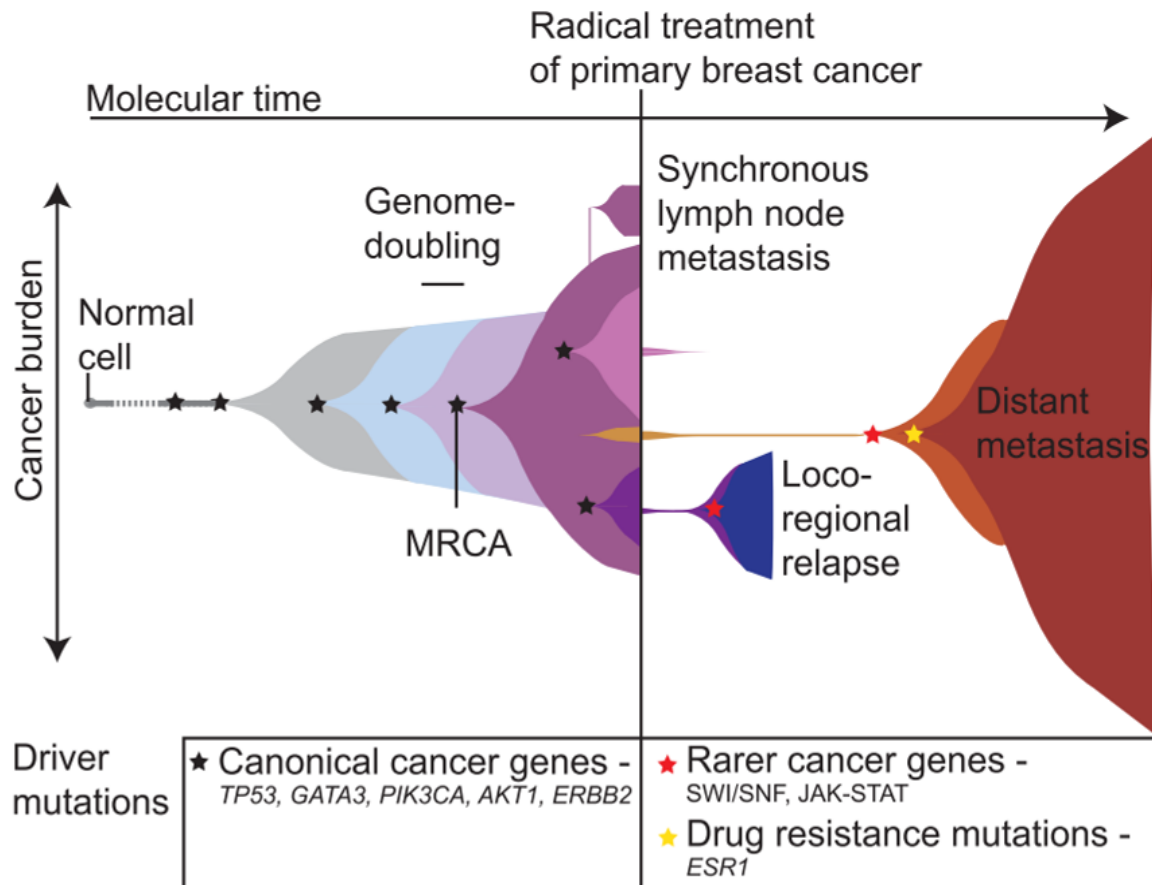


Figure 4. Représentation de l'évolution génomique des cancers du sein métastatiques. Image reproduite d'après Yates et al. (33)

1.1.4.7. Reprogrammation du métabolisme énergétique

La maladie néoplasique implique non seulement un contrôle dérégulé de la prolifération cellulaire, mais aussi des ajustements du métabolisme énergétique afin de stimuler la croissance et la division des cellules. Même en présence d'oxygène, les cellules cancéreuses peuvent reprogrammer leur métabolisme du glucose, et donc leur production énergétique, en limitant largement leur métabolisme énergétique à la glycolyse, ce qui a entraîné un état appelé glycolyse aérobie. Toutefois, la glycolyse anaérobie a une efficacité moindre par rapport à la phosphorylation oxydative mitochondriale (aérobie). Ceci est en contradiction avec la notion que les cellules

cancéreuses acquièrent des capacités qui leur permettent de mieux survivre et évoluer par rapport aux cellules saines. En réalité, il semblerait que l'augmentation de la glycolyse permettrait de détourner les intermédiaires glycolytiques vers diverses voies de biosynthèse, dont celles génératrices de nucléosides et d'acides aminés, facilitant ainsi la biosynthèse des macromolécules et des organelles nécessaires pour l'assemblage de nouvelles cellules. De plus, ce type de métabolisme est présent dans de nombreux tissus embryonnaires qui se divisent rapidement, ce qui suggère une fois de plus un rôle dans le soutien des programmes de biosynthèse à grande échelle qui sont nécessaires à la prolifération cellulaire active (31).

En fait, la réorientation du métabolisme énergétique est en grande partie orchestrée par des protéines qui participent d'une manière ou d'une autre à la programmation des caractéristiques fondamentales du cancer. Vu sous cet angle, la glycolyse aérobie n'est qu'un autre phénotype programmé par des oncogènes induisant la prolifération (31).

1.1.4.8. Évitement de la destruction immunitaire

La théorie de la surveillance immunitaire propose que les cellules et les tissus soient constamment surveillés par un système immunitaire toujours en alerte, et que cette surveillance immunitaire est responsable de la reconnaissance et de l'élimination de la grande majorité des cellules cancéreuses naissantes et donc des tumeurs naissantes. Selon cette logique, les tumeurs solides qui apparaissent ont réussi d'une manière ou d'une autre à éviter d'être détectées par le système immunitaire ou ont pu

limiter l'étendue de la destruction immunologique, évitant ainsi leur éradication (31).

Le rôle de la surveillance immunologique défectueuse des tumeurs semble être validée par l'évolution rapide de certains cancers chez les personnes immunodéprimées. Au cours des dernières années, de plus en plus de données probantes, provenant à la fois de souris génétiquement modifiées et d'épidémiologie clinique, suggèrent que le système immunitaire joue un rôle important dans la formation et la progression des tumeurs, du moins dans certaines formes de cancers non induits par un virus (31).

Les interactions immunologiques tumeur-hôte sont complexes et encore mal connues. Par exemple, on suppose que des clones de cellules cancéreuses hautement immunogènes sont systématiquement éliminés dans les hôtes immunocompétents, ne laissant derrière eux que des variantes faiblement immunogènes pour croître et générer des tumeurs solides. Toutefois, il a été démontré également que des cellules cancéreuses hautement immunogènes peuvent très bien échapper à la destruction immunitaire en désactivant les composants du système immunitaire qui ont été envoyés pour les éliminer en sécrétant du TGF- β ou d'autres facteurs immunosuppresseurs (31).

1.1.4.9. Instabilité du génome

L'acquisition des multiples caractéristiques énumérées ci-dessus dépend en grande partie d'une succession d'altérations des génomes des cellules néoplasiques. En effet, certains génotypes mutants confèrent un avantage sélectif aux sous-clones de cellules, permettant leur croissance et leur domination éventuelle dans un environnement tissulaire local. Par conséquent, la progression tumorale en plusieurs étapes peut être

représentée comme une succession d'expansions clonales, chacune étant déclenchée par l'acquisition fortuite d'un génotype mutant favorable. Étant donné que les phénotypes héréditaires, par exemple l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, peuvent également être acquis par des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, certaines extensions clonales peuvent bien être provoquées par des modifications non mutationnelles affectant la régulation de l'expression génétique (31).

Au cours de l'acquisition de la liste de gènes mutants nécessaires pour orchestrer la cancérogenèse, les cellules cancéreuses augmentent souvent les taux de mutation. Cette mutabilité est obtenue par une sensibilité accrue aux agents mutagènes, par une défaillance d'un ou de plusieurs composants de la machine de maintenance génomique, ou des deux. De plus, l'accumulation de mutations peut être accélérée en compromettant les systèmes de qui surveillent normalement l'intégrité génomique et forcent les cellules génétiquement endommagées à devenir sénescents ou à entrer en apoptose. Ces gènes « gardiens » du génome (par exemple *TP53*) comprennent ceux dont les produits sont impliqués dans la détection des dommages à l'ADN et l'activation des machines de réparation, la réparation directe de l'ADN endommagé, et l'inactivation ou l'interception des molécules mutagènes avant que celles-ci aient endommagé l'ADN. D'un point de vue génétique, ces gènes gardiens se comportent comme des gènes suppresseurs de tumeurs puisque leurs fonctions peuvent être perdues au cours de la progression tumorale, ces pertes étant obtenues soit par des mutations inactivatrices, soit par répression épigénétique (31).

1.1.4.10. Inflammation

Pratiquement toutes les lésions néoplasiques contiennent des cellules immunitaires présentes à des densités allant d'infiltrations subtiles détectables uniquement avec des anticorps spécifiques à des inflammations majeures qui sont apparentes même par des techniques de coloration histologique standard.

L'inflammation fournit des molécules bioactives au microenvironnement tumoral, y compris des facteurs de croissance qui soutiennent la signalisation proliférative, des facteurs de survie qui limitent la mort cellulaire, des facteurs proangiogéniques, des enzymes modifiant la matrice extracellulaire qui favorisent l'angiogenèse, l'invasion et la métastase, et des signaux inducteurs qui entraînent l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse. L'inflammation est fortement liée au micro-environnement tumoral décrit ci-dessous (31).

1.1.4.11. Déblocage de la plasticité phénotypique

Pendant l'organogenèse, le développement, la détermination et l'organisation des cellules en tissus afin d'assumer des fonctions homéostatiques sont accompagnés par une différenciation terminale, où les cellules progénitrices arrêtent de croître (parfois définitivement) à la fin de ces processus. Ainsi, le résultat final de la différenciation cellulaire est dans la plupart des cas antiprolifératif et constitue une barrière claire à la prolifération continue nécessaire pour la néoplasie. Il existe de plus en plus de preuves que le déverrouillage de la capacité normalement restreinte à la plasticité phénotypique afin d'échapper à l'état de différenciation terminale est une composante critique de la

pathogénèse du cancer. Cette plasticité peut fonctionner de plusieurs façons : la dédifférenciation, l'inhibition de la différenciation et la transdifférenciation. Ainsi, les cellules cancéreuses naissantes provenant d'une cellule normale qui avait un état entièrement différencié peuvent inverser leur cours en se dédifférenciant en états de cellules progénitrices. Inversement, les cellules néoplasiques provenant d'une cellule progénitrice qui est destinée à suivre un chemin menant à une différenciation terminale peuvent court-circuiter le processus, maintenant les cellules cancéreuses qui s'étendent dans un état partiellement différencié, proche des progéniteurs (notamment dans les hémopathies). Alternativement, une transdifférenciation peut être opérée, où des cellules initialement engagées dans un chemin de différenciation passent à un programme de développement entièrement différent, acquérant ainsi des caractéristiques spécifiques à un tissu qui n'étaient pas prédéterminées par leurs cellules normales d'origine. Le concept de transdifférenciation a longtemps été reconnu par les pathologistes sous la forme de métaplasie tissulaire, où des cellules d'un phénotype différencié particulier changent nettement leur morphologie pour devenir clairement reconnaissables comme éléments d'un autre tissu.

1.1.4.12. Reprogrammation épigénétique non-mutationnelle

L'instabilité et la mutation du génome (ADN) sont des composants fondamentaux de la formation et de la pathogénèse du cancer. Des mutations dans les gènes qui organisent, modulent et maintiennent l'architecture de la chromatine et, par conséquent, régulent globalement l'expression génique, sont de plus en plus détectées

et associées fonctionnellement aux caractéristiques du cancer (34, 35, 36).

De plus, il existe également un argument en faveur d'un autre mode apparemment indépendant qui implique des changements purement épigénétiques, qui pourrait être appelé « reprogrammation épigénétique non mutationnelle » (36, 37, 38, 39).

La régulation épigénétique non mutationnelle de l'expression génique est centrale dans le développement embryonnaire, la différenciation et l'organogenèse. Chez l'adulte, ce concept intervient par exemple dans les modifications des gènes et des histones, dans la structure de la chromatine impliqués dans la mémoire à long terme. La proposition d'une évolution du cancer sans mutation et d'une programmation purement épigénétique des phénotypes caractéristiques du cancer est de plus en plus discutée. Des preuves croissantes soutiennent la proposition que des altérations épigénétiques analogues peuvent contribuer à l'acquisition des capacités caractéristiques pendant le développement tumoral et la progression maligne.

1.1.4.13. Polymorphisme du microbiome

De plus en plus d'éléments suggèrent que la variabilité polymorphique des microbiomes entre les individus d'une population peut avoir un impact profond sur les phénotypes du cancer. Les études d'association chez l'homme et les manipulations expérimentales sur des modèles murins de cancer révèlent l'existence de micro-organismes particuliers, principalement mais pas exclusivement des bactéries, qui peuvent avoir des effets protecteurs ou délétères sur le développement du cancer, la progression de la malignité et la réponse à la thérapie. Il en va de même pour la

complexité globale et la constitution d'un microbiome tissulaire au sens large. En effet, si le microbiome intestinal a été le pionnier de cette nouvelle frontière, de multiples tissus et organes ont des microbiomes associés, qui présentent des caractéristiques distinctes en ce qui concerne la dynamique des populations et la diversité des espèces et sous-espèces microbiennes (32).

Il existe des données qui suggèrent que certaines espèces bactériennes peuvent stimuler la signalisation proliférative et altérer l'activité suppressive des tumeurs dans différents compartiments de l'intestin. Cependant, on ne sait toujours pas si elles ont des effets directs sur d'autres capacités caractéristiques telles que l'évitement de la mort cellulaire, l'induction de l'angiogenèse et la stimulation de l'invasion et des métastases. Néanmoins, il semble que le polymorphisme des microbiomes de l'intestin et d'autres organes constitue une caractéristique distinctive permettant l'acquisition de capacités caractéristiques du cancer complétant celles de l'instabilité et de la mutation du génome et l'inflammation pro-tumorale (32).

1.1.4.14. Les cellules sénescents

La sénescence cellulaire est une forme typiquement irréversible d'arrêt de la prolifération, qui a probablement évolué comme un mécanisme de protection pour maintenir l'homéostasie des tissus, fonctionne comme un mécanisme complémentaire de la mort cellulaire programmée qui sert à inactiver et, en temps voulu, à éliminer les cellules malades, dysfonctionnelles ou autrement inutiles. Outre l'arrêt du cycle de division cellulaire, le programme de sénescence implique des changements dans la

morphologie et le métabolisme cellulaires et, plus profondément, l'activation d'un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (PSAS) impliquant la libération de nombreuses protéines, y compris des chimiokines, des cytokines et des protéases dont l'identité dépend du type de cellule et de tissu d'où provient une cellule sénescence. La sénescence peut être induite dans les cellules par diverses conditions, notamment du stress cellulaire (tels que la privation de nutriments et les lésions de l'ADN), des lésions des organites et de l'infrastructure cellulaire et des déséquilibres dans les réseaux de signalisation cellulaire (40).

La sénescence cellulaire a longtemps été considérée comme un mécanisme de protection contre le cancer, les cellules cancéreuses étant amenées à subir la sénescence. En effet, la plupart des déclencheurs du programme de sénescence sont associés à la malignité, en particulier les lésions de l'ADN. A l'inverse, un nombre croissant de preuves révèlent que dans certains contextes, les cellules sénescences stimulent le développement tumoral et la progression maligne. En cas de suppression des cellules sénescences dans des modèles animaux de souris, il a été observé une réduction de l'incidence de la tumorigenèse spontanée et de la mort associée au cancer (en plus de retarder de nombreux symptômes liés à l'âge).

Le principal mécanisme par lequel les cellules sénescences favorisent les phénotypes tumoraux serait le PSAS, qui est manifestement capable de transmettre, de manière paracrine aux cellules cancéreuses viables situées à proximité, ainsi qu'à d'autres cellules du micro-environnement tumoral, des molécules de signalisation (et des protéases qui les activent et/ou les déséquestrent) de manière à transmettre des

capacités caractéristiques. Ainsi, dans différents systèmes expérimentaux, il a été démontré que les cellules cancéreuses sénescents contribuent de diverses manières à la signalisation proliférative, évitent l'apoptose, induisent l'angiogenèse, stimulent l'invasion et les métastases et suppriment l'immunité de la tumeur (41, 42).

Une autre facette des effets des cellules cancéreuses sénescents sur les phénotypes cancéreux implique des états cellulaires sénescents transitoires et réversibles, dans lesquels les cellules cancéreuses sénescents peuvent s'échapper de leur état non prolifératif exprimant les PSAS, et reprendre la prolifération cellulaire et la manifestation des capacités associées des cellules oncogéniques pleinement viables. Cette sénescence transitoire est particulièrement bien documentée dans les cas de résistance au traitement, représentant une forme de dormance qui contourne le ciblage thérapeutique des cellules cancéreuses en prolifération, mais elle pourrait bien s'avérer plus largement opérationnelle à d'autres stades du développement tumoral, de la progression maligne et de la formation de métastases (43).

De plus, les capacités des cellules sénescents à promouvoir les capacités distinctives du cancer ne se limitent pas aux cellules cancéreuses sénescents. Il a été démontré que les fibroblastes associés au cancer (CAF) dans les tumeurs subissent une sénescence, créant des CAF sénescents qui favorisent manifestement les tumeurs via le micro-environnement. De plus, les fibroblastes sénescents des tissus normaux, produits en partie par le vieillissement naturel ou les agressions environnementales, ont également été impliqués dans le remodelage des microenvironnements tissulaires via leur PSAS afin de fournir un soutien paracrine à l'invasion locale (ce que l'on appelle

les "effets de champ") et aux métastases à distance des néoplasies qui se développent à proximité. Enfin, il a été démontré que les fibroblastes sénescents de la peau vieillissante recrutent – via leur PSAS – des cellules immunitaires innées qui sont à la fois immunosuppressives des réponses immunitaires antitumorales adaptatives et stimulantes de la croissance des tumeurs cutanées, ce dernier effet pouvant refléter les contributions paracrines de ces cellules immunitaires innées (43).

1.1.5. Micro-environnement tumoral

Le micro-environnement tumoral, aussi connu sous le nom de stroma tumoral, est un tissu spécifique de chaque cancer, contenant différents types cellulaires impliqués dans l'évolution de la maladie. Ces types cellulaires, comme les fibroblastes ou les adipocytes, sont des cellules non cancéreuses ; toutefois, elles sont altérées et contrôlées par les cellules cancéreuses pour répondre à leurs besoins (31).

En effet, le micro-environnement tumoral est impliqué dans l'apport de certains facteurs de croissance, du maintien de l'angiogenèse, de la dissémination métastatique, dans la survie des cellules souches tumorales et bien d'autres phénomènes liés à la physiopathologie du cancer. La figure suivante schématise l'organisation des micro-environnements tumoraux présents aux différents stades de la maladie (31).

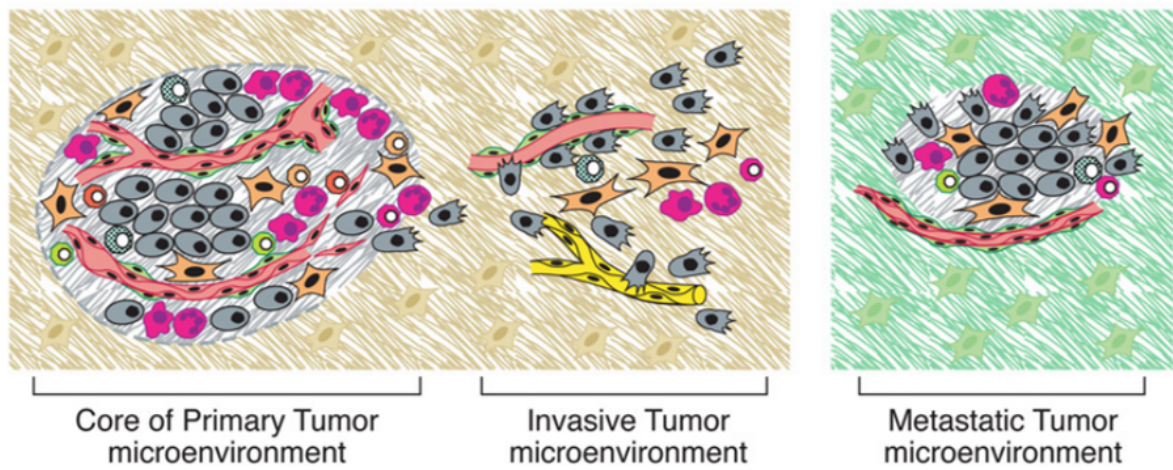
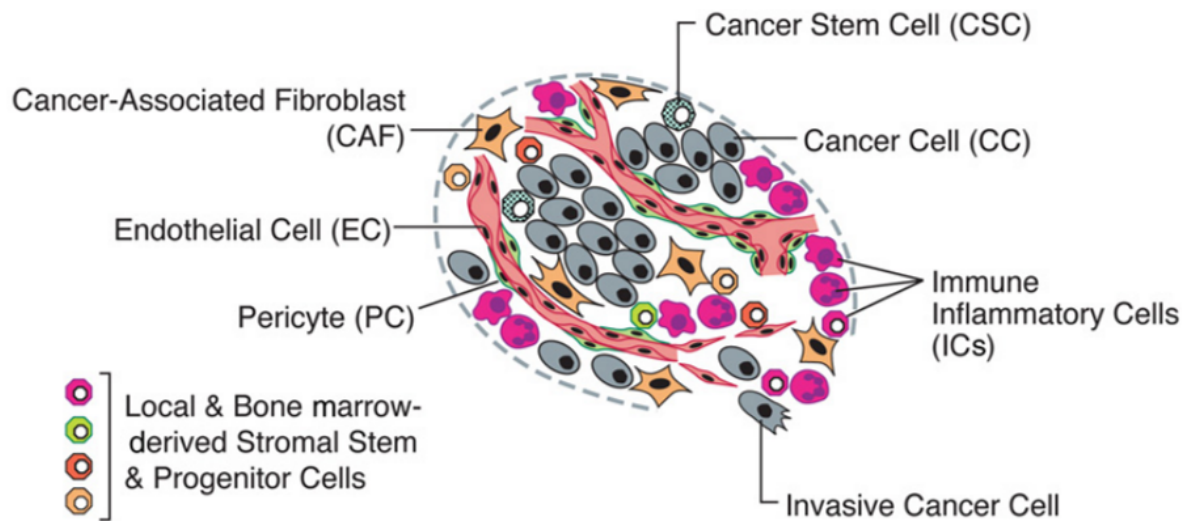


Figure 5. Schématisation du micro-environnement tumoral. Image reproduite d'après Hanahan et al. (31)

1.1.6. Diagnostic

1.1.6.1. *Physiopathologie*

Le mécanisme exact par lequel le cancer du sein se déclenche est mal connu. Au niveau de la cellule d'origine, le modèle d'évolution clonale (dans lequel les mutations s'accumulent, des changements épigénétiques se produisent dans les cellules tumorales et les cellules les plus aptes survivent) et le modèle des cellules souches cancéreuses (dans lequel seules les cellules cancéreuses précurseurs initient et soutiennent la progression) sont tous deux impliqués. Au niveau morphologique, il existe un continuum de lésions et de modifications génétiques des glandes normales au cancer.

Au niveau moléculaire, il est prouvé que le cancer du sein évolue selon deux voies moléculaires divergentes, principalement liées à l'expression des récepteurs aux œstrogènes (RE), au grade de la tumeur et à la prolifération (44). En outre, l'identification des gènes de susceptibilité au cancer du sein a permis de mettre en lumière certains aspects de la pathogenèse du cancer du sein, qu'il soit sporadique ou héréditaire. La première voie - la voie de bas grade - est caractérisée par un gain de 1q, une perte de 16q, une amplification peu fréquente de 17q12 et une signature d'expression génique. Le groupe luminal A avec une majorité de gènes associés au phénotype RE, des caryotypes diploïdes ou quasi diploïdes et un grade tumoral faible. Le groupe luminal A et, dans une certaine mesure, le groupe luminal B relèvent de cette voie (44). La deuxième voie - la voie des tumeurs de haut grade - est caractérisée par la perte de 13q, le gain de la région chromosomique 11q13, l'amplification de 17q12 (contenant ERBB2, codant pour HER2) et une signature d'expression de gènes

impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire. Les tumeurs de grade intermédiaire à élevé, y compris les tumeurs HER2-positives et TNBC, relèvent de cette voie (44).

1.1.6.2. Invasivité

La lame basale est une matrice extracellulaire dense, fortement réticulée, en forme de feuillets, qui sous-tend tous les épithéliums et endothéliums (45). Le franchissement de cette lame basale par les cellules carcinomateuses qui se sont développées dans la lumière canalaire signe le passage du carcinome in situ au carcinome invasif. Actuellement, les mécanismes biologiques qui permettent aux cellules cancéreuses de traverser la lame basale sont mal connus (45), malgré le fait que la dysrégulation de la lame basale soit une caractéristique de nombreux cancers (46). Le modèle actuel est que la cellule cancéreuse acquière une capacité à remodeler la lame basale, c'est-à-dire de la dégrader et la sécréter de manière concomitante. De plus, le micro-environnement tumoral pourrait jouer un rôle majeur dans ce processus (45, 46, 47).

La dégradation est médiée par des protéases, qui sont normalement présentes dans la lame basale. Les cellules cancéreuses peuvent exprimer une protéase particulière (notamment celles appartenant à la famille des métalloprotéases matricielles, MMP) qui induisent l'activation d'autres protéases et la dégradation de la matrice extracellulaire. De plus, en dégradant les échafaudages de la lame basale, les MMP peuvent libérer des fragments cryptiques de collagène et laminine avec des fonctions de signalisation (par exemple l'angiogenèse et la transition épithélio-mésenchymateuse)

(45). Une analyse protéomique des signatures matricielles extracellulaires des tumeurs métastatiques a révélé que plusieurs composantes de la lame basale – dont la laminine et le collagène de type IV – sont sécrétées à la fois par les cellules stromales et tumorales des tumeurs hautement métastatiques, mais ne le sont que par le stroma des tumeurs faiblement métastatiques. Ces observations suggèrent que les cellules tumorales primaires modifient activement la composition des lames basales et que les changements qui en résultent dans l'ultrastructure et/ou la signalisation de la lame basale peuvent entraîner des métastases (46).

En histologie, la présence de cellules cancéreuses dans le tissu de soutien mammaire classe la tumeur en « invasive ». En immunohistochimie, un marquage de la protéine p63 – spécifique aux cellules myoépithéliales qui bordent les canaux normaux – permet parfois d'aider au diagnostic. La figure suivante schématise le processus d'invasion et la transition in situ – infiltrant des carcinomes mammaires.

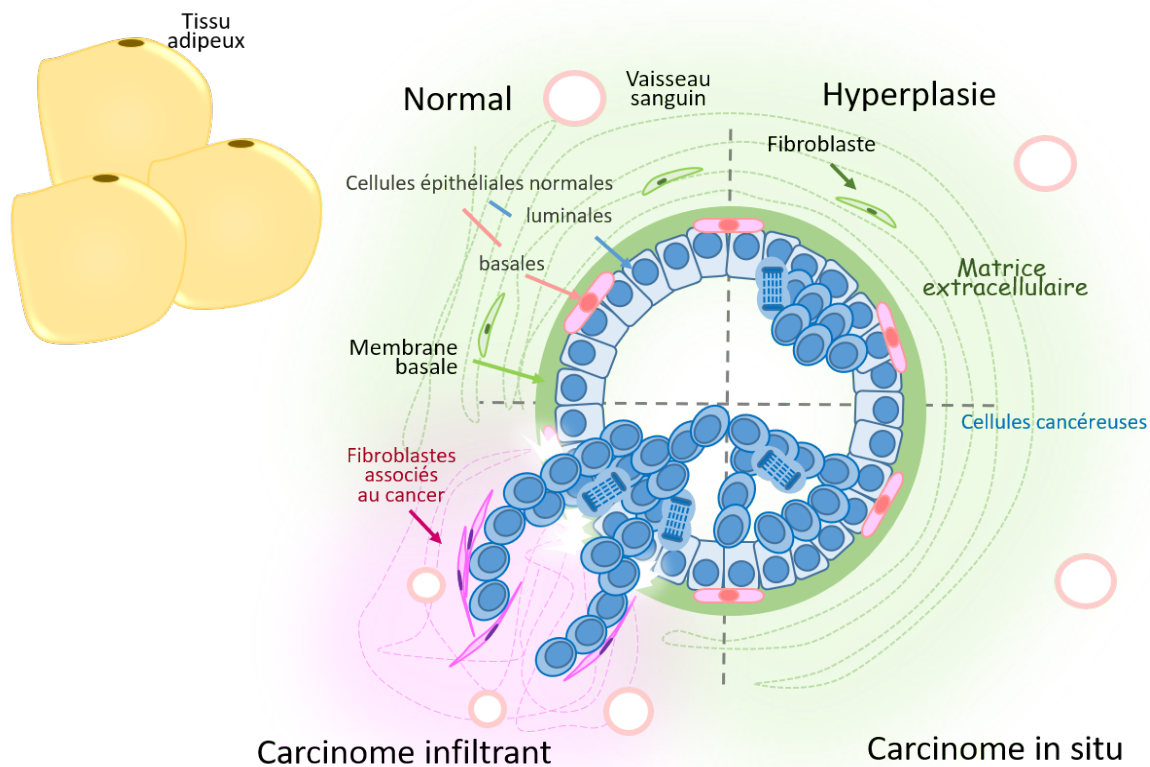


Figure 6. Représentation schématique du processus de cancérisation et d'invasion (en sens horaire).

NB : pratique clinique la distinction entre ces étapes peut parfois être plus complexe car il existe de nombreuses situations frontalières. Image reproduite d'après C. Tomasetto.

1.1.6.3. Sous-types histologiques

Selon la dernière édition (5^{ème} édition) de la classification de l'OMS (48), les carcinomes mammaires sont divisés en 19 sous-types majeurs différents, dont les carcinomes invasifs sans type particulier (70-75% ; également connus sous le nom de « not otherwise specified » ou NOS, anciennement carcinome canalaire(49)), les carcinomes lobulaires (10-14%) (50) et les autres carcinomes de type particulier (y compris plusieurs sous-types histologiques rares différents).

Le carcinome mammaire NOS est un carcinome qui ne correspond pas à un sous-type spécifique. Les carcinomes lobulaires infiltrants sont les deuxièmes sous-types plus fréquents. Morphologiquement, ils se caractérisent typiquement par la présence de petites cellules tumorales uniformes réparties individuellement dans le stroma, formant un motif de file indienne et entourées par les lobules selon un motif concentrique. D'un point de vue moléculaire, ce sous-type est caractérisé par une perte de la E-Cadhérine secondaire à différents mécanismes comme par exemple la mutation génique (50). Ils sont plus fréquemment observés chez la femme âgée par rapport à la femme plus jeune (50).

Certains types spéciaux (tels que tubulaire, cribriforme et mucineux) – s'ils sont purs à au moins 90% (c'est-à-dire sans histologie mixte ou <10% d'un autre sous-type) – ont un très bon pronostic (44). A titre d'exemple, le carcinome mucineux est un sous-type histologique rare caractérisé par une importante production de mucine extracellulaire. Il en existe deux sous-types. Les mucineux purs sont définis comme contenant plus de 90% de mucine, et les mixtes sont ceux contenant 50% à 90% de mucine (51). La présence de moins de 50% de mucine définit le carcinome canalaire invasif avec une composante mucineuse (52). Les carcinomes mucineux représentent de 1 à 4 % des cancers du sein (53), bien que l'incidence des formes pures soit plus élevée chez les femmes âgées (53). De plus, les formes pures ont un comportement moins agressif et un meilleur pronostic que les carcinomes canaux non spécifiques (52, 53).

En revanche, d'autres types particuliers (tels que le carcinome lobulaire pléiomorphe, le carcinome métaplasique de haut grade et le carcinome micropapillaire)

sont associés à un pronostic moins bon. Un autre cas particulier est le cancer du sein inflammatoire, une forme rare et agressive caractérisée par des cellules malignes qui bloquent les vaisseaux lymphatiques dans la peau du sein (44). Les différents sous-types histologiques de la 5^{ème} édition de la classification OMS sont listés ci-dessous :

- Carcinome infiltrant de type non spécifique
- Sous-types spéciaux
 - Carcinome lobulaire infiltrant
 - Carcinome tubuleux
 - Carcinome cribriforme infiltrant
 - Carcinome mucineux
 - Cystadénocarcinome mucineux
 - Carcinome avec différenciation apocrine
 - Carcinome micropapillaire infiltrant
 - Carcinome métaplasique
- Sous-types rares et de type salivaire
 - Carcinome à cellules acineuses
 - Carcinome adénoïde kystique
 - Carcinome sécrétoire
 - Carcinome neuroendocrine
 - Carcinome mucoépidermoïde
 - Adénocarcinome polymorphe
 - Carcinome à cellules hautes et à polarité inverse

- Carcinome neuroendocrine

Le carcinome canalaire in situ, également appelé Ductal In situ Neoplasia (DIN), est considéré comme une lésion pré-cancéreuse. A l'inverse, le carcinome lobulaire in situ (ou Lobular In situ Neoplasia, LIN) est une lésion qui n'est pas considérée comme pré-cancéreuse mais comme un facteur de risque de développer un cancer du sein (54).

1.1.6.4. *Grade tumoral*

L'évaluation du grade histologique se fait selon le système Scarff-Bloom-Richardson (55) modifié par Eltson et Ellis (56), ensuite adopté dans les critères de Nottingham (57). Il repose sur trois caractéristiques tumorales : la proportion de cellules cancéreuses en formation tubulaire, l'anisocaryose (la variation de la taille et de la forme des noyaux entre les cellules) et le nombre de mitoses (divisions cellulaires). Chaque caractéristique est notée selon un système à trois niveaux, et le grade final (G1, G2 ou G3) est déterminé en additionnant les scores individuels. Le grade tumoral reflète l'agressivité potentielle du cancer du sein et constitue un facteur pronostique important :

- Score total de 3, 4 ou 5 : grade I (bas grade)
- Score total de 6 ou 7 : grade II (grade intermédiaire)
- Score total de 8 ou plus : grade III (haut grade)

Tableau I. Score histopronostique de Scarff-Bloom-Richardson modifié par Eltson et Ellis (56)

Critère	Description	Score
Degré de différenciation architecturale	Présence de tubes occupant plus de 75% du champ du microscope	1
	Tubes occupant entre 10 et 75 % du champ du microscope	2
	Tubes occupant moins de 10% du champ du microscope	3
Nombre de mitoses par champ (objectif 40x soit grossissement 400x)	0 à 6 mitoses pour 10 champs	1
	7 à 12 mitoses pour 10 champs	2
	Plus de 12 mitoses pour 10 champs	3
Importance du pléomorphisme nucléaire	Noyaux réguliers entre eux et taille cellulaire < 2 fois noyau normal	1
	Situations intermédiaires	2
	Noyaux réguliers entre eux mais taille > 3 fois la taille d'un noyau normal et nucléole proéminent	3
	OU noyau de tailles irrégulières variant de 1 à 3 fois celle d'un noyau normal	

1.1.6.5. Facteurs pronostiques et prédictifs

La détermination du statut des récepteurs hormonaux (RE et RP) et HER2 est obligatoire pour toutes les patientes atteintes d'un cancer du sein invasif. Au moment du diagnostic, ils sont systématiquement testés par immunohistochimie sur les échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine obtenus à partir de biopsies.

Selon l'ASCO et le CAP, le statut HER2 peut être positif, négatif ou équivoque, évalué par une ou deux approches techniques (58). Le statut HER2-positif est caractérisé par une forte coloration immunohistochimique complète de la membrane ou par une amplification d'ERBB2 détectée par une méthode d'hybridation in situ (hybridation in situ chromogénique ou hybridation in situ fluorescente) dans $\geq 10\%$ des cellules tumorales invasives.

Le récepteur aux estrogènes (RE) et le récepteur à la progestérone (RP) sont les deux récepteurs hormonaux principalement impliqués dans les cancers du sein. Il s'agit de récepteurs nucléaires (qui sont des facteurs de transcription) : des protéines intracytoplasmiques qui se lient à leur ligand, transloquent dans le noyau et se fixent au promoteur cible sur l'ADN double-brin, et peuvent recruter soit des co-activateurs soit des co-represseurs et modulent la transcription de gènes.

Les récepteurs hormonaux possèdent trois domaines fonctionnels : le domaine NTD (NH₂-terminal Domain), le domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA-Binding Domain) et le domaine de liaison au ligand (LBD, Ligand-Binding Domain) (59). RE et RP possèdent le même mécanisme d'action. En absence de ligand (estrogènes ou progestérone), le récepteur est lié à des protéines HSP (Heat Shock Protein) dans le cytoplasme de la cellule. En présence de ligand, le récepteur subit des modifications conformationnelles le dissociant des protéines HSP et permettant au récepteur d'être transloqué dans le noyau. Dans le noyau, le récepteur se dimérise et se fixe sur les séquences régulatrices des gènes cibles. Cette interaction entre le récepteur et les gènes cibles se fait par liaison directe du domaine DBD du récepteur à l'ADN via un élément de réponse appelé ERE ou PRE (Estrogen ou Progesterone Response Elements, respectivement) (59). Cela entraîne ensuite la transcription des gènes cibles.

Il existe deux isoformes connues des RE – RE α et RE β – codés par deux gènes localisés sur deux chromosomes distincts. RE α joue un rôle majeur dans la croissance des cellules cancéreuses mammaires (59), alors que le rôle de RE β reste encore mal connu. RP possède également deux isoformes qui sont codés par le même gène mais transcrits par

deux promoteurs différents et qui sont généralement co-exprimés (60). Les cellules cancéreuses surexprimant le récepteur à la progestérone libèrent des facteurs prolifératifs qui induisent une signalisation paracrine et ont des effets significatifs sur le maintien des cellules souches tumorales et la croissance tumorale (61).

En immunohistochimie, on évalue le pourcentage de cellules tumorales marquées et l'intensité du marquage (de 0 à 3+). On peut le H-Score pour déterminer l'expression des récepteurs hormonaux d'un cancer du sein (62), qui résulte de la multiplication entre le pourcentage et l'intensité moyenne, allant de 0 à 300. L'American Society of Clinical Oncology (ASCO) et le College of American Pathologists (CAP)(63) considèrent que toute coloration nucléaire (quelle que soit l'intensité du signal) dans >1% des cellules tumorales invasives est à considérer comme positive pour les récepteurs hormonaux (RE et/ou RP). Certains pays, comme la France, ne souscrivent pas à ces directives et considèrent que 10 % est une valeur seuil plus pertinente pour la détermination de l'hormonosensibilité (soit un H-score ≥ 10).

Le Human Epidermal growth factor Receptor-2 (HER2), sera détaillé dans la partie 1.2.1, page 69).

L'antigène Ki67 est une protéine codée par le gène MKI67 et est impliqué dans le maintien de l'intégrité des chromosomes mitotiques (64). Il est exprimé tout au long du cycle cellulaire et est absent des cellules quiescentes (65). Sa détection est réalisée par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs à l'aide d'un anticorps spécifique anti-Ki67. L'index Ki67 représente le pourcentage de noyaux colorés par l'anticorps. Il traduit le pourcentage de cellules cancéreuses qui se divisent, et donc le niveau de

prolifération de la tumeur (66). Le Ki67 est largement utilisé pour déterminer la prolifération et prédire la chimiosensibilité. Cependant, le Ki67 n'est pertinent que pour les cancers du sein RE-positifs et HER2-négatifs (les tumeurs de phénotype triple négatif ou HER2-positives constituant une indication de chimiothérapie indépendamment du Ki67). La valeur seuil la plus largement utilisée est de 20% de noyaux colorés dans les cellules tumorales invasives ; une fraction de <15% de noyaux colorés, quelle que soit l'intensité, est considérée comme une prolifération faible, et >30% comme une prolifération élevée. En raison de l'hétérogénéité tumorale, l'index de prolifération Ki67 peut varier de manière importante entre deux territoires de la même tumeur : des zones peuvent être quasiment négatives alors que d'autres « hot spots » sont le siège d'une prolifération élevée. Par conséquent, en pratique clinique, la moyenne du Ki67 sur pièce opératoire est préférable à celle de la microbiopsie initiale pour décider de la chimiothérapie adjuvante.

1.1.6.6. Classification moléculaire

L'hétérogénéité cellulaire et moléculaire du cancer du sein et le grand nombre de gènes impliqués dans le contrôle de la croissance, de la mort et de la différenciation des cellules soulignent l'importance d'étudier de manière globale les multiples altérations génétiques. Le séquençage génique total permet d'étudier simultanément l'activité de milliers de gènes dans une cellule cancéreuse du sein, mais n'est pas appliqué en routine dans les soins cliniques. Les futures applications des séquençages à haut débit adopteront sans doute la même approche pour les protéines (protéomique), la

variabilité germinale à l'échelle du génome (polymorphismes mononucléotidiques) ou le métabolisme cellulaire (métabolomique).

Les études sur l'expression génétique ont permis d'identifier plusieurs sous-types distincts de cancer du sein qui diffèrent en termes de pronostic et de cibles thérapeutiques qu'ils expriment (5, 67, 68, 69). La liste de gènes qui différencie ces sous-types est appelée liste intrinsèque et se compose de plusieurs groupes de gènes liés à l'expression du récepteur des estrogènes (RE) (le groupe luminal), à l'expression du Human epidermal growth factor-receptor 2 (HER2) et à un groupe unique de gènes appelé groupe basal.

Les sous-types moléculaires ont une importance significative en pratique clinique puisque leur prise en charge thérapeutique et leur pronostic sont différents. Cette classification a été développée en 2000 par Perou et al. (68) et actuellement, ces sous-types sont définis par la conférence de consensus de St Gallen de 2013 (70) dont les consignes sont résumées dans le

Tableau II).

Tableau II. Classification moléculaire des cancers du sein

SOUS-TYPE MOLECULAIRE		CARACTERISTIQUES IMMUNOHISTOCHIMIQUES
Luminal A (50%)	Luminal A-like	RE positif HER2 négatif Ki67 bas RP élevé Signature moléculaire à bas risque
Luminal B (15%)	Luminal B-like (HER2-négatif)	RE positif HER2 négatif Ki67 élevé ou RP bas Signature moléculaire à haut risque
Surexpression HER2 (15%)	Luminal B-like (HER2-positif)	RE positif HER2 positif Tout Ki67 et tout RP
	HER2-positif (non luminal)	HER2 positif RE et RP négatifs
Basal-like (20%)	Triple-négatif	HER2, RE et RP négatifs

Les cancers luminaux sont associés aux cellules épithéliales lumineales du tissu mammaire normal, ils constituent les sous-types le plus courants et se caractérisent par l'expression des RE et des récepteurs à la progestérone (PR). Les sous-types luminal A et luminal B présentent certaines distinctions moléculaires et pronostiques importantes. En effet, les tumeurs lumineales A présentent généralement une forte expression des RE, une faible expression d'HER2 et une faible expression des gènes liés à la prolifération (71). Elles ont le meilleur pronostic de tous les sous-types moléculaires (72, 73). Les tumeurs lumineales B présentent une expression relativement plus faible (bien que toujours présente) des RE, une expression variable d'HER2 et une expression plus élevée du cluster de prolifération. Les tumeurs lumineales B ont un pronostic plus

défavorable que les tumeurs lumineales A (73).

Ensuite, le sous-type « enrichi en HER2 » (anciennement sous-type HER2-positif/RE-négatif) se caractérise par une forte expression des groupes de gènes HER2 et de prolifération et une faible expression des groupes de gènes luminaux et basaux. Pour cette raison, ces tumeurs sont le plus souvent négatives pour le RE et le RP, et positives pour HER2.

Enfin, le sous-type RE- RP- HER2- dit « triple négatif » comprend différentes entités telles que les sous-types de récepteurs aux androgènes basaux, claudin-low, riches en interférons ou mésenchymateux.

1.1.6.7. Stadification

Le système de stadification TNM (tumeur, ganglion, métastase) du cancer du sein est un système internationalement reconnu pour déterminer le stade de la maladie. Ce stade de la maladie est utilisé pour déterminer le pronostic et orienter la prise en charge. Il est également utilisé pour faciliter les discussions sur le traitement et le pronostic entre les soignants, ainsi qu'entre les soignants et les patientes.

Cette stadification s'est traditionnellement appuyée sur la taille de la tumeur, l'implication des ganglions lymphatiques et la présence d'une maladie métastatique. Elle évolue régulièrement et la 8^{ème} édition intègre des biomarqueurs, qui améliorent la discrimination pronostique par rapport à la stadification anatomique seule. La classification TNM est établie par l'Union Internationale de Lutte contre le Cancer (UICC) qui a publié la dernière (8^{ème}) version en 2017, ainsi que par l'American Joint

Committee on Cancer (AJCC) qui a publié sa dernière (8^{ème}) version en 2018 (74). Il existe des différences entre les deux versions (75).

La classification TNM est composée de 3 éléments : T pour « tumor », N pour « nodes » et M pour « metastasis ». Il existe 3 préfixes utilisés pour préciser le stade en fonction des différentes thérapeutiques : c = clinique (y compris radiologique) ; p = pathologique (après chirurgie) ; y = après chimiothérapie néo-adjuvante et yp = après chimiothérapie néo-adjuvante puis chirurgie. Les classifications cN et pN sont différentes, contrairement aux classifications T et M. La définition des stades T, N et M est décrite dans les tableaux ci-dessous.

Tableau III. Définitions de la classification T (TNM, UICC, AICC, 8^{ème} édition)

Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
T0	Pas de signe de tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ
Tis (DCIS)	Carcinome canalaire in situ
Tis (Paget)	Maladie de Paget du mamelon sans carcinome invasif associé et/ou carcinome in situ dans le parenchyme mammaire sous-jacent
T1	Tumeur ≤ 20 mm dans sa plus grande dimension
T1mi	Micro-invasion ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension
T1a	Tumeur >1 mm et ≤ 5 mm dans sa plus grande dimension
T1b	Tumeur >5 mm et ≤ 10 mm dans sa plus grande dimension
T1c	Tumeur >10 mm et ≤ 20 mm dans sa plus grande dimension
T2	Tumeur >2 cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
T3	Tumeur >5 cm dans sa plus grande dimension
T4	Tumeur de toute taille avec :
T4a	Extension à la paroi thoracique (invasion du muscle pectoral exclue)
T4b	Œdème cutané y compris la « peau d'orange », ou ulcération cutanée du sein, ou nodules de perméation cutanés limités au même sein
T4c	A la fois 4a et 4b
T4d	Carcinome inflammatoire

Tableau IV. Définitions de la classification cN (TNM, UICC, AICC, 8^{ème} édition)

cN0	Absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional
cN1	Ganglions axillaires de niveau I et II homolatéraux mobiles
cN2	Métastases dans un ou plusieurs ganglions axillaires de niveau I et II homolatéraux fixé(s) ou confluents ou dans un ou plusieurs ganglions mammaires internes homolatéraux cliniquement détectables en l'absence de métastase ganglionnaire axillaire cliniquement évidente
cN2a	Métastases dans un ou plusieurs ganglion(s) axillaire(s) fixé(s) entre eux (confluents) ou à d'autres structures
cN2b	Métastases cliniquement détectables uniquement dans les ganglions mammaires internes , et en l'absence de métastase ganglionnaire axillaire cliniquement décelable
cN3	Métastases dans les ganglions sous-claviculaires homolatéraux (niveau III) avec ou sans envahissement ganglionnaire axillaire (niveau I, II) ou métastase ganglionnaire mammaire interne homolatérale cliniquement détectable en présence de métastase axillaire (niveau I, II) cliniquement évidente ; ou métastases ganglionnaires sous-claviculaires homolatérales avec ou sans envahissement ganglionnaire axillaire ou mammaire interne
cN3a	Métastase(s) ganglionnaire(s) sous-claviculaire(s) (niveau III)
cN3b	Métastases ganglionnaires mammaires internes et axillaires (cN2a+cN2b)
cN3c	Métastase(s) ganglionnaire(s) sus-claviculaire(s)

Tableau V. Définitions de la classification pN (TNM, UICC, AICC, 8^{ème} édition)

pN0	pN0(i-)/(mol-)	Étude immunohistochimique / moléculaire négative
	pN0(i+)/(mol+)	ITC
pN1	pN1mi	Micrométastase
	pN1a	Macrométastases dans 1 à 3 ganglions axillaires
	pN1b	Métastases mammaires internes histologiques mais non cliniquement apparentes
	pN1c	= pN1a + pN1b
pN2	pN2a	Métastases dans 4 à 9 ganglions axillaires lymphatiques
	pN2b	Métastases dans des ganglions mammaires cliniquement apparents en l'absence de métastases ganglionnaires axillaires (idem cN2b)
	pN3a	Métastases dans 10+ ganglions lymphatiques axillaires ou dans les ganglions sous-claviculaires
pN3	pN3b	Métastases dans les ganglions lymphatiques mammaires internes homolatéraux cliniquement apparents en présence de ganglions axillaires positifs ; <u>OU</u> Métastases dans plus de 3 ganglions axillaires et dans les ganglions lymphatiques mammaires internes avec métastases microscopiques ou macroscopiques détectées par exérèse du ganglion sentinelle mais non cliniquement apparent (= pN2a + pN2b)
	pN3c	Métastase(s) ganglionnaire(s) sus-claviculaire(s) homolatérale(s) (idem cN3c)

Tableau VI. Définitions de la classification M (TNM, UICC, AICC, 8^{ème} édition)

Mx	Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
M0	Absence de métastase à distance
cM0(i+)	Présence de micrométastases (<0.2 mm) Présence de cellules ou ADN tumoraux en biopsie liquide Patient asymptomatique et bilan clinique + radiologique négatif
cM1	Métastase à distance (clinique / radiologique) <ul style="list-style-type: none"> - Pulmonaire PULM - Osseuse OSS - Hépatique HEP - Surrénalienne ADR - Cérébrale BRA - Autres OTH - Médullaire MAR - Pleurale PLE - Péritonéale PER - Cutanée SKI - Lymphatiques (ganglions) LYM
pM1	Métastase prouvée histologiquement

Enfin, outre la classification TNM, il existe aussi la classification du stade de la maladie, émise par l'UICC. Elle comporte 4 stades et se base sur la classification TNM.

La stadification du cancer du sein est résumée dans le Tableau VII.

Tableau VII. Stades du cancer du sein selon la classification de l'UICC.

	N0	N1mi	N1	N2	N3	Tout M1
Tis	0	--	--	--	--	IV
T0	--	IB	IIA	--	IIIC	IV
T1	IA	IB	IIA	IIIA	IIIC	IV
T2	IIA	--	IIB	IIIA	IIIC	IV
T3	IIB	--	IIIA	IIIA	IIIC	IV
T4	IIIB	--	IIIB	IIIB	IIIC	IV
Tout M1	IV	IV	IV	IV	IV	IV

1.1.7. Traitements

1.1.7.1. *Chirurgie*

1.1.7.1.1. *Historique de la chirurgie du cancer du sein*

Les interventions chirurgicales ont beaucoup évolué depuis les premières interventions qui étaient très mutilantes jusqu'à nos jours, où une approche moins invasive est préconisée.

L'histoire de la chirurgie moderne du cancer du sein commence en 1882, quand le chirurgien américain William S. Halsted commence à réaliser la mastectomie radicale pour soigner le cancer du sein, et publie ses résultats en 1894 (76). La mastectomie radicale selon Halsted consiste en une ablation du sein ainsi que des muscles pariétaux (grand et petit pectoral) et était associée à un curage axillaire (CA) des 3 niveaux de Berg et souvent un curage de la chaîne mammaire interne.

Cette intervention est restée la référence jusqu'à ce que les chirurgiens britanniques D. H. Patey et W. H. Dyson publient en 1948 une technique alternative moins mutilante (77). Cette intervention consiste en une ablation du sein et du muscle petit pectoral (mais en préservant le muscle grand pectoral) associée avec un CA des 3 niveaux de Berg.

La mastectomie totale développée en 1972 par le chirurgien américain John L. Madden (78) est la technique utilisée actuellement. Elle consiste en une ablation du sein en préservant les muscles pectoraux et à un CA des niveaux I et II de Berg.

Ce n'est que à partir des années 1980 qu'apparaissent les premiers essais cliniques prospectifs randomisés comparant un traitement conservateur du sein (tumorectomie

et CA) versus un traitement radical (79, 80). La désescalade chirurgicale au niveau du creux axillaire débute dans les années 1990 avec le développement de la technique de la lymphadénectomie sélective sentinelle, ou technique du ganglion sentinelle (81). Cette technique est devenue la référence à partir du début des années 2000 suite aux résultats de l'essai contrôlé randomisé NSABP B-32 (82). Depuis, les indications du ganglion sentinelle sont en train de remplacer les indications du CA systématique.



Figure 7. Historique de la chirurgie loco-régionale du cancer du sein

1.1.7.1.2. Chirurgie de l'aire mammaire

Il existe deux types de chirurgie mammaire : le traitement conservateur (TC) et le traitement radical (mastectomie totale). Le TC consiste en la résection chirurgicale de la lésion cancéreuse avec une marge de sécurité tout en laissant en place le sein atteint avec un résultat esthétique correct. Pour réaliser ce type d'interventions, la lésion est repérée avant le geste, soit par guide métallique, soit marquage cutané grâce à la palpation, à la mammographie et l'échographie mammaire selon le contexte. On

réalise l'exérèse glandulaire de la peau jusqu'au plan du pectoral en passant au large de la tumeur (berge chirurgicale d'au moins 10 mm) par abord cutané direct de la tumeur. La pièce est orientée par des fils ou des clips métalliques et une radiographie per-opératoire de la pièce d'exérèse est réalisée afin de s'assurer de la présence de la lésion et des marges de sécurité correctes. On laisse également en place au niveau du lit tumoral de clips métalliques afin de faciliter le contourage du radiothérapeute. La glande est remodelée afin de limiter les séquelles esthétiques du traitement conservateur. Dans certains cas, un geste oncoplastique immédiat peut être réalisé. Les indications du TC sont :

- Si elle permet une exérèse complète de(s) lésion(s) cancéreuses
- Avec des berges saines
- Et ne compromet pas ou peu l'esthétique du sein

Les contre-indications du TC sont :

- Refus de la patiente
- S'il est impossible : rapport des tailles, multicentricité, cancer inflammatoire
- Contre-indication à la radiothérapie

La mastectomie totale consiste en l'ablation du sein en totalité : la résection de toute la glande mammaire, de la majeure partie de la peau qui la recouvre, de la plaquearéolo-mamelonnaire et d'une éventuelle cicatrice de tumorectomie antérieure. On réalise une incision oblique qui emporte une palette cutanée comportant le mamelon et l'aréole. La glande est disséquée superficiellement en emportant les crêtes de Duret et en profondeur en emportant le fascia pré-pectoral. Les indications du TR sont :

- Tumeur de plus de 5 cm (dans la plupart des cas)
- Tumeurs multicentriques
- Tumeur rétro-aréolaire si un geste conservateur n'est pas réalisable
- Récidive après traitement conservateur
- Désir de la patiente
- Contexte familial
- Contre-indication à la radiothérapie

Il existe plus de récurrences en cas de traitement conservateur (0,5%/an pour le TC contre 2% à 20 ans pour le TR), mais la survie globale est identique (83). De plus, le risque de récurrence post-opératoire diminue fortement avec l'ajout d'une radiothérapie post-opératoire (84).

Plus récemment, des nouvelles techniques chirurgicales se sont développées et sont associées à une reconstruction mammaire. Le terme de « mastectomie conservatrice » regroupe les mastectomies permettant de conserver l'étui cutané (skin-sparing mastectomy, ou SSM), avec ou sans la plaque aréolo-mamelonnaire (nipple-sparing mastectomy, NSM), en limitant les rançons cicatricielles et en assurant une reconstruction mammaire immédiate (RMI) (85). En effet, les répercussions psychiques des mastectomies, variables d'une femme à l'autre, peuvent entraîner des perturbations plus ou moins profondes de la féminité, de la sexualité et du bien-être. La RMI constitue une des réponses à la détresse psychique des femmes qui choisissent l'ablation de leurs seins. Néanmoins, la reconstruction ne dispense pas de la question du deuil du sein perdu et de l'appropriation du sein reconstruit, celle-ci étant facilitée par la

préservation de l'étui cutané et de la plaque aréolo-mamelonnaire (85).

1.1.7.1.3. *Chirurgie de l'aire axillaire*

Il existe deux types de chirurgie axillaire : le CA et la lymphadénectomie sélective sentinelle.

La lymphadénectomie sélective sentinelle consiste en la détection, l'exérèse et l'analyse (extemporanée ou non) du/des ganglion(s) sentinelle(s) (GS). Le GS est défini comme le(s) premier(s) ganglion(s) recevant le drainage lymphatique du sein. Pour détecter le(s) GS en cancérologie mammaire, on réalise une méthode comportant 3 techniques :

- La technique isotopique : réalisation d'une lymphoscintigraphie préopératoire avec l'injection la veille de l'intervention du Technétium 99-métastable. La lymphoscintigraphie dresse une cartographie qui peut faciliter l'exécution du geste d'adénectomie sélective, et on utilise une sonde de détection gamma en per-opératoire.
- La technique colorimétrique : injection de bleu de méthylène aux 4 points cardinaux péri-aréolaires après l'induction anesthésique
- La palpation per-opératoire : tout ganglion suspect est également prélevé.

Les indications de la lymphadénectomie sélective sentinelle sont les suivantes :

- En cas de mastectomie totale pour les lésions de néoplasie canalaire in situ
- Pour toute tumeur de 5 cm ou moins, sans atteinte ganglionnaire palpable, avec éventuellement la mise en évidence d'une adénopathie métastatique unique

- En cas de ganglion axillaire palpable mobile (N1) après une échographie axillaire éventuellement complétée par une cytoponction ou une microbiopsie ganglionnaire confirmant l'absence d'atteinte ganglionnaire
- En cas de tumeurs bifocales bénéficiant d'un traitement conservateur (plurifocaux de proximité)
- Après chirurgie tumorale préalable
- En pré- ou en post-chimiothérapie néo-adjuvante pour les patientes cN0 ou cN1 après une exploration négative de l'aisselle (échographie axillaire et cytoponction ou biopsie ganglionnaire négative)

Le CA consiste en une résection des ganglions axillaires des niveaux 1 et 2 de Berg (les ganglions en dessous et en arrière du muscle petit pectoral, mais jamais au-dessus du tendon du muscle petit pectoral). On résèque 10 ganglions au minimum, en conservant le nerf thoracique long, les nerfs intercosto-brachiaux et le pédicule thoraco-dorsal. Les indications du CA sont :

- Tumeur > 5 cm
- Tumeur multifocale
- Atteinte ganglionnaire palpable prouvée par biopsie ou cytoponction ganglionnaire
- Présence de 3 ou plus ganglions macrométastatiques ou présence de rupture capsulaire macroscopique en cas de lymphadénectomie sélective sentinelle (à discuter par rapport à une radiothérapie axillaire)

Le CA comporte de nombreux effets secondaires par rapport à la lymphadénectomie sélective sentinelle : plus de lymphœdème (14-20% vs <1%), une

diminution de la mobilité (17-19% vs <1%) et de la sensibilité (40-78% vs 5%), plus de douleurs (20-30% vs 10%).

1.1.7.2. Traitements systémiques

Les traitements systémiques constituent une partie importante du traitement du cancer du sein. Ils comprennent d'une part la chimiothérapie, mais également l'hormonothérapie, les thérapies ciblées et depuis plus récemment l'immunothérapie.

1.1.7.2.1. Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement du cancer qui utilise des médicaments ayant des propriétés cytotoxiques et visant à détruire les cellules cancéreuses. On associe plusieurs agents cytotoxiques dont le mode d'action est différent. Dans le cancer du sein, la décision se réalise de manière individuelle, l'indication dépendant d'une part du sous-type moléculaire, de la charge tumorale et du risque absolu de récurrence ; et d'autre part de l'état général, de l'âge et des pathologies associées du patient. La chimiothérapie peut être administrée avant (néoadjuvante) ou après (adjuvante) la chirurgie avec des effets équivalents sur les résultats, comme l'a démontré pour la première fois l'essai NSABP-B18 (86). Différents protocoles existent en cancérologie mammaire (les classes thérapeutiques et les mécanismes d'action sont résumés dans le Tableau VIII) :

- Pour les tumeurs HER2-négatives
 - TC (docetaxel et cyclophosphamide)

- AC-T, dose dense (doxorubicine et cyclophosphamide puis paclitaxel)
- AC (doxorubicine et cyclophosphamide)
- TAC (docetaxel, doxorubicine, et cyclophosphamide)
- CMF (cyclophosphamide, methotrexate et 5-fluorouracile)
- (F)EC (epirubicine et cyclophosphamide, avec ou sans 5-fluorouracile)
- (F)EC puis paclitaxel hebdomadaire ou docétaxel toutes les 3 semaines
- Pour les tumeurs HER2-positives (ou HER2-low)
 - TH (paclitaxel et trastuzumab)
 - TCH (docetaxel, carboplatine, et trastuzumab)
 - TCHP (trastuzumab, pertuzumab, carboplatine, et docetaxel)
 - AC-TH (doxorubicine et cyclophosphamide puis by paclitaxel et trastuzumab)
 - AC-THP (doxorubicine et cyclophosphamide puis paclitaxel, trastuzumab, et pertuzumab)
 - (F)EC-THP ((F)EC suivi de docetaxel, pertuzumab, et trastuzumab)
 - THP-(F)EC-H (docetaxel, trastuzumab, et pertuzumab neoadjuvants suivis de (F)EC adjuvants avec trastuzumab)
 - THP (docetaxel, trastuzumab, et pertuzumab)
 - Ado-trastuzumab-emtansine
 - Trastuzumab-deruxtecan

Tableau VIII. Les principales molécules cytotoxiques utilisées en cancérologie mammaire (traitements (néo)adjuvants)

Molécule	Classe thérapeutique	Mécanisme d'action
Cyclophosphamide	Alkylant (moutardes azotées)	Les agents alkylants possèdent des groupes réactifs (généralement des alkyles) qui se fixent sur l'ADN ou l'ARN, ce qui entraîne une interruption de la synthèse de l'ADN, de l'ARN ou des protéines.
Carboplatine	Alkylant (Organoplatines)	
Paclitaxel	Poison du fuseau (antimicrotubule)	Les agents antimicrotubules (inhibiteurs mitotiques) inhibent la mitose cellulaire en interférant avec la formation ou la fonction des microtubules.
Docetaxel	Poison du fuseau (antimicrotubule)	
Methotrexate	Antimétabolite (analogue de l'acide folique)	Les antimétabolites sont des analogues structurels de molécules naturelles nécessaires à la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Lorsqu'ils remplacent les substances naturelles du corps, ils perturbent la synthèse de l'ADN et de l'ARN.
5-fluorouracile	Antimétabolite (analogue pyrimidique)	
Doxorubicine	Inhibiteur de topoisomérase 2	Les inhibiteurs de la topoisomérase (I et II) provoquent des cassures de brins d'ADN en perturbant la fonction des enzymes topoisomérase, qui sont responsables de la régulation de la structure tridimensionnelle de l'ADN.
Epirubicine	Inhibiteur de topoisomérase 2	

1.1.7.2.2. *Hormonothérapie*

L'hormonothérapie a pour but d'empêcher l'action stimulante des hormones sexuelles sur les cellules cancéreuses. Les hormonothérapies agissent selon 3 principes différents qui sont utilisées dans le cancer du sein, avec une classe médicamenteuse correspondante :

- Inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire : les analogues de la GnRH
- Inhibition de la synthèse enzymatique des hormones stéroïdiennes : les anti-

aromatase

- Inhibition de l'action directe des hormones stéroïdiennes : les anti-estrogènes

Le traitement hormonal adjuvant est la norme pendant au moins 5 ans après l'intervention chirurgicale en cas de cancer du sein hormonosensible.

Les anti-estrogènes comprennent deux classes thérapeutiques : les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) comme le tamoxifène et les SERD (Selective Estrogen Receptor Down regulator) comme le fulvestrant. Le tamoxifène est une pro-drogue. Il est métabolisé en endoxifène, puis se lie au RE et bloque de manière compétitive la liaison des estrogènes. Le fulvestrant, plus récent, est un antagoniste pur des RE car il empêche sa dimérisation (nécessaire à son activation).

Chez les patientes préménopausées, le tamoxifène (anti-estrogène) est le traitement standard en situation adjuvante ; chez les patientes préménopausées à haut risque qui ont également reçu une chimiothérapie adjuvante, l'ajout d'une suppression ovarienne avec un analogue de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) (qui inhibe la production d'œstradiol) au tamoxifène améliore la survie sans maladie et la survie globale par rapport au tamoxifène seul, comme l'a démontré l'analyse conjointe des essais SOFT et TEXT (87).

Chez les femmes ménopausées, le tamoxifène et les inhibiteurs de l'aromatase peuvent être donnés. Par rapport au tamoxifène, l'administration d'un inhibiteur de l'aromatase pendant 5 ans réduit la mortalité due au cancer du sein d'environ 15 % (bénéfice relatif) (88). Le choix thérapeutique dépend du risque de rechute, des contre-indications et de la tolérance.

En ce qui concerne le cancer du sein hormonosensible HER2-négatif métastatique, plusieurs essais randomisés de phase III ont montré que les inhibiteurs de CDK4/6 (qui bloquent le cycle cellulaire) sont actifs et sont devenus l'option thérapeutique préférée en association avec l'hormonothérapie. Actuellement, quatre grands essais adjuvants internationaux évaluent l'ajout d'un inhibiteur de CDK4/6 à un traitement endocrinien pendant 2 à 3 ans chez des patientes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce, luminal, HER2-négatif, à risque intermédiaire ou élevé (44).

En situation métastatique, le traitement antihormonal de 1^{ère} ligne comprend la l'association des inhibiteurs de l'aromatase et des inhibiteurs de CDK4/6, et chez les femmes ménopausées l'ajout d'une suppression ovarienne. Les SERD sont un traitement de 2^{ème} ligne et sont indiqués en cas de progression sous ce traitement de 1^{ère} ligne ou en cas de rechute sous hormonothérapie.

1.1.7.2.3. Thérapies ciblées

Les options thérapeutiques actuelles pour le cancer du sein s'orientent vers des thérapies ciblées moins toxiques qui peuvent être adaptées de manière individuelle. Il existe des options thérapeutiques ciblées pour les différents sous-types de cancer du sein, qui exploitent les différents moteurs de la carcinogenèse (89). Les thérapies ciblées anti-HER2 seront discutées dans la section « 1.2.3. Thérapies ciblées anti-HER2 », page 81. Toutefois, dans le cancer du sein HER2-positif peuvent apparaître des résistances aux traitements y compris les thérapies ciblées anti-HER2. Cette résistance reste un problème majeur qui entrave l'efficacité des stratégies anti-HER2. Le principal

mécanisme de résistance est l'altération de la voie phosphatase and tensin homolog (PTEN)/ phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (AKT). Les inhibiteurs de PI3K (de la sous-unité α), une autre thérapie ciblée, sont en cours d'évaluation dans le cancer du sein après le succès d'un inhibiteur de PI3K (alpelisib) dans le cancer du sein métastatique RE-positif et HER2-négatif (90). Certaines données précliniques indiquent le potentiel du ciblage PI3K/mTOR en association avec le trastuzumab pour le cancer du sein HER2-positif avec ou sans expression des RE (91). Cependant, le rôle de cette thérapie dans le cancer du sein HER2-positif avec mutations PIK3CA et/ou perte de PTEN n'est pas encore défini (91).

En cas de mise en évidence d'un variant délétère des gènes *BRCA1/2* en germlinal, un autre traitement est également disponible : les inhibiteurs de poly(ADP-ribose) polymérase (PARP). L'olaparib est indiqué dans le traitement adjuvant des patientes adultes atteintes d'un cancer du sein précoce à haut risque, muté dans la lignée germinale du gène de susceptibilité au cancer du sein (BRCA), HER2-négatif (hormonosensible ou non), et qui ont été traitées par chimiothérapie néoadjuvante ou adjuvante (92, 93). Ce traitement est indiqué pour la durée d'un an.

Des thérapies ciblées anti-angiogéniques telles que les anti-VEGF ont été évaluées dans le cancer du sein (notamment le phénotype triple négatif), tels que le bevacizumab. Les résultats ont montré des bénéfices insuffisants et par conséquent cette classe thérapeutique n'est actuellement pas recommandée (89).

1.1.7.2.4. *Immunothérapie*

L'immunothérapie du cancer représente une avancée significative de ces dernières années en oncologie. Elle a démontré une activité antitumorale impressionnante et un bénéfice clinique durable dans diverses tumeurs malignes, avec un succès récent dans le cancer du sein triple négatif (94). Historiquement considéré comme peu immunogène, le cancer du sein n'a pas fait l'objet d'études approfondies pour déterminer s'il était sensible à l'immunothérapie. Cependant, les récentes percées des inhibiteurs de check-point immunitaire (ICI) dans d'autres cancers, associées aux preuves croissantes de l'influence du système immunitaire sur le comportement du cancer, ont conduit au développement d'essais cliniques évaluant différents types de stratégies thérapeutiques immunitaires pour les patientes atteintes d'un cancer du sein (95). La présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL) dans le microenvironnement tumoral reflète une réponse immunitaire antitumorale préexistante et est associée à un meilleur pronostic et à une meilleure réponse à la chimiothérapie (96).

Dans le cancer du sein triple négatif, l'association de l'immunothérapie basée sur les inhibiteurs de Programmed Death receptor-1 et son ligand (PD-1/PD-L1) avec la chimiothérapie s'est avérée efficace les essais cliniques de phase 3 à la fois dans les cancers du sein précoces et avancés. Ces résultats encourageants ont conduit aux premières autorisations des ICI dans le cancer du sein triple négatif et offrent ainsi de nouvelles possibilités thérapeutiques dans les tumeurs agressives et les populations difficiles à traiter (95). En outre, plusieurs essais étudient la combinaison

d'immunothérapies impliquant des ICI avec d'autres traitements oncologiques (97, 98) et avec d'autres stratégies immunothérapeutiques telles que les vaccins anticancéreux, les cellules CAR-T, les anticorps bispécifiques et les virus oncolytiques dans tous les sous-types de cancer du sein (95).

Actuellement en France, le pembrolizumab, un anticorps monoclonal humanisé anti-PD-1, en association avec la chimiothérapie néoadjuvante dans le cancer du sein de phénotype triple négatif est actuellement autorisé hors essai clinique. L'essai de phase 3 I-SPY2 avait montré une amélioration de la réponse au traitement systémique néoadjuvant (99). En ce qui concerne le cancer du sein HER2-positif, il existe moins de données dans la littérature et pour l'instant il n'y a pas eu d'autorisation de mise sur le marché (95).

1.1.7.3. Radiothérapie

La radiothérapie est une technique consistant en l'utilisation de rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses (100). La radiothérapie est utilisée dans un grand nombre de cancers solides ainsi que dans certaines hémopathies du fait de son impact thérapeutique majeur. On estime que plus de 50% des cancers diagnostiqués (tout type confondu) bénéficieront d'une radiothérapie (101). Il existe 4 types de particules utilisées dans la radiothérapie. Les photons et les électrons sont les plus répandus, et les protons et les ions carbonés (hadronthérapie) sont en développement. L'irradiation d'une population de cellules produit une cascade d'événements physiques, chimiques, biochimiques puis biologiques aboutissant à la destruction des cellules ayant

des systèmes de réparation cellulaire défaillants, c'est-à-dire les cellules cancéreuses (102).

En cancérologie mammaire et hors situation métastatique, l'objectif de la radiothérapie adjuvante est d'éradiquer tout dépôt tumoral subsistant après l'intervention chirurgicale chez les patientes ayant eu une chirurgie conservatrice du sein ou une mastectomie (103). Cela permet de réduire le risque de récurrence locorégionale et d'améliorer la survie globale et spécifique au cancer du sein.

La radiothérapie postopératoire améliore la survie sans maladie et la survie globale des patientes atteintes d'un cancer du sein au stade précoce avec atteinte des ganglions lymphatiques et/ou dans le cadre d'une thérapie conservatrice du sein, soit par l'élimination des cellules tumorales résiduelles (104) et/ou par l'induction d'un effet abscopal (processus probablement immunologique induit par la radiothérapie locale et agissant sur les cellules cancéreuses à distance, réduisant ainsi le risque d'évolution métastatique) (105). La réduction proportionnelle des récurrences locorégionales par radiothérapie après chirurgie est, pour la plupart des indications, d'environ 75%, avec une relation dose-effet pour le contrôle local (106). Cependant, les bénéfices en termes de récurrences, y compris les métastases à distance, montrent une interaction complexe avec les facteurs de risque de la tumeur primaire et l'efficacité de la thérapie systémique adjuvante (107). La radiothérapie loco-régionale diffère selon le traitement chirurgical (conservateur versus mastectomie totale) et comprend deux aires : l'aire mammaire (ou paroi thoracique en cas de mastectomie totale) et l'aire ganglionnaire (chaîne mammaire interne et sus-claviculaire, l'irradiation axillaire ayant des indications

différentes).

En cas de traitement conservateur, la radiothérapie de l'aire mammaire consiste essentiellement une radiothérapie du sein entier (whole breast radiation therapy, WBRT). Cette radiothérapie réduit le taux de récurrence locorégionale et le risque de décès par cancer du sein. Ces avantages de la radiothérapie du sein restant sont démontrés par la méta-analyse réalisée en 2011 par le Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), qui a inclus plus de 10000 femmes dans 17 essais (104). Cette méta-analyse a montré une réduction de près de 50 % du risque à 10 ans de récurrence par rapport à la chirurgie conservatrice du sein seule (19 contre 35%, respectivement ; risque relatif [RR] 0,52, IC95% 0,48-0,56) ; ainsi qu'une réduction du risque de décès par cancer du sein sur 15 ans (21 contre 25 % ; RR 0,82, IC95% 0,75-0,90). La radiothérapie du sein restant peut être complétée par une surimpression du lit tumoral (irradiation complémentaire de la zone mammaire où se situait la tumeur avant la chirurgie). Cette surimpression a pour but de réduire les taux de récurrence locorégionale. Par ailleurs, d'autres techniques existent telles que l'irradiation partielle accélérée du sein, qui consiste en une radiothérapie limitée et ciblée qui délivre une dose plus élevée par jour à un volume limité de tissu, englobant le lit tumoral avec la marge sur une période plus courte et entraînant potentiellement moins de symptômes mammaires et d'effets secondaires cutanés tardifs.

La radiothérapie des aires ganglionnaires améliore le pronostic de la maladie sans augmenter la mortalité non liée au cancer du sein (106, 108, 109, 110). Actuellement, les patientes traitées par mastectomie totale atteintes de tumeurs de grande taille (>5

cm) et/ou ayant une atteinte ganglionnaire, ou en présence d'autres facteurs de mauvais pronostic, présentent une indication de radiothérapie (111).

Actuellement, la désescalade thérapeutique du cancer du sein concerne également la radiothérapie, en raison de ses effets secondaires potentiels (cutanés, fibrose, toxicité cardiaque et pulmonaire, et risque de cancer secondaire radio-induit). La réduction de la dose de la radiothérapie peut être obtenue par plusieurs moyens, notamment par des techniques basées sur le volume en utilisant des recommandations de contourage définies anatomiquement pour améliorer la couverture de la dose des tissus à risque tout en diminuant simultanément la taille des volumes irradiés. Par ailleurs, la réduction des indications permet aussi cette désescalade, par exemple en utilisant des signatures moléculaires dans les carcinomes canauxaires in situ (112).

En situation métastatique, la radiothérapie permet d'irradier des localisations secondaires (à but antalgique, mais également dans un but curatif en cas de maladie oligo-métastatique notamment lorsqu'elle est uniquement osseuse) et parfois des lésions cutanées hémorragiques ou douloureuses.

1.2. Le cancer du sein HER2+

Le cancer du sein est une maladie hétérogène, composée de différents sous-types biologiques qui ont des comportements et des pronostics distincts. Parmi ces phénotypes, l'amplification du récepteur 2 du human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) est présente dans 13 à 15 % des cas (44), toutefois ce taux peut varier de 8 à 30% selon le sous-type tumoral (113). L'amplification d'HER2 entraîne des tumeurs biologiquement plus agressives et ayant une sensibilité accrue à la chimiothérapie. Aujourd'hui, dans la pratique clinique, la positivité de HER2 est établie par le pathologiste à l'aide de l'immunohistochimie (IHC), éventuellement de l'hybridation in situ (ISH), conformément aux lignes directrices internationales (114).

1.2.1. Le récepteur HER2

HER2 est une protéine transmembranaire et un récepteur à tyrosine kinase, qui appartient à la famille HER : human epidermal growth factor receptor (115). HER2 est impliqué dans les voies de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire.

1.2.1.1. *Historique d'HER2*

L'historique de la découverte d'HER2 et de son rôle en tant que biomarqueur et cible thérapeutique est résumée dans la Figure 8, d'après la revue de la littérature de Swain *et al.* publiée en 2023 (116). En 1962, Stanley Cohen (117) a découvert la protéine responsable de l'ouverture des incisives et des paupières chez la souris, appelée

facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor, EGF). La démonstration que le récepteur de l'EGF (EGFR) formait des complexes après la liaison de l'EGF a été postulée comme étant l'étape initiale de la croissance cellulaire. Par la suite, en 1986, Stanley Cohen et Rita Levi-Montalcini ont reçu conjointement le prix Nobel de physiologie / médecine pour la découverte des facteurs de croissance. La description et la découverte des oncogènes a débuté au milieu des années 70 par Harold Varmus et Michael Bishop qui ont également reçu le prix Nobel de physiologie / médecine pour leur découverte montrant que les rétrovirus obtenaient des gènes cellulaires de l'hôte (c'est-à-dire des oncogènes). L'intersection de deux domaines scientifiques a permis de découvrir qu'il existait une homologie entre les oncogènes et les récepteurs de facteurs de croissance (116).

ErbB (un autre nom pour les récepteurs de l'Epidermal growth factor), a été initialement décrit en 1935 dans un rétrovirus d'érythroblastose aviaire. Ce nom est dérivé de celui du virus. On a découvert que v-erbB avait des propriétés transformantes et était un oncogène. Finalement, on a découvert que l'homologue 2 du virus de la leucémie érythroblastique (v-erbB2) était étroitement homologue de l'EGFR. En outre, on a pensé que l'EGFR avait été acquis à partir de l'oncogène c-erbB2. Il a été décrit que des lignées cellulaires de souris et d'autres animaux étaient transformées par de l'ADN de neuroblastome, de gliome et de carcinome (appelé plus tard *neu*) provenant de lignées cellulaires malignes de rat ou de souris. Une protéine de 185 kDa a été trouvée pour induire la transformation par *neu* ; le gène *neu* était homologue à erb-B, et p185 était apparenté à EGFR (118). La séquence de l'EGFR publiée en 1984 a établi

qu'elle était similaire à v-erbB2 (116).

Des études de séquençage ont révélé que le récepteur tyrosine kinase HER2 présentait une homologie étendue avec *neu* et que les deux étaient situés sur le chromosome 17 (119). HER2 et *neu* avaient des séquences différentes mais étaient étroitement liés au gène EGFR, situé sur le chromosome 7. Il a donc été déterminé que HER2 et *neu* étaient homologues de ERBB2 mais différents de EGFR (HER1). Par la suite, deux autres membres de la famille HER ont été décrits : HER3 sur le chromosome 12 et HER4 sur le chromosome 2. Les domaines de liaison à la tyrosine de tous les HER sauf HER3 (qui n'a pas d'activité tyrosine kinase catalytique) sont similaires. Il a ensuite été démontré qu'un anticorps monoclonal (mAb) dirigé contre p185 dans des lignées cellulaires *neu*-transformées limitait leur phénotype transformé et inhibait la croissance tumorale chez la souris (120). Ces travaux ont été la preuve du concept de thérapie ciblant HER2 (116).

Des recherches ultérieures ont permis de déterminer que seule l'amplification du gène avec la surexpression de la protéine HER2 qui en résulte était nécessaire à la transformation cellulaire (121). La surexpression de HER2 a été constatée dans les tumeurs mammaires humaines, et les fonctions de signalisation et de transformation de HER2 conduisant à la croissance ont été associées à un mauvais pronostic (122). Ces travaux ont ouvert la voie au développement d'un anticorps monoclonal ciblant le récepteur HER2 dans le cancer du sein humain : un anticorps monoclonal murin contre HER2, m4D5, généré sur p185HER2 et réduisant la prolifération cellulaire, a stimulé le développement d'un anticorps monoclonal humanisé contre HER2, humAb4D5-8,

finalement nommé trastuzumab ou Herceptin (123). Les études cliniques de phase I et II démontrant l'activité du trastuzumab ont été suivies d'une étude d'enregistrement de phase III qui a conduit à l'approbation du trastuzumab en 1998 par la Food and Drugs Administration pour les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique HER2+ (124).

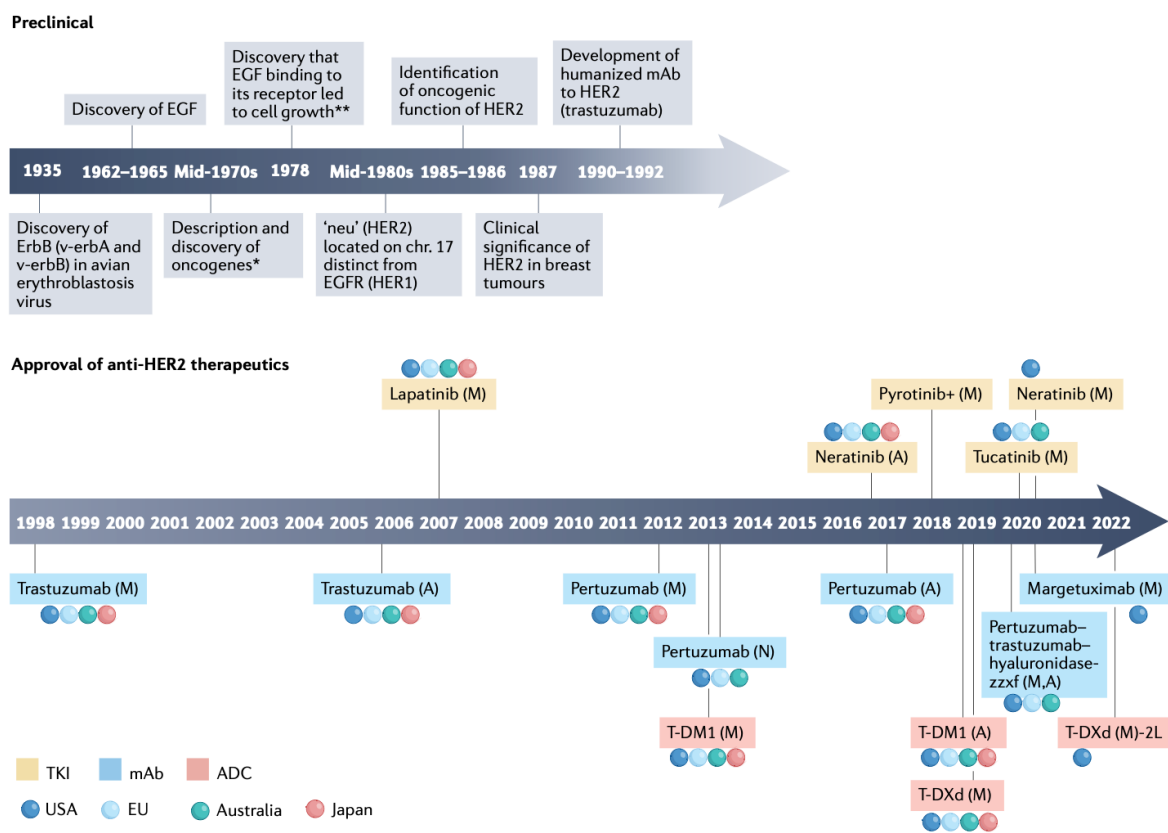


Figure 8. Évolution d'HER2 en tant que biomarqueur et cible thérapeutique. Image reproduite d'après Swain et al. (2023) (116)

A : traitement adjuvant ; M : traitement métastatique ; N : traitement néoadjuvant ; + : approuvé en Chine uniquement ; * : M. Bishop et H. Varmus ont reçu le prix Nobel en 1989 pour cette découverte ; ** : S. Cohen et R. Levi-Montalcini ont reçu le prix Nobel en 1986 pour la découverte des facteurs de croissance et de leurs récepteurs.

1.2.1.2. Les récepteurs tyrosine kinase

Le processus de transduction du signal permet à une cellule de réguler ses processus internes et ses cascades de signalisation à la suite de la liaison d'un messager extracellulaire à un récepteur membranaire spécifique. Plusieurs types de récepteurs membranaires sont impliqués dans ce processus, notamment les récepteurs couplés à une protéine G, les récepteurs sérine/thréonine kinase et les récepteurs tyrosine kinase (RTK). Les RTKs ont été découverts il y a 43 ans par Hunter et Sefton (125). Environ 20% du génome humain code pour des protéines qui participent à la transduction du signal. Ces protéines comprennent des kinases et des phosphatases qui régulent la phosphorylation des cascades de signalisation intracellulaire. Différentes familles de récepteurs tyrosine kinase existent, telles que les récepteurs de l'EGFR, les récepteurs à l'insuline, les récepteurs au VEGF, le récepteur au facteur de croissance des hépatocytes c-Met, etc. HER2 appartient à la famille HER : human epidermal growth factor receptor (115). HER2 est impliqué dans les voies de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire. La famille HER est composée de 4 membres : HER1, HER2, HER3 et HER4. Les quatre protéines ERBB (ou EGFR) sont membres de la sous-classe I de la superfamille des RTK ; elles comprennent EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 et ERBB4/HER4. Contrairement aux autres récepteurs ErbB, HER2 ne lie aucun des ligands ErbB (126, 127), tel que le Epidermal Growth Factor (EGF), le Transforming Growth Factor (TGF)- α , les neuregulines, etc.

1.2.1.3. *Rôle physiologique d'HER2*

La protéine HER2 est ubiquitaire, c'est-à-dire qu'elle est présente dans tous les tissus humains. Elle est particulièrement abondante dans la peau, les poumons, les muscles, le tractus gastro-intestinal, les seins, l'utérus et le placenta (128). La fonction physiologique de HER2 est importante dans l'organogenèse, notamment dans le développement cardiaque (129). L'activation des récepteurs HER2 favorise l'hypertrophie et la prolifération des cardiomyocytes adultes et embryonnaires, et elle réduit également l'apoptose des cardiomyocytes et participe à leurs mécanismes de réparation (130). Les souris KO pour HER2 meurent avant le 11ème jour de développement embryonnaire en raison d'une malformation cardiaque (131). De plus, HER2 est impliqué dans le développement normal de la glande mammaire (défaut de pénétration lors de l'organogenèse, anomalies architecturales et du développement des unités terminales ducto-lobulaires) (132).

1.2.1.4. *Structure d'HER2*

HER2 est un récepteur transmembranaire composé de 4 domaines : un domaine extracellulaire (ECD), un transmembranaire (TMD), puis une région cytoplasmique/intracellulaire composée d'un domaine kinase (KD) et d'un domaine C-terminal (CTD) (115, 133). L'ECD comprend quatre sous-domaines (I-IV) ; en l'absence de ligand, les domaines II et IV adoptent une conformation fermée auto-inhibée. Lors de l'interaction du ligand entre les domaines I et III, le bras de dimérisation du domaine II se détache, ce qui entraîne l'homo- ou l'hétérodimérisation

du récepteur, l'activation de la kinase allostérique et la phosphorylation du CTD (133).

En l'absence de ligand, les récepteurs existent sous forme monomérique. La liaison du ligand sur le domaine extracellulaire (extracellular domain, ECD) du récepteur induit un changement de conformation de ce domaine, entraînant l'activation du récepteur et sa dimérisation (115, 134).

1.2.1.5. Voies de signalisation d'HER2

L'association avec des protéines en aval détermine quelle voie sera activée. Il existe deux voies de signalisation intracellulaires principales qui peuvent être activées et aboutir à différents effets biologiques : la voie Ras/Raf/MAPK et la voie PI3K/Akt/mTOR (135).

L'hétérodimérisation d'HER2 avec HER1, HER3 ou HER4 se caractérise par un schéma d'autophosphorylation distinctif, qui sert de site d'ancrage pour les domaines de liaison SH2 ou phosphotyrosine. Shc, Grb7 et Sos2 sont des protéines adaptatrices qui activent la voie Ras/Raf/MAPK. Cette autophosphorylation permet une activation de la voie PI3K/Akt/mTOR. En cas d'homodimérisation HER2/HER2, la voie PI3K/Akt/mTOR est activée (135).

HER2 participe à la voie de signalisation MAPK, l'une des voies les plus cruciales pour la prolifération cellulaire. Les trois principales sous-familles de MAPK comprennent les kinases régulées par le signal extracellulaire (ERK MAPK, Ras/Raf1/MEK/ERK), les c-Jun N-terminal ou les protéines kinases activées par le stress (JNK ou SAPK), et MAPK14 (135). Les MAP kinases activées phosphorylent

et activent des facteurs de transcription déjà présents dans le cytoplasme ou le noyau, ce qui entraîne l'expression de certains gènes cibles et une réponse biologique.

La voie PI3K-dépendante est une autre voie de signalisation associée à HER2. Les PI3K sont divisés en trois classes (I-III) en fonction de leurs substrats préférés et de l'homologie de leur séquence (136). Les différentes isoformes de chaque classe de PI3K et les différentes classes de PI3K jouent des rôles spécifiques dans la transduction des signaux cellulaires. HER2 active les PI3K de classe IA, qui sont des hétérodimères contenant une sous-unité catalytique et une sous-unité régulatrice (137). Le phosphoinositol-3,4,5-trisphosphate, se lie et active de nombreuses protéines, la protéine sérine/thréonine kinase AKT, communément appelée PKB, est l'une de ses principales cibles (138). Le recrutement de la protéine mammalian targets of rapamycin-riCTOR kinase (mTOR) et de la 3-phosphoinositide-dependent kinase (PDK1) conduisent à l'activation complète de l'AKT, qui à son tour phosphoryle de multiples protéines cibles et régule un certain nombre d'activités cellulaires. Les principales activités biologiques de la voie PI3K comprennent le métabolisme cellulaire, le cycle cellulaire et les fonctions liées à la survie cellulaire, la synthèse des protéines, la polarité et la motilité cellulaires (139).

L'activation de la signalisation d'HER2 déclenche de multiples réactions biologiques coordonnées, notamment la mitogenèse, la survie cellulaire, la migration cellulaire, l'angiogenèse et la régulation de la différenciation (139).

1.2.2. HER2 et cancer

1.2.2.1. *Amplification et surexpression d'HER2*

L'amplification et la surexpression de HER2 jouent un rôle central dans l'initiation, la progression et la métastase de certains cancers, dont le cancer du sein, des ovaires, du poumon et de l'estomac (115). Les mutations génétiques dans les cancers du sein comprennent l'amplification du gène HER2, ce qui entraîne une surexpression de la protéine HER2 (115). En général, la surexpression de HER2 est associée à l'amplification génique, mais certaines tumeurs de caractère moins agressif présentent une expression élevée sans amplification génique (140). De plus, un sous-ensemble de cancers du sein qui amplifient le gène HER2 ne surexpriment pas la protéine HER2 (141). La surexpression de la protéine HER2 conduit principalement à l'hétérodimérisation de HER2-HER3 (142). L'hétérodimère HER2-HER3 active plusieurs voies de signalisation : les voies PI3K/Akt/mTOR, JAK/STAT et Ras/Raf/MEK/ERK, entraînant un effet oncogène sur différentes caractéristiques du cancer comme l'immortalité et la survie (143).

1.2.2.2. *Diagnostic de l'amplification et de l'expression d'HER2 en cancérologie*

Compte tenu de l'importance du statut HER2 pour le pronostic et la prise de décision thérapeutique, il est essentiel d'évaluer avec précision ce biomarqueur. Les méthodes standard de test de HER2 comprennent l'hybridation *in situ* (ISH), qui

quantifie le nombre de copies du gène HER2, et l'immunohistochimie (IHC), qui mesure l'expression de HER2 à la surface des cellules (116). L'IHC quantifie l'expression de HER2 à la surface des cellules en utilisant une coloration membranaire, tandis que l'ISH indique le niveau d'amplification du gène HER2. Généralement, les résultats équivoques de l'IHC sont confirmés par l'ISH. Les résultats obtenus à l'aide des méthodes de test actuelles ne sont pas sans ambiguïté, ce qui complique les décisions cliniques concernant l'utilisation d'une thérapie anti-HER2.

Le score immunohistochimique repose sur l'analyse de deux paramètres : l'intensité du signal et sa localisation (membranaire). Le score est noté de 0 à 3+. Les scores 0 ou 1+ sont considérés comme négatifs, le score 3+ classe la tumeur en tant que HER2-positif. Le score intermédiaire (2+) impose la réalisation d'un examen de deuxième ligne afin de mesurer l'amplification du gène HER2 : l'hybridation in situ. Il existe 3 différentes techniques : la fluorescence (FISH), la chromogène (CISH) et l'argent (SISH). La fiabilité des résultats de l'IHC est influencée par des variables pré-analytiques, notamment la manipulation, la fixation et le stockage des échantillons, ainsi que la coloration (144, 145). La nature subjective de l'interprétation du pathologiste est également à l'origine de la variabilité des résultats de l'IHC, tout comme le manque de reproductibilité entre les laboratoires (146), notamment en cas de score 2+ (147).

Le principe de l'hybridation in situ est d'hybrider l'ADN de la tumeur avec deux sondes d'ADN révélables : une sonde complémentaire du gène HER2 et une deuxième sonde reconnaissant le centromère du chromosome 17 (CEP17, le gène HER2 étant

situé sur le chromosome 17). Les tests à double sonde indiquent le rapport entre HER2 et CEP17, tandis que les tests à sonde unique indiquent directement le nombre de copies de HER2. Le CEP17 sert de contrôle interne. Bien que rare, la polysomie du chromosome 17 peut conduire à des résultats faussement négatifs pour l'amplification de HER2 (148). L'ISH présente certains inconvénients : elle est plus coûteuse, plus difficile sur le plan technique et prend plus de temps. Cependant, elle est associée à une variabilité inter-observateur moindre, est considérée comme assez précise et produit des résultats équivoques dans seulement 5% des cas environ (149).

Les recommandations de l'American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists (ASCO-CAP) évoluent pour améliorer la précision et l'utilité clinique du test HER2 en fournissant des algorithmes spécifiques (114, 150). La Figure 9 résume les conditions de positivité d'HER2 en immunohistochimie ou en hybridation in situ d'après les recommandations de 2018.

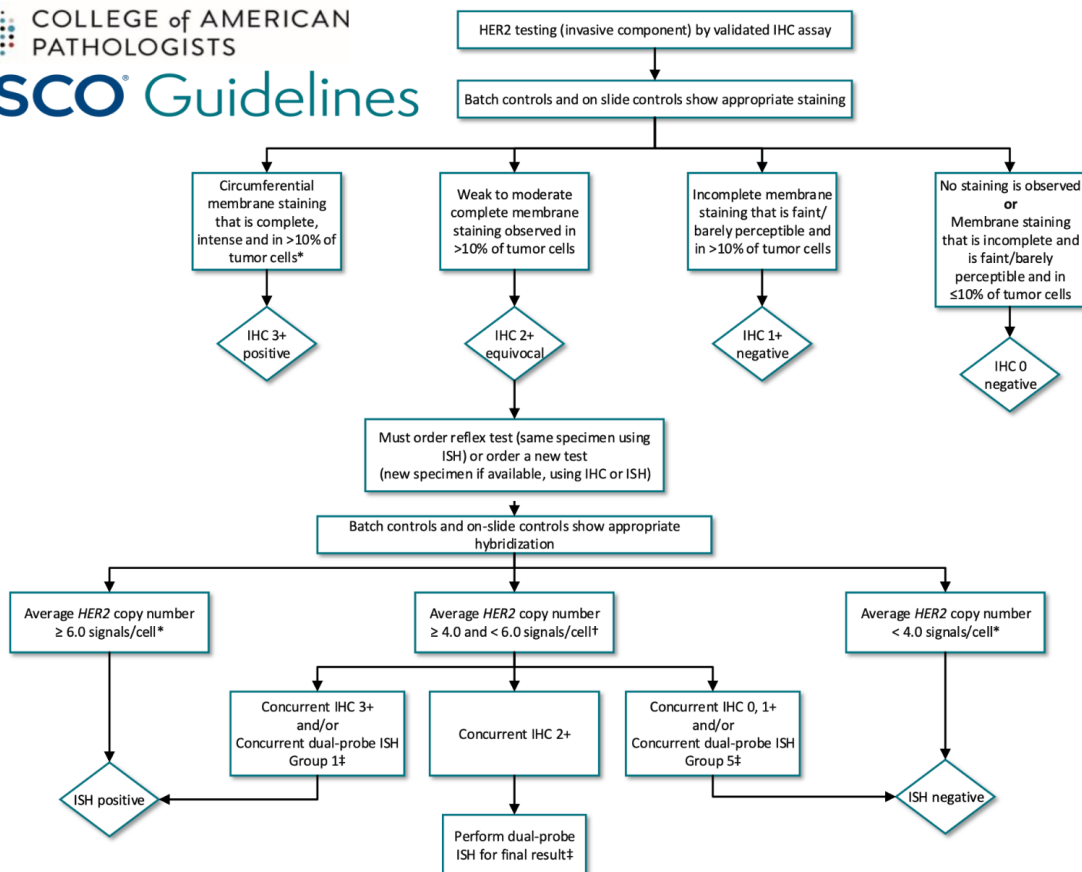


Figure 9. Évaluation d'HER2 dans le cancer du sein. D'après les recommandations de l'ASCO/CAP 2018 (disponibles sur www.asco.org/breast-cancer-guidelines)

Parallèlement aux techniques existantes, de nouvelles méthodes de quantification des niveaux de HER2 ou de normalisation des procédures sont à l'étude, notamment des tests quantitatifs pour mesurer l'expression d'HER2 en « single cell » (ARNm), la notation automatisée d'ISH, les signatures microARN dans le tissu tumoral primaire en tant qu'outil pronostique/prédictif et l'utilisation d'un système de spectrométrie de masse pour mesurer HER2 (116). De plus, des outils basés sur l'expression génique à des fins pronostiques et prédictives sont également en cours d'évaluation dans le cancer du sein HER2+, bien qu'aucun d'entre eux n'ait encore atteint une utilisation en

pratique clinique de routine (116). Enfin, des recherches récentes ont défini un phénotype « HER2 low » basé sur l'IHC (IHC 1+ ou 2+ et ISH négative), qui définit un groupe répondant au trastuzumab-deruxtecan (151).

1.2.3. Thérapies ciblées anti-HER2

Outre sa valeur pronostique, la surexpression d'HER2 permet également de prédire la réponse à plusieurs thérapies ciblées anti-HER2, notamment les anticorps monoclonaux (AcM) tels que le trastuzumab et le pertuzumab, les inhibiteurs de la tyrosine kinase (TKI) - lapatinib, tucatinib - ainsi que les conjugués anticorps-médicament (« antibody-drug conjugate », ADC) tels que l'ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) et le trastuzumab-deruxtecan.

1.2.3.1. *Anticorps monoclonaux*

1.2.3.1.1. *Trastuzumab*

Le trastuzumab a été le premier AcM humanisé développé pour HER2 et a obtenu un succès remarquable. Le trastuzumab se lie au domaine extracellulaire (ECD) de HER2, inhibe les voies de signalisation intracellulaires de HER2, inhibe l'arrêt du cycle cellulaire et exerce une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC : mécanisme immunitaire par lequel les cellules effectrices cytotoxiques porteuses de récepteurs Fc peuvent reconnaître et tuer les cellules cibles recouvertes d'anticorps qui expriment à leur surface des antigènes tumoraux ou dérivés de pathogènes) (152). Les données

précliniques démontrant une synergie entre les agents cytotoxiques et le trastuzumab ont ouvert la voie à des essais cliniques portant sur des combinaisons de chimiothérapie pour le traitement du cancer du sein métastatique surexprimant HER2, puis dans le cadre du traitement adjuvant (153, 154, 155, 156). Tous les essais initiaux ont montré que le trastuzumab et la chimiothérapie donnaient des résultats favorables, ce qui a conduit à des autorisations rapides dans le cadre du traitement métastatique et curatif (116). Grâce à ces succès, le trastuzumab s'est imposé comme le traitement de choix pour les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+.

1.2.3.1.1. Pertuzumab

Bien que le trastuzumab améliore les réponses et les résultats, un nombre important de patientes développent une résistance thérapeutique et une rechute (157). Par conséquent, un deuxième AcM anti-HER2 humanisé, le pertuzumab, a été mis au point puisqu'il pouvait avoir une action synergique avec le trastuzumab en ciblant un autre domaine d'HER2. Contrairement au trastuzumab, qui se lie à l'ECD IV de HER2, le pertuzumab se lie à l'ECD II, empêchant l'hétérodimérisation de HER2 avec HER1, HER3 et HER4, bloquant ainsi la signalisation tumorale en aval (158). Les mécanismes d'action complémentaires et l'effet des deux AcM sur l'activité antitumorale médiée par le système immunitaire via l'ADCC et/ou la cytotoxicité médiée par le complément (Complement-mediated cytotoxicity, CDC : mécanisme par lequel les cellules cibles recouvertes d'anticorps recrutent et activent les composants de la cascade du complément, conduisant à la formation d'un complexe d'attaque membranaire à la

surface de la cellule et à la lyse cellulaire qui s'ensuit) suggèrent un effet synergique des deux AcM (159).

Les essais associant ces deux AcM à la chimiothérapie dans le traitement du cancer du sein HER2+ au stade métastatique (160), en situation adjuvante (161) et néoadjuvante (162, 163) ont donné de meilleurs résultats que les associations trastuzumab et chimiothérapie.

1.2.3.1.1. Margetuximab

L'efficacité du trastuzumab dépend en partie de l'ADCC médiée par son domaine Fc. Un nouvel AcM IgG1 anti-HER2, le margetuximab, possède un domaine Fc modifié pour augmenter l'affinité pour le récepteur Fc γ activateur et pour diminuer l'affinité pour le récepteur Fc γ inhibiteur exprimé sur les cellules effectrices immunitaires (116). Le domaine Fc optimisé confère une activité ADCC accrue contre les tumeurs HER2+ et stimule plus intensément l'ADCC que le trastuzumab ou le pertuzumab in vitro (164). Sur la base des résultats de l'étude SOPHIA (165), le margetuximab en association avec la chimiothérapie a été autorisé aux Etats-Unis.

1.2.3.2. Anticorps conjugués

Les anticorps conjugués (antibody-drug conjugates, ADC) ont été conçus pour canaliser les effets cytotoxiques de la chimiothérapie vers des cellules tumorales spécifiques (116). Les CDA contiennent un anticorps ciblant la tumeur, lié de manière covalente à un médicament cytotoxique (« payload ») par l'intermédiaire d'un lien

synthétique (166). L'ADC est dirigé vers les cellules cancéreuses exprimant la cible (ici HER2) à la surface de la cellule, ce qui entraîne l'internalisation de l'ADC et la libération du cytotoxique, avec pour résultat la mort des cellules tumorales. Les liens synthétiques clivables des ADC permettent la libération du cytotoxique de la cellule cible vers l'espace extracellulaire, ce qui entraîne la destruction des cellules cancéreuses environnantes qui peuvent ne pas avoir une forte expression de la protéine cible. Cet effet accessoire renforce encore l'efficacité des ADC contre les cellules tumorales (167).

1.2.3.2.1. Trastuzumab-emtansine (TDM-1)

L'ado-trastuzumab emtansine (T-DM1), le premier ADC anti-HER2 mis au point, est composé de trastuzumab relié par un lien stable au DM1, un dérivé de la maytansine (116). Le T-DM1 provoque une rupture mitotique et une apoptose dans les lignées cellulaires surexprimant HER2, indépendamment de leur sensibilité au trastuzumab et au lapatinib (168). Le T-DM1 a montré une amélioration la survie globale et sans progression en situation métastatique dans des essais randomisés même en cas de résistance au trastuzumab (169). Bien que la tentative de remplacer le trastuzumab par le T-DM1 dans le cadre des traitements néoadjuvants à double blocage anti-HER2 n'ait pas été favorable, le T-DM1 réduit le risque de récurrence chez les patientes sans réponse histologique complète d'emblée après un traitement systémique néoadjuvant (170). Le T-DM1 a également démontré un intérêt dans un sous-groupe de patientes ayant des métastases cérébrales dans l'étude KAMILLA (171).

1.2.3.2.2. *Trastuzumab-deruxtecan*

Trastuzumab-deruxtecan (T-DXd) est un ADC anti-HER2 composé d'un anticorps anti-HER2 (ayant la même séquence en acides aminés que le trastuzumab), d'un térapeptide clivable (ou « linker ») et d'un inhibiteur de la topoisomérase I cytotoxique (deruxtecan, DXd) (172, 173). Le lien synthétique du DXd est sélectivement clivé par les cathepsines, qui sont surexprimées dans les tumeurs, ce qui libère le DXd de préférence à l'intérieur des cellules cancéreuses (116). Cette caractéristique, associée à la courte demi-vie du DXd in vivo, limite l'exposition systémique de l'agent cytotoxique, dans le but de réduire la toxicité (116). La grande perméabilité membranaire du DXd permet d'obtenir des effets secondaires locaux, conduisant à la mort des cellules tumorales dans le microenvironnement tumoral (172).

T-DXd en monothérapie a démontré une activité antitumorale impressionnante en situation métastatique réfractaire et une amélioration sans précédent de la survie sans progression par rapport au T-DM1 en deuxième ligne (173, 174, 175). T-DXd a également montré une activité encourageante dans les métastases cérébrales dans l'essai DESTINY-Breast01 (176).

Une caractéristique unique de T-DXd est sa capacité à cibler le cancer du sein métastatique HER2-low, comme l'a montré l'activité dans ce sous-groupe de patients lors d'un essai de phase I (175). Cette efficacité remarquable semble multifactorielle et repose sur les caractéristiques améliorées du T-DXd par rapport au T-DM1, la capacité à administrer une dose plus élevée et l'effet de diffusion dans le micro-environnement

tumoral qui s'attaque à l'hétérogénéité intratumorale de HER2 (116). T-DXd a démontré des améliorations statistiquement et cliniquement significatives de la survie globale et sans progression dans l'essai de phase III DESTINY-Breast04 dans le cancer du sein métastatique HER2-low (177). Ces résultats sont susceptibles de redéfinir la nomenclature autour de l'expression de HER2 et de ce qui est considéré comme actionnable en termes d'expression de HER2 (116).

Les résultats récents de l'étude DAISY ont montré que l'activité antitumorale de T-DXd était associée au niveau d'expression de HER2 dans le MBC HER2+89. Il est intéressant de noter qu'un pourcentage élevé de cellules HER2 IHC 0 dans la tumeur et leur distribution spatiale par rapport aux cellules surexprimant HER2 étaient associés à une réponse moindre à T-DXd. Cela souligne la nécessité de développer des méthodes plus sensibles pour la détection de l'expression de HER2 et de nouvelles technologies pour évaluer l'expression hétérogène de HER2 au sein de la tumeur.

1.2.3.3. Inhibiteurs de tyrosine kinase

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) sont de petites molécules qui ciblent le domaine kinase catalytique intracellulaire de HER2, entrant en compétition avec l'ATP, bloquant la phosphorylation nécessaire à l'activation des cascades de signalisation en aval (116).

1.2.3.3.1. Lapatinib

Le lapatinib, un dérivé de la 4-anilinoquinazoline, est un inhibiteur réversible de l'EGFR (également connu sous le nom de HER1) et de HER2, avec une activité dans les tumeurs HER2-positives qui sont insensibles au trastuzumab (178). Le lapatinib surmonte la résistance au trastuzumab médiée par l'augmentation du insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) en bloquant la communication entre HER2 et IGF1R (179), et ceci indépendamment de l'extracelluar domain (ECD) d'HER2. Les lignées cellulaires et les xénogreffes exprimant la variante p95HER2 dépourvue de l'ECD liant le trastuzumab étaient sensibles au lapatinib, probablement parce qu'il cible le domaine kinase intracellulaire de HER2 (180). Les données précliniques ont étayé le développement clinique du lapatinib dans le cancer du sein HER2-positif résistant au trastuzumab (181). Le lapatinib en association avec la capécitabine (un antimétabolite) était supérieur à la capécitabine seule dans les cancers du sein avancés HER2+ traités au trastuzumab (182), et le doublet lapatinib-letrozole (inhibiteur de l'aromatase) était plus efficace que le létrozole seul pour les tumeurs métastatiques hormonosensibles HER2-positives (183), ce qui a conduit à l'approbation réglementaire de ces associations.

Le lapatinib a également un rôle important dans le traitement des métastases cérébrales du cancer du sein HER2-positif. En effet, jusqu'à 50% des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2-positif développent des métastases du système nerveux central (SNC) (184). D'un point de vue pharmacologique, la barrière hémato-tumorale (BHT), qui évolue à partir de la barrière hémato-encéphalique (BHE), régule la distribution des médicaments dans les métastases cérébrales, ce qui pose un défi en

pratique clinique (185). Il a été suggéré que la grande taille des anticorps HER2 (par exemple, le trastuzumab) empêche la pénétration de la BHE et l'efficacité dans le SNC. Le lapatinib, en raison de sa petite taille et de sa puissante activité anti-HER2, a présenté un moyen de contourner cet écueil. Le lapatinib, en monothérapie et en association, a permis de réduire les taux de progression au niveau du SNC dans les cas de cancer du sein HER2-positif, y compris chez les patients présentant des métastases cérébrales non traitées auparavant (181). Ces données ont incité à perfectionner les inhibiteurs de la tyrosine kinase de nouvelle génération pour s'attaquer au problème croissant des métastases cérébrales associées au cancer du sein HER2+ (116).

1.2.3.3.2. Neraparib

Contrairement au lapatinib, le nératinib (HKI-272) est un TKI pan-HER irréversible qui cible l'EGFR, l'HER2 et l'HER4 (186). Le nératinib inhibe la croissance des lignées cellulaires résistantes au trastuzumab et est synergique avec le trastuzumab (187). Son mécanisme d'action permet d'obtenir une réponse également en cas de survenue de mutations somatiques d'HER2, qui peuvent être responsables d'une mauvaise réponse aux anticorps monoclonaux et au lapatinib notamment en situation métastatique (187, 188).

De même que le lapatinib, l'association nératinib-capécitabine a amélioré les résultats dans les cancers du sein métastatiques HER2+ (189), mais étant donné le développement rapide de nouvelles thérapies ciblant HER2, y compris de nouveaux TKI moins toxiques et plus efficaces, le rôle de l'association nératinib-capécitabine

semble limité (116, 181).

1.2.3.3.1. Pyrotinib

Le pyrotinib, un autre TKI pan-HER et irréversible qui cible l'EGFR, l'HER2 et l'HER4, a été approuvé en Chine en association avec la capécitabine dans le cancer du sein métastatique HER2+ traité avec du trastuzumab et un taxane (190). Pour l'instant plusieurs essais sont en cours et on ne sait pas si son utilisation s'étendra dans d'autres pays (116).

1.2.3.3.1. Tucatinib

Le tucatinib est un puissant inhibiteur de la tyrosine kinase spécifique de HER2, administré par voie orale, dont l'activité sur HER2 est > 1000 fois supérieure à celle sur EGFR (191). Le tucatinib a démontré une pénétration du SNC dans des modèles de xénogreffes intracrâniennes et s'est avéré supérieur au lapatinib dans des études précliniques (192). L'essai contrôlé randomisé HER2CLIMB a démontré la supériorité de l'association tucatinib + capécitabine-trastuzumab en termes de survie sans progression et de survie globale dans le cancer du sein HER2+ métastatique précédemment traité par des thérapies anti-HER (193). HER2CLIMB est le premier essai randomisé à démontrer des bénéfices cliniquement significatifs chez des patients atteints de métastases cérébrales HER2+ (193). Le tucatinib a été approuvé pour le traitement du cancer du sein HER2+, y compris chez les patients présentant des métastases au niveau du système nerveux central. Les essais en cours sur le tucatinib

évaluent ce traitement en tant que première ligne métastatique, en adjuvant (en cas d'absence de réponse histologique complète après traitement néoadjuvant) et en néoadjuvant (116).

1.2.4. Résistances aux thérapies ciblées

La résistance aux thérapies anti-HER2 peut se produire par de multiples mécanismes, dont certains semblent être partagés par différents traitements (116) :

Des altérations de la famille HER : soit par des mutations dans HER2 (194) conduisant à l'activation des voies PI3K-AKT et RAS-MAPK, soit par des mutations concomitantes de HER2 et HER3 (195) conduisant à l'activation de la voie PI3K-AKT. Ces résistances peuvent être outrepassées par le neratinib en cas de mutation d'HER2 ou par les inhibiteurs de PI3K α (alpelisib) en cas de mutation d'HER3.

La perte ou le masquage de l'épitope HER2 : par la perte du domaine extracellulaire d'HER2 dans les cellules surexprimant le récepteur p95^{HER2} (une version « tronquée » uniquement sous-membranaire d'HER2) (196); le masquage du site de liaison du trastuzumab sur HER2 en raison de la surexpression de la mucine 4 (MUC4) (notamment en cas de tumeur RH⁺/HER2⁺) et du complexe hyaluronane polymérique-CD44 (197). Ces résistances peuvent être contournées par l'utilisation de TKI ou par l'utilisation d'inhibiteurs de TNF (qui pourront réguler la production de MUC4 et démasquer les épitopes d'HER2).

L'activation des voies compensatrices : les mutations de PIK3CA entraînent l'activation de la voie PI3K-AKT (198), où les inhibiteurs spécifiques de PI3K sont en

cours d'étude (les inhibiteurs de mTOR ont été évalués mais étaient responsables d'une toxicité trop importante en association) ; en cas de surexpression du gène de la cycline D1 (199), où les inhibiteurs de CDK4/6 sont en cours d'étude ; et les mutations de MEK-ERK (200), qui seraient accessibles à une inhibition directe dans le futur

L'hétérogénéité d'HER2 : l'expression hétérogène d'HER2 entraîne une diminution de la sensibilité aux thérapies ciblées anti-HER2 (201). Dans ce contexte, les ADC (notamment le T-DXd) pourraient permettre de surmonter cette résistance.

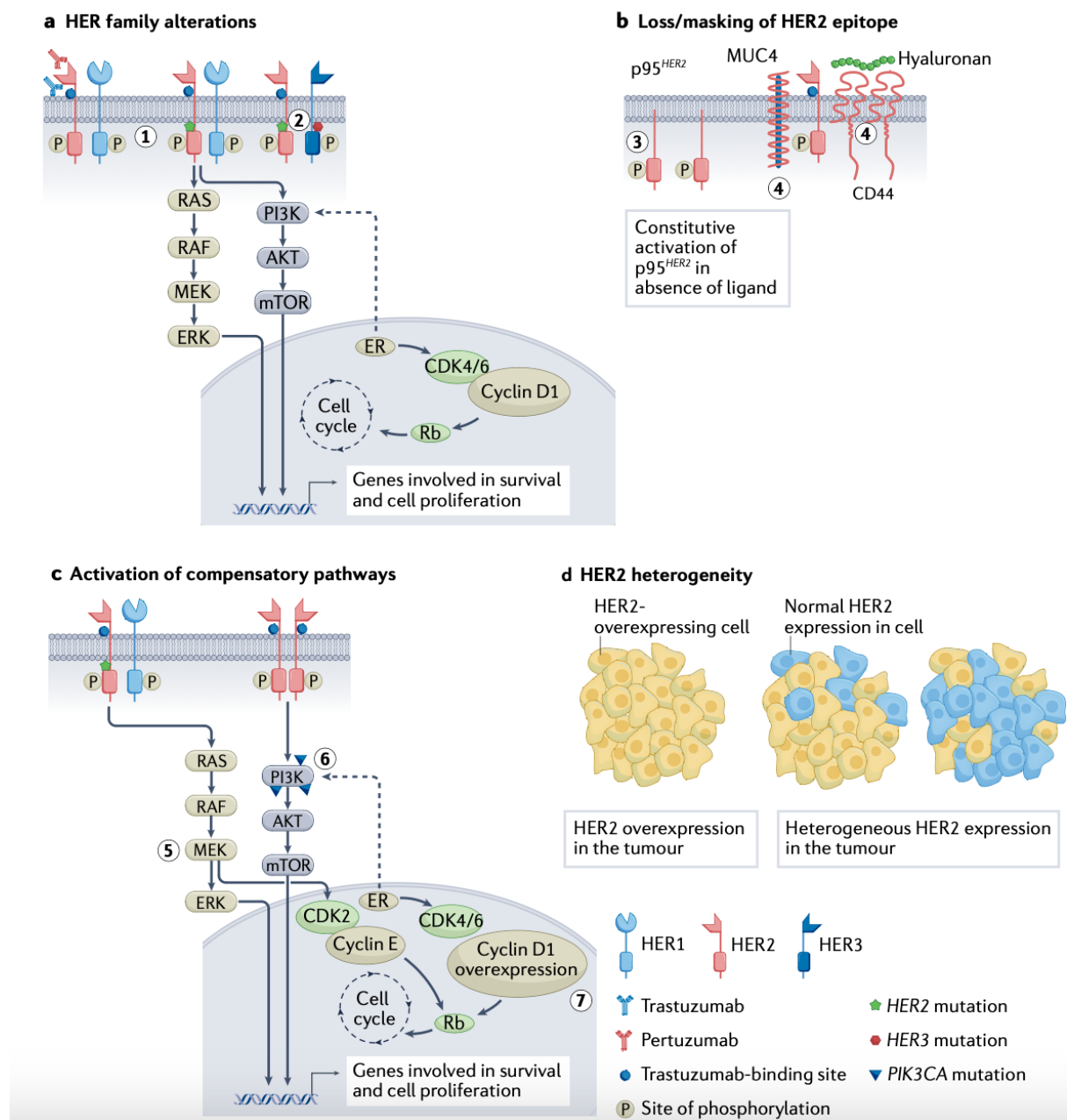


Figure 10. Mécanismes de résistance aux traitements anti-HER2. Image reproduite d'après Swain et al. (2023) (116)

D'autres mécanismes de résistance sont actuellement en cours d'investigation, notamment l'effet immunosuppresseur du micro-environnement tumoral, l'implication de certains macrophages spécifiques et d'autres cibles telles que RAC1, CDK12 and VTCN1 (116).

1.2.5. Les thérapies anti-HER2 de nouvelle génération

L'évolution constante du cancer et sa capacité à échapper aux thérapies existantes ont souligné la nécessité de poursuivre le développement de thérapies. Des anticorps ciblant d'autres domaines HER2 ou d'autres membres de la famille HER ont été étudiés dans le but de bloquer plus complètement HER2 et d'atténuer les effets sur les voies de signalisation en aval. De nouveaux ADC contenant des cytotoxiques différents pour éviter la résistance croisée aux thérapies existantes ou de nouveaux liens synthétiques pour compenser la toxicité hors cible sont également activement recherchés.

Le fait que la dimérisation HER2-HER3 soit importante pour la signalisation induite par HER2, ainsi les résultats positifs des essais sur le pertuzumab ont étayé une stratégie visant HER3, qui joue un rôle crucial dans la tumorigenèse médiée par HER2. Plusieurs anticorps ciblant HER3 ont été évalués au cours de la dernière décennie, ciblant principalement l'ECD de HER3 (par exemple, le seribantumab et le patritumab) et certains avec des modifications pour améliorer l'ADCC (par exemple, le lumretuzumab) ou pour piéger HER3 dans une conformation inactive (elgentumab) (116). Bien que ces médicaments aient montré une activité préliminaire prometteuse, aujourd'hui l'accent est mis sur les nouveaux ADC qui ciblent HER2 ou HER3. En outre, des anticorps bispécifiques qui ciblent plusieurs épitopes de HER2, ou HER2 et HER3 réunis en une seule molécule sont en cours d'investigation.

Compte tenu du succès du T-DM1 et du T-DXd, plus d'une douzaine d'ADC ciblant HER2 sont actuellement en cours de développement clinique, dans le but d'améliorer l'index thérapeutique et l'efficacité : le trastuzumab duocarmycine (anti-

HER2 + duocarmycine, un alkylant) ; l'ARX788 (anti-HER2 + dolastatine, ayant un lien synthétique stable permettant une toxicité moindre) ; le disitamab vedotin (hertuzumab + monométhyl auristatin E, ne présentant pas de résistance lysosomale) ; le zanidatamab zovodotin (ADC bispécifique anti-HER2 sur les domaines ECD II et IV) ; l'ALTA-ADC (pertuzumab + cytotoxique avec dissociation endosomale) ; ADC au thorium-227 (libération de radionucléotides à rayonnement α) (116). Ces ADC diffèrent par leur cytotoxique, leur ratio cytotoxique/anticorps, leur lien synthétique ou l'épitope HER2 ciblé (116).

Le ciblage du domaine kinase intracellulaire de HER2 à l'aide d'inhibiteurs à petites molécules continue d'être étudié avec les inhibiteurs de tyrosine kinase de nouvelle génération, tels que le DZD1516 ou le BDTX-189 (116). Cette classe de composés est intéressante en raison de leur capacité unique à traverser la BHE et la BTB, bien que certains composés posent un défi en raison des effets secondaires (116).

Enfin, les progrès de la biologie et de l'ingénierie des anticorps ont conduit au développement d'anticorps bispécifiques qui contiennent deux sites de liaison dirigés contre deux antigènes distincts ou, inversement, qui peuvent cibler deux épitopes distincts sur le même antigène. Ce format permet une grande diversité, car les bispécifiques peuvent également cibler un antigène avec un seul site de liaison, l'autre site pouvant être une cible immunitaire susceptible de provoquer un effet synergique : CD3, CD16, PDL1, CD137, TLR7/8, cellules NK, etc. (116).

Par ailleurs, d'autres modes d'actions tel que la dégradation ciblée de protéine par les proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) ou les antibody neodegrader

conjugate (AnDC), les combinaisons avec les inhibiteurs de checkpoint immunitaire, les immunotoxines, les thérapies cellulaires (Chimeric antigen receptors (CARs)-macrophages ou CAR-NK) et les vaccins sont également à l'étude (116).

1.3. Le traitement systémique néoadjuvant (TSN)

1.3.1. Schémas du TSN pour les cancers HER2+

Le traitement néoadjuvant standard pour les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2-positif consiste en une chimiothérapie et un traitement ciblé anti-HER2, en particulier le trastuzumab, avec ou sans pertuzumab. Très peu d'études randomisées de grande envergure ont comparé différents schémas de chimiothérapie, en particulier en ce qui concerne leur impact sur survie. Par conséquent, un certain nombre de schémas de chimiothérapie peuvent être considérés comme appropriés et dépendent des pratiques et des comorbidités des patientes. En plus des protocoles de chimiothérapie, un traitement anti-HER2 est incorporé à la chimiothérapie néoadjuvante. Le trastuzumab est indiqué car il permet d'améliorer le taux de réponse pathologique complète (pCR) ainsi que la survie (spécifique et globale) par plusieurs études randomisées et méta-analyses (202, 203, 204). En plus de la chimiothérapie et du trastuzumab, un deuxième anticorps monoclonal anti-HER2 peut être également administré : le pertuzumab. Certains essais contrôlés randomisés ont été publiés (Neosphere et TRYAPHENA notamment (162, 205)) et certaines équipes administrent le double blocage anti-HER2 en néoadjuvant pour les tumeurs localement avancées ; toutefois, en France le pertuzumab n'as pas d'indications en néoadjuvant actuellement. Ci-dessous sont décrits les principaux protocoles du TSN dans le cancer du sein HER2-positif :

- TCH(P) : Docetaxel et carboplatine toutes les trois semaines pendant six cycles avec trastuzumab concomitant, avec ou sans pertuzumab.

- wPCbH(P) : (weekly, hebdomadaire) Paclitaxel hebdomadaire avec carboplatine, administré soit toutes les trois semaines, soit toutes les semaines, avec trastuzumab concomitant, avec ou sans pertuzumab, pendant 18 semaines.
- AC-TH(P) - Doxorubicine et cyclophosphamide (AC) toutes les deux ou trois semaines pendant quatre cycles, suivis de paclitaxel, toutes les semaines pendant 12 semaines (wP), ou de docétaxel toutes les trois semaines pendant quatre cycles. Le trastuzumab, hebdomadaire pendant 12 semaines ou toutes les trois semaines pendant quatre cycles, est commencé en même temps que le taxane. Si du pertuzumab est ajouté, il doit également être commencé avec l'initiation du taxane et administré toutes les trois semaines pendant quatre cycles.
- TH(P)-AC - Les mêmes traitements discutés ci-dessus administrés dans l'ordre inverse, ce qui peut entraîner moins de cardiotoxicité. Notez que le trastuzumab (et le pertuzumab, s'il est ajouté) est généralement maintenu pendant la partie AC de ce traitement.
- FEC/EC-TH(P) ou TH(P)-FEC/EC - Fluorouracil, épirubicine et cyclophosphamide (FEC) toutes les trois semaines pendant trois à quatre cycles ou épirubicine et cyclophosphamide (EC) toutes les trois semaines pendant quatre cycles. Comme pour l'AC-TH(P), le trastuzumab avec ou sans pertuzumab est administré en même temps que le taxane uniquement.

Pour les patientes atteintes d'un cancer HER2-positif à faible risque, tel que le stade clinique I (T1N0), chez qui un traitement néoadjuvant est jugé justifié en raison

de la taille de la tumeur (par rapport au sein de la patiente), de sa localisation ou de la nécessité de retarder la chirurgie, le paclitaxel hebdomadaire associé au trastuzumab (avec ou sans pertuzumab) pendant 12 semaines peut être utilisé, en raison de son efficacité et de sa tolérabilité dans le cadre du traitement adjuvant (206).

1.3.2. Indications du TSN pour les cancers HER2+

Le traitement systémique néoadjuvant (TSN) est indiqué pour de nombreuses patientes atteintes d'un cancer du sein localement avancé (défini comme un stade IIB-III), quel qu'en soit le sous-type moléculaire, car la réponse au traitement peut permettre à la fois une chirurgie moins lourde et de meilleurs résultats chirurgicaux. En cas de cancer HER2-positif à un stade plus précoce (stade clinique I ou II), les patientes peuvent également être candidates à un TSN si un ou plusieurs des critères suivants s'appliquent :

- La réduction de la taille tumorale permettrait un traitement chirurgical conservateur susceptible d'avoir un résultat meilleur.
- La chirurgie doit être reportée dans l'attente d'une consultation avec la chirurgie plastique concernant la reconstruction mammaire, les résultats d'un test génétique ou la résolution d'une maladie intercurrente, ou d'une grossesse, et permettant ainsi de ne pas retarder l'initiation du traitement.
- Un traitement postopératoire par ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) serait envisagé si la patiente présentait une maladie invasive résiduelle dans le sein ou les ganglions axillaires

Ces considérations sont particulièrement adaptées aux patientes atteintes d'un cancer du sein HER2-positif, étant donné les taux élevés de pCR observés avec le TSN.

Pour certaines équipes (notamment aux États-Unis), le TSN peut être discuté si la patiente présente une atteinte limitée des ganglions axillaires selon l'évaluation clinique (cN1), pour laquelle le curage ganglionnaire axillaire constituerait la prise en charge chirurgicale standard, mais pourrait être candidate à une lymphadénectomie sélective sentinelle seule si elle est « convertie » en statut ganglionnaire cliniquement négatif (ycN0). Toutefois, cette prise en charge n'est pas validée en dehors d'essais clinique actuellement, puisque les données sur sa sécurité sont insuffisantes.

1.3.3. Réponse au TSN

1.3.3.1. *Quantification et mesure*

La mesure de la réponse au traitement systémique néoadjuvant est réalisée au cours de ce traitement de manière clinique et par imagerie, puis en post-opératoire en histologie. Au cours du traitement néoadjuvant, on réalise des examens cliniques réguliers pour évaluer l'efficacité du traitement en mesurant la taille de la tumeur, les signes d'évolutivité locale (atteinte cutanée, mastite carcinomateuse) et l'atteinte ganglionnaire. Ce bilan clinique est complété par une évaluation radiologique qui comporte mammographies, échographie et IRM mammaire. L'intérêt de cette évaluation est de modifier le protocole médicamenteux en cas de mauvaise réponse ou de progression en cours de traitement, ainsi que d'avancer la date de la chirurgie si nécessaire.

La réponse histologique est analysée sur la pièce tumorale mammaire et ganglionnaire en anatomopathologie. La réponse histologique complète (pathological complete response, ou pCR) est définie par une absence totale de cellules carcinomateuses infiltrantes sur les tissus analysés. La présence de lésions *in situ* résiduelles est considérée comme une réponse histologique complète puisque les lésions *in situ* ne sont pas sensibles à la chimiothérapie. On parle donc de pCR pour les stades ypT0N0 ou ypTisN0. Dans les essais cliniques, la quantification de la pCR peut être réalisée de deux manières : soit de manière binaire (oui/non, avec un calcul du taux de patients en pCR), soit de manière continue avec des échelles (Chevallier, Sataloff, Residual Cancer Burden).

La classification de Chevallier est plus ancienne et comprend 4 classes (la 1 et 2 étant considérées comme pCR) :

- Classe 1 : rémission complète : disparition tumorale complète macroscopique et microscopique dans le sein et l'aisselle
- Classe 2 : carcinome *in situ*, pas d'atteinte ganglionnaire
- Classe 3 : carcinome invasif avec altération stromale
- Classe 4 : rares altérations ou absence d'altération des cellules tumorales.

La classification de Sataloff fait la différence entre la réponse au niveau de la tumeur primaire (T) et des ganglions axillaires (N). Les patientes TA-NA ou TA-NB sont considérées en pCR. Au niveau de la tumeur primaire il existe 4 catégories :

- TA : effet thérapeutique total ou presque total

- TB : effet thérapeutique de plus de 50 % mais pas total
- TC : moins de 50 % d'effet thérapeutique
- TD : pas d'effet thérapeutique.

Au niveau des ganglions axillaires il existe également 4 catégories :

- NA : évidence d'un effet thérapeutique, pas de maladie résiduelle
- NB : pas de métastase ou d'effet thérapeutique
- NC : évidence d'un effet thérapeutique mais métastase axillaire toujours présente
- ND : métastase axillaire toujours présente et viable et pas d'effet thérapeutique.

En 2007, une classification nommée « Residual Cancer Burden » (RCB) du MD Anderson a été publiée et elle permet d'évaluer le pronostic de manière plus précise selon le taux de réponse histologique (207). On évalue la réponse au niveau de la tumeur primaire en calculant l'aire de la tumeur, la cellularité et le pourcentage de lésions in situ ; puis au niveau axillaire par le nombre de ganglions positifs et le diamètre de la plus grande métastase. Ensuite, une application web existe pour calculer le score RCB de manière continue (www3.mdanderson.org) allant de 0 à 5. A partir de ce score, le RCB est catégorisé en 4 classes :

- RCB 0 = pCR
- RCB I = quasi-pCR
- RCB II
- RCB III = pas de réponse

1.3.3.2. Les taux de réponse histologique complète

Les taux de réponse histologique complète varient selon le sous-type moléculaire, le type de traitement néoadjuvant, ainsi que des paramètres clinico-pathologiques tels que le haut grade, l'expression du Ki67, l'invasion lympho-vasculaire et la taille tumorale (208, 209, 210, 211, 212). En 2014, Cortazar *et al.* ont publié une méta-analyse qui regroupait 12 essais cliniques représentant 11955 patientes (202). Les auteurs ont retrouvé que les taux de pCR les plus élevés étaient dans le groupe HER2+/RH- ayant bénéficié d'un traitement antiHER2 (cf. Figure 11). En 2022, Yau *et al.* ont publié une analyse groupée de plusieurs études incluant 6385 femmes ayant eu une chimiothérapie néoadjuvante, et ont étudié la pCR selon le score RCB (213). Le taux de RCB 0 (pCR) global était de 32,5%, allant de 11,1% pour les tumeurs HER2-/RH+ à 68,9% pour les tumeurs HER2+/RH- ayant eu un traitement avec antiHER2 (213).

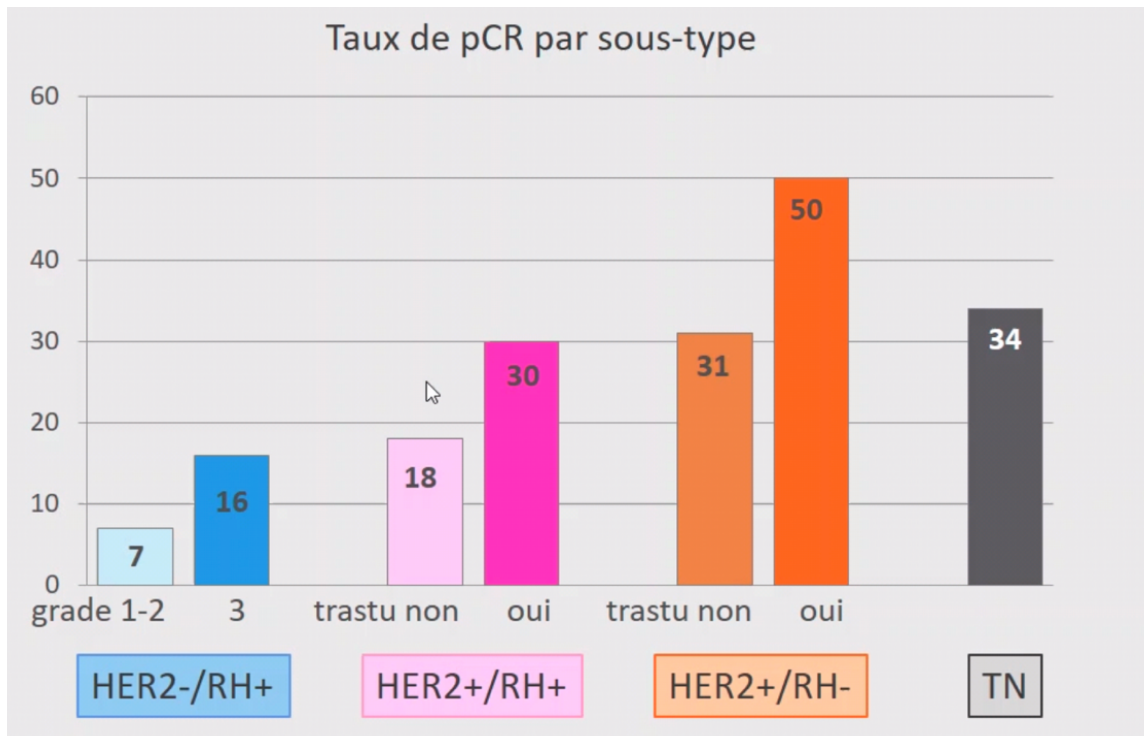


Figure 11. Taux de réponse histologique complète selon le sous-type moléculaire et selon le traitement, d'après Cortazar *et al.* (202).

1.3.3.3. Pronostic : valeur la réponse histologique complète

Les premières données sur la valeur pronostique de la réponse histologique complète (pCR) après chimiothérapie néoadjuvante ont été publiées en 1997 dans l'essai clinique NSABP-B18 (214). Cet essai a inclus 759 femmes ayant un cancer du sein et ayant été randomisées en deux groupes : chimiothérapie néoadjuvante versus adjuvante (4 cycles de doxorubicine + cyclophosphamide). Les auteurs avaient trouvé que 44% des patientes avaient obtenu une pCR. Dans la mise à jour du suivi en 2008 on retrouvait que dans le groupe pCR la survie était nettement meilleure que dans le groupe absence de pCR, avec un hazard ratio à 0,32 ($p < 0,0001$) (86). Ces données ont été confirmées par une méta-analyse publiée en 2014 qui regroupait 12 essais cliniques représentant 11955 patientes (202) : la survie sans récurrence (HR 0,48 ; $p <$

0,001) et la survie globale (HR 0,36 ; $p < 0,001$) étaient meilleures en cas de pCR.

1.3.3.4. Prédiction : méthodes actuellement disponibles

Plusieurs équipes se sont intéressées à la prédiction de la réponse histologique complète après traitement systémique néoadjuvant dans le cancer du sein. La principale approche est basée sur l'imagerie, notamment avec l'IRM multiparamétrique (avec contraste dynamique, à pondération de diffusion) et l'échographie mammaire (215, 216, 217) au niveau de la tumeur primitive ainsi que de l'atteinte ganglionnaire (218). L'analyse des données d'imagerie et le développement de modèles prédictifs se basent sur des technologies issues de l'intelligence artificielle. En effet, l'intelligence artificielle en radiologie (ou radiomiques) est une discipline récente permettant l'extraction à haut débit de données d'imagerie médicale numérique afin d'obtenir des informations prédictives et/ou pronostiques (217) sur les patients et leurs pathologies en décrivant l'hétérogénéité tumorale et indirectement les caractéristiques moléculaires et génétiques de la tumeur. Cette approche pourrait permettre de prédire le diagnostic, la réponse au traitement et le pronostic. Ce domaine de recherche récent se développe de plus en plus en oncologie car ses applications sont vastes et prometteuses, en particulier pour la prise de décision clinique et le traitement personnalisé (219). Il existe une forte corrélation entre les données radiomiques et les résultats cliniques. Dans le cas particulier du cancer du sein HER2-positif, il existe également des modèles intéressants de radiomique permettant de prédire la réponse au traitement systémique néoadjuvant (218, 220).

De même, d'autres approches basées sur les caractéristiques biologiques des tumeurs ont été évaluées. Une étude a étudié la valeur prédictive de 4 signatures moléculaires (Oncotype DX, Endopredict, OncoMasTR et le taux de lymphocytes intra-tumoraux) sur 813 patientes ayant un cancer du sein HER2-négatif et hormono-sensible (221). Les auteurs ont montré que les 4 signatures permettaient de prédire la pCR, avec des performances variables.

Une autre équipe a étudié les caractéristiques biologiques prédictives de la pCR dans 159 patientes ayant un cancer du sein HER2-positif et a mis en évidence que le ratio HER2/CEP17, le taux de lymphocytes CD8 et le grade histologique étaient significativement associés à la pCR, et leur modèle prédictif avait des performances correctes (aires sous la courbe de 0.773 et 0.744 pour les validations internes et externes, respectivement) (222).

Les lymphocytes infiltrant la tumeur (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL) ont également donné des résultats intéressants. Une étude a montré qu'une proportion élevée de TIL (> 50 %) dans les biopsies initiales était associée à des taux plus élevés de pCR (odds ratio de 6,49 ; $p < 0,001$) dans le cancer du sein HER2-positif traité par taxanes-cyclophosphamide-trastuzumab-pertuzumab (223). Une autre étude a montré que les TIL étaient associées à des taux de pCR plus élevés dans une grande cohorte (224). De même, une analyse secondaire de l'essai NeoALTTO (Neoadjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization) a également mis en évidence l'association entre les TIL et la pCR (225).

En conclusion, la prédiction de la pCR est donc un élément important de la prise

en charge personnalisée du cancer du sein HER2-positif. Actuellement, les méthodes basées sur les données d'imagerie ont pris plus d'ampleur dans ce but. Toutefois, les données publiées montrent que certaines caractéristiques biologiques peuvent également être utilisées. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que STARD3 pourrait intervenir dans la prédiction de la pCR.

1.4. STARD3

1.4.1. Historique

Au cours des années 1990, le laboratoire a effectué un criblage différentiel sur des biopsies chirurgicales de ganglions lymphatiques axillaires métastasés par un cancer du sein afin de déterminer les gènes dont l'expression était liée à la progression tumorale. Cette technique a permis d'isoler 10 gènes surexprimés dans les métastases ganglionnaires par rapport à des tumeurs bénignes (226). Chacun d'eux a été nommé MLN (Metastatic Lymph Node) suivi du numéro de clone. Le gène MLN64 a été identifié parmi ces gènes. MLN64 est devenu StAR-related lipid transfer Domain protein 3 (STARD3) en raison de son homologie de séquence avec la protéine STARD1/StAR (227).

Ensuite, des souris Knock-out (KO) pour le gène STARD3 ont été générées à l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch) par recombinaison homologue. L'étude du phénotype de ces souris a montré qu'elles étaient viables et fertiles, et elles étaient plus grandes et en surpoids. Sur le plan métabolique, elles présentaient une hyperglycémie, une hypertriglycémie et une hypercholestérolémie. Ces observations ont suggéré que STARD3 avait un impact sur le métabolisme général (228).

1.4.2. Gène STARD3

Chez l'humain, le gène *STARD3* est localisé au niveau du bras long du chromosome 17, au niveau du locus 17q12 (226, 229). Sa taille est 39.66 megabases

(Mb). Chez la souris, ce gène est situé au niveau du chromosome 11. La Figure 12 décrit l'expression de l'ARN de *STARD3* dans les différents tissus chez l'humain (d'après The Human Protein Atlas). Ce gène est exprimé dans la quasi-totalité des tissus, et présente l'expression la plus importante au niveau des glandes surrénales, la rate et les noyaux gris centraux (système nerveux central).

STARD3 est localisé dans la plus petite région d'amplification de HER2 (appelée amplicon HER2) (143) qui contient plusieurs gènes co-exprimés et co-amplifiés avec HER2 (230).

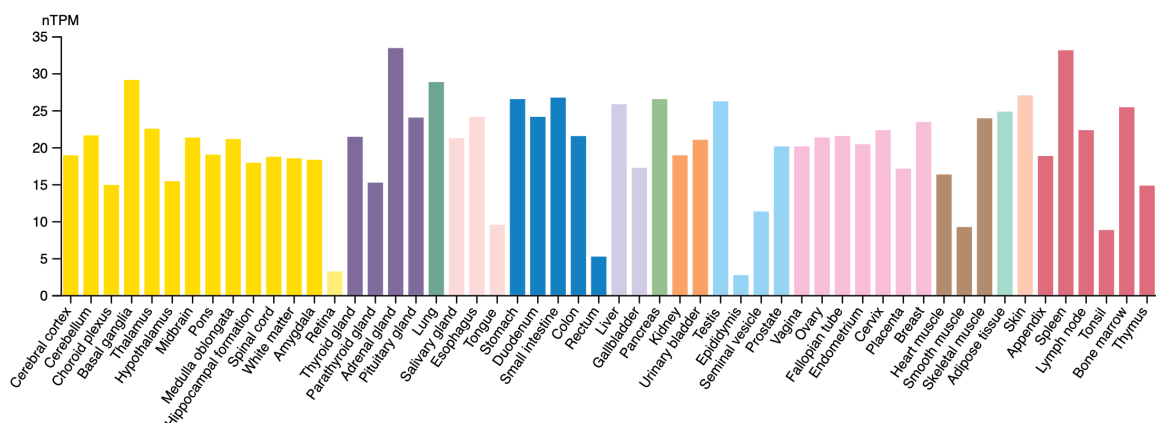


Figure 12. Expression de l'ARN de *STARD3* selon le tissu chez l'humain. D'après The Human Protein Atlas (accessible sur www.proteinatlas.org)

Données consensuelles créées en combinant les données transcriptomiques HPA et GTEx pour 55 types de tissus. nTPM = normalized transcripts per million.

1.4.3. La protéine STARD3

STARD3 code pour une protéine homonyme impliquée dans le transfert de cholestérol (231, 232). *STARD3* est une protéine de liaison aux stérols, localisée au niveau des endosomes tardifs, et qui assure le transport du cholestérol du réticulum

endoplasmique vers les endosomes (231, 233). Elle est conservée à travers l'évolution et est présente chez les animaux ainsi que chez les organismes unicellulaires liés aux animaux. Elle est exprimée de manière ubiquitaire à un faible niveau dans la plupart des tissus.

1.4.3.1. Structure et localisation

STARD3 est une protéine de 50 kDa contenant 445 acides aminés qui comprend un domaine START, un domaine MENTAL et un motif FFAT (Figure 13). Le domaine START permet l'échange de cholestérol et le domaine MENTAL ancre la protéine dans la membrane des endosomes tardifs (ET) grâce à quatre hélices transmembranaires. STARD3 possède également un motif FFAT (two phenylalanines in an acidic tract) sur son domaine MENTAL, qui lui permet d'interagir avec le domaine MSP des protéines VAP et MOSPD2, formant ainsi un site de contact membranaire entre les endosomes tardifs et le réticulum endoplasmique.

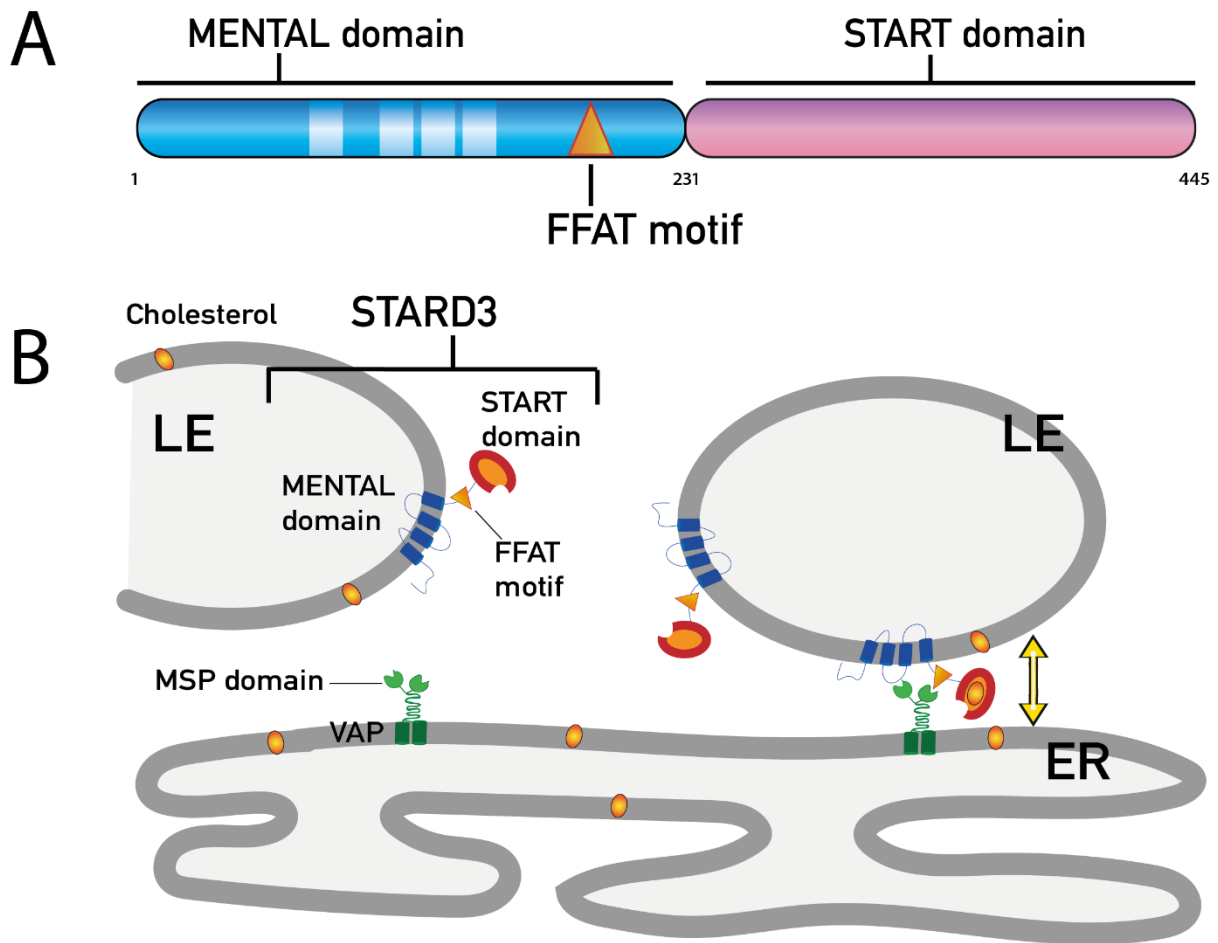


Figure 13. STARD3, un transporteur du cholestérol dans les sites de contact membranaires entre le reticulum endoplasmique et les endosomes tardifs

Représentation schématique du mode d'action de STARD3 dans le transport du cholestérol. STARD3, qui est composée d'un domaine START de transfert de lipides et d'un domaine MENTAL transmembranaire, interagit avec les protéines VAP pour former des sites de contact membranaires RE-endosome. Dans ces contacts, le domaine START transfère le cholestérol du RE à l'endosome.

LE = late endosome

ER = endoplasmic reticulum

VAP = (vesicle-associated membrane protein)-associated-protein MSP = Major Sperm Protein

MENTAL domain = MLN64 NH₂-terminal domain

START domain = StAR-related lipid-transfer domain

FFAT motif = two phenylalanines (FF) in an Acidic Tract motif


1.4.3.2. *Fonction : étude fonctionnelle de STARD3*

STARD3 appartient à la famille des protéines LTP (Lipid Transfer Proteins), qui sont impliquées dans le transport intracellulaire des lipides. Cette famille comprend quinze protéines chez les mammifères, STARD1 à STARD15, et le domaine START permet l'échange de lipides entre les membranes. STARD3 possède un domaine MENTAL régulant l'adressage et l'ancrage dans la membrane des endosomes tardifs, formant des microdomaines riches en cholestérol à la surface des endosomes. STARD3 interagit également avec les protéines VAPs ou la protéine MOSPD2 pour former des sites de contact membranaire (SCM) entre les endosomes tardifs et le réticulum endoplasmique. Les SCM facilitent le transport de certains composés comme les lipides, et la formation de SCM grâce à l'interaction entre STARD3 et VAPs permet au domaine START de STARD3 de transporter le cholestérol du réticulum endoplasmique vers les endosomes tardifs au dépens de la membrane plasmique, entraînant une accumulation de cholestérol dans les endosomes associée à une diminution de cholestérol au niveau de la membrane plasmique chez les cellules surexprimant STARD3 (234).

STARD3 est une protéine qui se situe entre deux organites et joue un rôle important dans le métabolisme du cholestérol. Ci-dessous se trouve une revue de la littérature que publiée par notre équipe de recherche dans le journal Contact en 2019. Elle décrit en détail la fonction de STARD3 dans le transport intracellulaire du cholestérol, ainsi que l'impact de son interaction avec les protéines VAPs-MOSPD2 sur l'architecture et la dynamique des endosomes. Outre ces fonctions, la littérature a

également signalé l'implication de STARD3 dans d'autres processus tels que la synthèse d'hormones thyroïdiennes, le transport de caroténoïdes et la réplication virale, qui sont également abordés dans cette revue.

STARD3: A Swiss Army Knife for Intracellular Cholesterol Transport

Contact
Volume 2: 1–15
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/2515256419856730
journals.sagepub.com/home/ctc


Laetitia Voilquin^{1,2,3,4}, Massimo Lodi^{1,2,3,4} ,
Thomas Di Mattia^{1,2,3,4}, Marie-Pierre Chenard^{1,2,3,4,5},
Carole Mathelin^{1,2,3,4,6}, Fabien Alpy^{1,2,3,4}  and
Catherine Tomasetto^{1,2,3,4} 

Abstract

Intracellular cholesterol transport is a complex process involving specific carrier proteins. Cholesterol-binding proteins, such as the lipid transfer protein steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain-3 (STARD3), are implicated in cholesterol movements between organelles. Indeed, STARD3 modulates intracellular cholesterol allocation by reducing it from the plasma membrane and favoring its passage from the endoplasmic reticulum (ER) to endosomes, where the protein is localized. STARD3 interacts with ER-anchored partners, notably vesicle-associated membrane protein-associated proteins (VAP-A and VAP-B) and motile sperm domain-containing 2 (MOSPD2), to create ER–endosome membrane contacts. Mechanistic studies showed that at ER–endosome contacts, STARD3 and VAP proteins build a molecular machine able to rapidly transfer cholesterol. This review presents the current knowledge on the molecular and cellular function of STARD3 in intracellular cholesterol traffic.

Keywords

cholesterol, lipid transfer protein, contact, endoplasmic reticulum, endosomes, STARD3, MLN64, STARD3NL, MENTHO

Introduction

Steroidogenic acute regulatory (StAR)-related lipid transfer domain-3 (STARD3) was identified using a bedside to bench approach. It was isolated from human breast biopsies in a screen designed to identify new genes implicated in breast cancer. In early publications, STARD3 was named Metastatic Lymph Node clone 64 (MLN64), as it was the 64th hit isolated in the screen (Tomasetto et al., 1995). Its current name STARD3 was given with respect to its homology with the StAR protein, also referred to as STARD1 (Alpy & Tomasetto, 2005; Stocco & Clark, 1996). On the human genome, the STARD3 gene lies next to the oncogene human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) on chromosome 17q11-12 (Tomasetto et al., 1995). Amplification of this chromosomal subregion explains the co-expression between STARD3 and HER2 in breast cancer cells (Alpy et al., 2003; Bièche et al., 1996; Tomasetto et al., 1995). Remarkably, several studies showed that STARD3 contributes to the growth of HER2-positive cancer cells, but given that both proteins

do not directly interact the molecular mechanism remains unclear (Alpy & Tomasetto, 2014b). Over the last years, the basic function of STARD3 has been clarified. Notably, it was showed to be a cholesterol transporter working at contact sites between endosomes and the endoplasmic reticulum (ER) (Alpy et al., 2013;

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Illkirch, France

³Centre National de la Recherche Scientifique, Illkirch, France

⁴Université de Strasbourg, Illkirch, France

⁵Anatomic Pathology Unit, Strasbourg University Hospital (CHRU), Hôpital de Hautepierre, France

⁶Senology Unit, Strasbourg University Hospital (CHRU), Hôpital de Hautepierre, France

Received September 24, 2018. Revised February 19, 2019. Accepted May 21, 2019.

Corresponding Author:

Catherine Tomasetto, Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries, Strasbourg 67404, France.
Email: catherine-laure.tomasetto@igbmc.fr

Wilhelm et al., 2017). In this article, we review the literature on STARD3 structure and function on intracellular sterol transfer.

STARD3 Is a Lipid Transfer Protein From the START Protein Superfamily

STARD3 contains an MLN64 N-terminal (MENTAL) domain, anchoring the protein to the endosome membrane, a central two phenylalanines in an acidic tract-

like motif (FFAT-like) suggesting the binding to resident proteins from the ER, and a C-terminal StAR-related lipid transfer (START) domain able to transfer cholesterol (Figure 1(a)).

The START Lipid Transfer Domain

The presence of the START domain at the C-terminus qualifies STARD3 as a lipid transfer protein (LTP) from the START superfamily (Figure 1; Alpy & Tomasetto, 2014a; Ponting & Aravind, 1999; Soccio & Breslow,

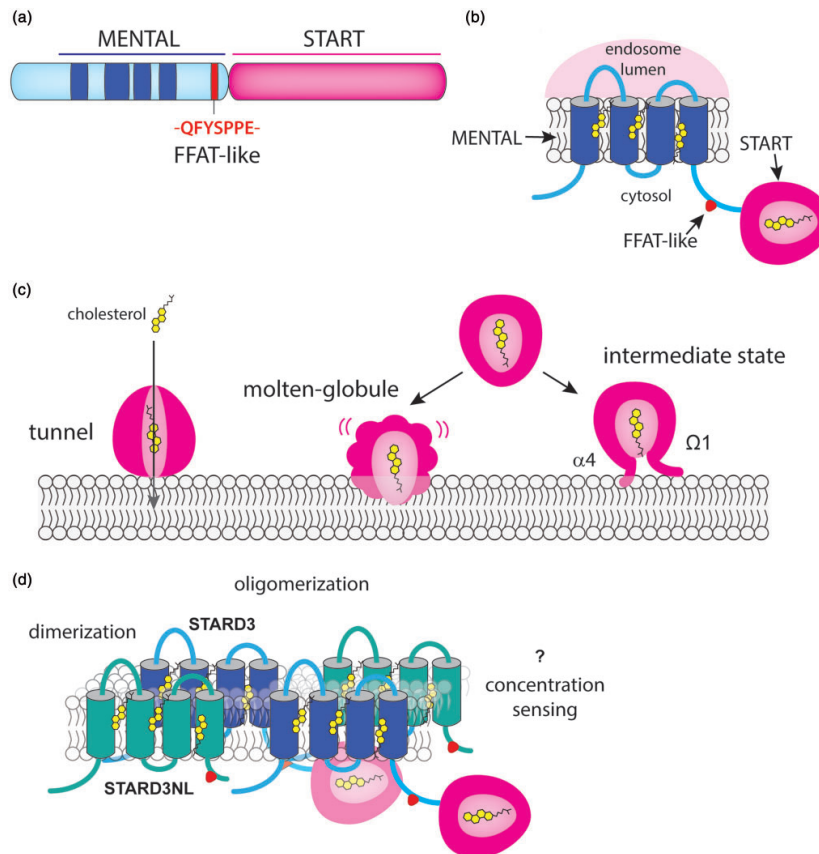


Figure 1. STARD3 protein organization. (a) Schematic representation of STARD3 protein containing a conserved MENTAL domain made of four transmembrane helices (blue), an FFAT-like motif (red), and a START domain (magenta). (b) STARD3 is positioned in endosomes and the START domain is in the cytosol. (c) Models of cholesterol transfer by the START domain. (d) The MENTAL domain mediates the formation of homo- and heterodimers or oligomers with STARD3NL. These interactions may create microdomains enriched in cholesterol at the surface of endosomes. These microdomains may serve to concentrate cholesterol next to the START domain or as sensing domains. MENTAL: MLN64 N-terminal domain; FFAT: two phenylalanines in an acidic tract motif; START: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain; STARD3: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain-3; STARD3NL: STARD3 N-terminal like.

2003). The START domain of STARD3 adopts an alpha-helix/beta-strand grip fold structure with an internal cavity matching the size and hydrophobicity of a cholesterol molecule (Figure 2(a); Letourneau,

Lefebvre, Lavigne, & LeHoux, 2015; Tsujishita & Hurley, 2000). The affinity of the START domain for cholesterol is around $1.5 \mu\text{M}$, a low range consistent with a transport activity (Tsujishita & Hurley, 2000).

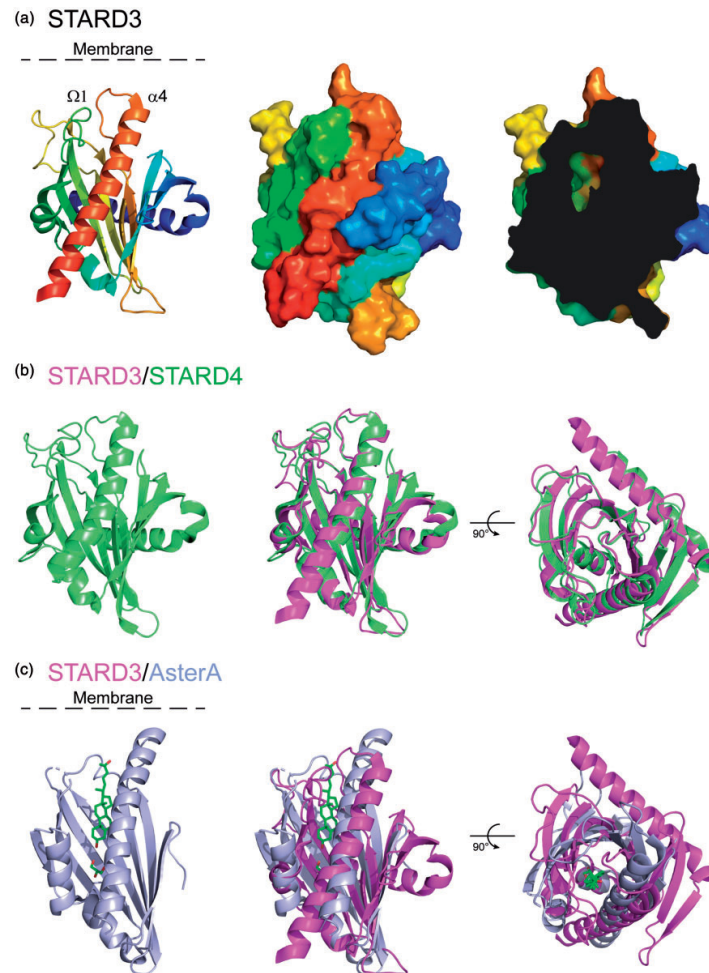


Figure 2. The START domain of STARD3, a cholesterol transfer interface. (a) Three-dimensional (3D) structure of the START domain of STARD3 shown as cartoon (left) or surface (middle) representation. The protein ribbon is rainbow-colored from blue (N-terminus) to red (C-terminus). On the right, a cutaway view of the surface of the domain showing a part of the cholesterol-binding pocket. (b) 3D structure of the START domain of STARD4 alone (green, left) and aligned with STARD3 (magenta, middle). The right-hand panel is rotated 90° about the x -axis. The two structures are highly similar. (c) 3D structure of the START-like domain of Aster-A alone (blue, left) and aligned with STARD3 (magenta, middle). The ligand of Aster-A, 25-hydroxycholesterol, is shown as sticks: green, carbon and red, oxygen. The right-hand panel is rotated 90° about the x -axis. The main difference between the two structures resides in the extended N-terminal α helix present in STARD3 but absent in Aster-A. STARD3: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain-3.

Surprisingly, the domain structure was similar to that of the birch pollen allergen Bet v1 (Horvath et al., 2016; Tsujishita & Hurley, 2000). Since then, the Bet v1 structure revealed the existence of a large superfamily of structurally related proteins. Eleven Pfam families were determined to be members of the Bet v1-like superfamily also known as the SRPBCC (START/RHO_alpha_C/PITP/Bet_v1/CoxG/CalC) ligand-binding domain superfamily (Iyer, Koonin, & Aravind, 2001; Radauer, Lackner, & Breiteneder, 2008). Among them, two families are distributed in all three superkingdoms: the polyketide cyclase and the activator of heat shock protein 90 (Hsp90) ATPase homologue 1 families. The ring hydroxylases and the CoxG families are only present in bacteria and archaea. Two families are specific to eukaryotes: Phosphatidylinositol transfer protein family is present in most eukaryotes, while the Bet v1 family is only present in plants. Of interest, while START proteins were thought to be absent from yeast, in silico analyses, based on both sequence comparison and secondary structure prediction, showed recently that a large family of eukaryotic proteins contains a domain resembling the START domain (Gatta et al., 2015; Khafif, Cottret, Balague, & Raffaele, 2014). This family comprises three human proteins (Aster-A, B, and C; encoded by the GRAMD1A, B, and C genes, respectively) and six proteins from yeast (Lam1p/Ysp1p, Lam2p/Ysp2p, Lam3p/Sip3p, Lam4p, Lam5p, and Lam6p/Lct1; Gatta et al., 2015). Moreover, these novel START-like containing proteins bind and transport sterols (Gatta et al., 2015; Horemcamp, Valverde, Nunnari, & Reinisch, 2018; Murley et al., 2015; Murley et al., 2017; Sandhu et al., 2018). It was tempting to speculate that the structure of the START-like domain first defined by Gatta et al. (2015) shares the Bet v1 fold. This assumption was confirmed recently by the crystal structure of the START-like domains of Lam2, Lam4, and Aster-A, which have a similar overall structure to the one of STARD3 and STARD4 (Horenkamp, 2018; Jentsch et al., 2018; Sandhu et al., 2018; Tong, Manik, & Im, 2018; Figure 2(b)). Interestingly, the isolated sterol-binding domains of Lam2p, Lam4, and Aster-A proteins were co-crystallized with sterols, which was present in the ligand-binding pocket created by the concave beta-sheet, and the long C-terminal helix (Horenkamp et al., 2018; Jentsch et al., 2018; Sandhu et al., 2018; Tong et al., 2018). These data strengthen previous predictions regarding the orientation of the sterol molecule in the START domain, and thus the orientation of the START domain in relation to the membrane for sterol loading and unloading (Figure 2; Murcia, Faraldo-Gomez, Maxfield, & Roux, 2006; Tsujishita & Hurley, 2000). However, we can speculate that the mode or the efficiency of transfer differs between the STARD and the Lam/Aster/Gram proteins.

Indeed, in the Lam/Aster/Gram subfamily, the START-like domain is embedded in the protein and the C-terminal helix is not free while all the STARD proteins have a free C-terminal helix.

Mechanism of Sterol Transport

The molecular mechanism implicated in the entry and exit of cholesterol from the START domain is a matter of debate. Several models were proposed: a tunnel hypothesis, an intermediate state model implicating movements of the C-terminal alpha 4 helix and the omega 1 loop, and the molten globule hypothesis where the structure of the protein unfolds upon interaction with the acidic environment of the membrane (Figure 1; Bose, Whittal, Baldwin, & Miller, 1999; Iaea, Dikiy, Kiburu, Eliezer, & Maxfield, 2015; Lavigne, Najmanivich, & LeHoux, 2010; Murcia et al., 2006) reviewed in (Letourneau et al., 2015). The tunnel hypothesis is based on the presence of two openings in the structure but given their limited diameters, the authors suggested that additional movements in the alpha 4 helix and omega 1 loop would be necessary to allow sterol entry and exit (Tsujishita & Hurley, 2000; Figures 1(c) and 2(a)). The molten globule hypothesis is based on experimental data showing unfolding of STARD1 at acidic pH (Bose et al., 1999). The model is consistent with the delivery of sterol in the membrane, but it is challenged by the fact that under this unfolded form, the START domain cannot hold a sterol molecule (Roostae, Barbar, Lehoux, & Lavigne, 2009). The intermediate state model originates from the local unfolding and movement of the C-terminal alpha 4 helix of STARD1 upon interaction with the membrane (Mathieu, Fleury, Ducharme, Lavigne, & LeHoux, 2002; Roostae, Barbar, Lavigne, & LeHoux, 2009; Roostae, Barbar, Lehoux, & Lavigne, 2008). This model is completed by other studies showing movements of the omega 1 loop upon cholesterol loading (Murcia et al., 2006). The intermediate-state model including notably conformational changes in the omega 1 loop, and the alpha 4 helix interacting with the membrane is today a good model to explain cholesterol binding and delivery by the START domain (Figure 1(c)).

START Domains Are Not Equal in Terms of Transfer

Early in vivo and in vitro studies using either steroidogenic assays in transfected cells or synthetic donor and acceptor vesicles showed that—in isolation—the START domain of STARD3 had a sterol transfer capacity similar to that of STARD1 (Bose, Whittal, Huang, Baldwin, & Miller, 2000; Watari et al., 1997). Later, a comparative study on the activity and structure of STARD proteins from the sterol binder subgroup

(STARD2, D3, D4, D5 and D6) was done by the Bose and Miller's groups (Bose et al., 2008). This seminal study using recombinant START domains in isolation for STARD1 and D3 and the whole STARD4, D5 and D6 proteins showed that cholesterol-binding capacity does not predict steroidogenic activity, in other words, the ability for a given START domain to move cholesterol. Bose et al. (2008) showed that although cholesterol binding was quite similar for all the STARD proteins from this subgroup, their capacities to transfer cholesterol were different. In fact STARD1, D6 and D3 were able to rapidly induce pregnenolone production using isolated mitochondria, while STARD4 and D5 had little activity (Bose et al., 2008). This is surprising because the crystal structures of STARD3 and D4 are very similar (Figure 2; Romanowski, Soccio, Breslow, & Burley, 2002). It is also puzzling because STARD4 is an efficient sterol transporter (Mesmin et al., 2011) able to transfer dehydroergosterol (DHE) from donor to acceptor liposome at a rate of seven molecules of DHE per molecule of STARD4 per minute (Iaea et al., 2015). It is difficult to compare transfer activities from different experimental settings, but we showed that under its soluble form (similar to that of STARD4), the START domain of STARD3 had a transfer capacity of 1 DHE molecule per molecule of STARD3 per min (Wilhelm et al., 2017), more modest than STARD4's. These data indicate that lipid transfer activities between synthetic membranes do not always predict biological activities. Of interest, Iaea et al. (2015) showed that the surface charge of donor and acceptor vesicles modulated STARD4 transfer capacity. Horenkamp et al. (2018) made a similar observation for the isolated START-like domain of Lam2p/Ysp2p and Aster-B/GramD1b. It is then very likely that the donor and acceptor membrane identities in terms of lipid and protein compositions regulate sterol transfer by the START domain. START proteins have a conserved fold, but their primary sequences are different, leaving room for selectivity in their binding with other partner membranes or proteins.

STARD3 Is an Endosome-Bound Sterol Transporter

STARD3 distinguishes itself by the presence of a membrane spanning domain composed of four transmembrane helices (Figure 1(a) and (b); Alpy et al., 2001; Moog-Lutz et al., 1997). The membrane spanning region is critical for the addressing and the proper localization of STARD3 in endosomes (Alpy et al., 2001). We named this region MENTAL domain (Alpy et al., 2005; Alpy, Wendling, Rio, & Tomasetto, 2002) because it is also found in a second human protein called STARD3 N-terminal like (STARD3NL), originally called MLN64

N-terminal domain (MENTAL) homologue (MENTHO) (Figure 1(d); Alpy et al., 2002). The MENTAL domain anchors the protein in endosomes leaving the START domain in the cytosol (Figure 1(b); Alpy et al., 2001). Overexpression of STARD3NL, or of a truncated STARD3 protein containing only the MENTAL domain, results in the enlargement of endosomes (Alpy et al., 2005). In addition, this domain allows the homo- and hetero-oligomerization of both proteins and binds cholesterol (Alpy et al., 2005; Figure 1(d)). Of interest, proteome-wide mapping of cholesterol-interacting proteins using the click chemistry methodology confirmed this finding; several cholesterol-bound peptides were identified in the MENTAL domain (STARD3NL, residues 23–37 and 185–196; Hulce, Cognetta, Niphakis, Tully, & Cravatt, 2013). Altogether, thanks to its ability to dimerize and oligomerize (Alpy et al., 2005), we speculate that the MENTAL domain of STARD3 and STARD3NL build quaternary structures or microdomains at the endosome surface possibly acting as sterol reservoir (Figure 1(d)). In support to this, STARD3 immunolabeling in electron microscopy showed that the protein is not evenly localized on the limiting membrane of endosomes, the labeling appearing as patches, which is compatible with the formation of microdomains (Alpy et al., 2001). Another possibility is that the MENTAL domain acts as a sterol sensing domain to regulate the activity of the START domain.

One study argued that STARD3 was present on a subpopulation of late endosomes positive for the cholesterol transporter ATP-binding cassette subfamily A member 3 and negative for the oxysterol-binding protein-related protein 1L (ORP1L) and the Niemann–Pick type C1 (NPC1) proteins (van der Kant, Zondervan, Janssen, & Neeffjes, 2013). Experiments were done in a malignant melanoma cell line (MelJuSo) using overexpression of fluorescent protein tagged STARD3 at the C-terminus. This study is not consistent with results obtained in other cells including HeLa cells, where untagged STARD3 was localizing with the late endosomal markers LAMP1, CD63, Rab7, and BMP (Alpy et al., 2001; Wilhelm et al., 2017), therefore overlapping with ORP1L- and NPC1-positive endosomes. This discrepancy may reflect cell specific differences in the endosomal compartment; it is known that melanocytes have a cell-type specific endosomal system to generate melanosomes which are lysosome related organelles (Raposo & Marks, 2007). It may also be caused by the presence of the fluorescent protein at the C-terminus that possibly impairs the function of the START domain. Indeed, the START domain is always present at the C-terminus of all STARD proteins, leaving the alpha 4 helix free to interact with acceptor membranes (Alpy & Tomasetto,

2005; Iaca et al., 2015; Tsujishita & Hurley, 2000; Figure 2).

STARD3 Is Ubiquitously Expressed and Regulated in a Cell-Specific Manner

STARD3 is a conserved protein present in the whole animal kingdom as well as in unicellular organisms closely related to animals (Figure 3). STARD3NL is only present in vertebrates evoking a more recent appearance of this protein (Alpy & Tomasetto, 2014b). STARD3 is expressed in most tissues at low levels.

Sequence analysis of the gene 5' region revealed a high GC-content (or guanine-cytosine content) and the absence of canonical promoter elements such as a TATA box. A short promoter of about 200 base pairs upstream of the transcription start sites was sufficient to drive high expression of a reporter gene in vitro (Alpy et al., 2003). In breast cancer cells, there is a strong correlation between STARD3 gene DNA copy number and transcript levels, arguing that amplification of the gene is the main driver for the overexpression (Alpy et al., 2003; Bièche et al., 1996; Tomasetto et al., 1995). In other cells and tissues, STARD3 is likely regulated in a cell-specific



Figure 3. Phylogenetic tree of STARD3 orthologs from 115 species. The whole amino acid sequences were aligned by the Clustal Omega program (McWilliam, Li, Uludag, Squizzato, Park, Buso, Cowley & Lopez, 2013). The phylogenetic tree was drawn with R Studio, R version 3.5.1 (2018-07-02) and the packages *ggtree*, *seqinr*, and *msa*.

manner. A detailed analysis of STARD3 expression in the brain showed a heterogeneous immunostaining of the protein, indicating selective expression in discrete specific cell populations and regions (King et al., 2006). As another example, STARD3 gene expression was shown to be upregulated by 9-cis-retinoic acid in macrophages (Borthwick, Allen, Taylor, & Graham, 2010), and repressed by all-trans-retinoic acid in lymphoma cells (Wang, Cheng, Chuang, Hsu, & Su, 2000). The promoter region of STARD3 gene contains several putative sites for Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) transcription factors binding; in macrophages, STARD3 mRNA decreases during macrophage differentiation and cholesterol loading and increases following acute cholesterol depletion from the plasma membrane (PM) by methyl beta-cyclodextrin and in response to the release of sequestered SREBPs by LY295427 (Borthwick et al., 2010). Of interest, hepatic expression of STARD3 protein was found to be repressed by genetic obesity in both males and females suggesting that STARD3 might facilitate lipid export, rather than its retention in the liver (Soffientini, Caridis, Dolan, & Graham, 2014). One study recently reported a function of STARD3 in osteoporosis (Lei, Xueming, & Ruihang, 2018). Interestingly, it shows that STARD3 promoted osteoclast differentiation possibly by increasing an inflammatory response (Lei et al., 2018).

Intracellular Functions of STARD3

The presence of a START domain in STARD3 is a strong argument for a role of this protein in intracellular sterol transport. By immobilizing the protein on endosomes, the MENTAL domain restricts its sterol transfer activity to the endocytic compartment territory (Figure 1). However, as the endocytic compartment is highly dynamic and connected with many other cellular organelles, STARD3 may act on many cellular organelles.

Does STARD3 Function in the PM?

Several studies reported that STARD3 was addressed to the PM en route to late endosomes (Holtta-Vuori et al., 2005; Liapis, Chen, Davies, Wang, & Ioannou, 2012; van der Kant et al., 2013; Vassilev et al., 2015; Zhang et al., 2002), supporting the idea that STARD3 might transport sterol at the cell surface. In our laboratory, we occasionally observed STARD3 at the PM in cells expressing very high amounts of the protein, but we interpreted this localization as an overexpression artifact; our opinion is that under physiological conditions, STARD3 is mainly in endosomes (Alpy et al., 2001). However, live cells imaging showed that the protein

was in endosomal tubules (our unpublished data; Zhang et al., 2002). It is possible that endosome tubules-containing STARD3 reach the PM bringing STARD3 transiently at PM–endosome contacts. In fact, Vassilev et al. (2015) reported that overexpression of STARD3 tagged with green fluorescent protein (GFP) in a breast cancer cell line, resulted in STARD3 localization in endosomes and for a subset of cells at the PM. The PM staining was attributed to a localization in microdomains in the PM or in vesicles at the proximity of the PM (Vassilev et al., 2015). This observation is consistent with the transient presence of STARD3 in endosomal tubules reaching the PM; whether it is functional is unknown.

Does STARD3 Transport Cholesterol to the Mitochondria?

The literature generally presents STARD3 as an LTP able to make contacts between endosomes and mitochondria, implying a role in transferring cholesterol into the mitochondria (Wong, Gatta, & Levine, 2019). The first study by Watari et al. (1997) showed that STARD3 is able to transfer cholesterol to the mitochondria. There, STARD3 was able to induce the first step of steroidogenesis in Chinese hamster ovary (CHO) cells modified to sustain steroidogenesis. It showed that this activity was low when the full-length protein was expressed. In fact, only a construct corresponding to a free START domain (lacking the MENTAL domain and the FFAT motif) was able to sustain steroidogenesis at levels similar to that of STARD1 (Watari et al., 1997). The interpretation of these data was that the sterol transfer function of STARD3 to the mitochondria was not a physiological process. The hypothesis of a proteolytic cleavage of the protein freeing the START domain was then proposed to support the idea of a role of STARD3 in steroidogenesis (Watari et al., 1997). This notion was not confirmed. Actually, STARD3-deficient mice were not impaired for steroid production (Alpy & Tomasetto, 2014b; Kishida et al., 2004). In addition, STARD3 cannot compensate for the lack of STARD1 in lipoid congenital adrenal hyperplasia, a condition where mutations in the StAR gene (aka STARD1) totally prevent steroidogenesis (Stocco, 2001). Nevertheless, correlation between STARD3 expression and either endosome–mitochondria contacts (Zhang et al., 2002) or with cholesterol entry in the mitochondria (Balboa et al., 2017; Charman, Kennedy, Osborne, & Karten, 2010) was reported. Zhang et al. (2002) used live imaging to show that endosomes marked by STARD3-GFP made contacts with mitochondria. However, in this pioneer study, contacts were not quantified and not compared with cells marked with a different endosome marker. Although the authors interpreted the presence

of contacts between endosomes and mitochondria as the result of STARD3 expression, it was not confirmed by later studies. A study in liver cells showed that STARD3 overexpression results in severe liver damage and apoptosis (Tichauer et al., 2007). By looking at the molecular mechanisms involved, Balboa et al. (2017) concluded that overexpression of STARD3 was associated with increased mitochondrial cholesterol and with mitochondrial morphologic and metabolic alterations in hepatic cells. Unfortunately, they did not document the changes that are expected to be seen upon STARD3 overexpression, notably cholesterol accumulation in endosomes, and therefore it is difficult to know if the mitochondrial phenotype is due to a direct action of STARD3 on mitochondria or is a result of late endosomal cholesterol accumulation that is deleterious to the cell. Charman et al. (2010) showed that silencing STARD3 reduced steroidogenesis (a read-out for cholesterol transport into the mitochondria) in modified CHO cells and decreased mitochondrial cholesterol content but only in CHO cells deficient for the NPC1 protein. In addition, they showed that some of the mitochondrial metabolic alterations seen in NPC1-deficient-CHO cells can be rescued by STARD3 silencing (Balboa et al., 2017; Kennedy et al., 2014). However, the reduction of STARD3 alone in CHO cells had no effect on mitochondrial metabolism (Kennedy et al., 2014). It is possible that endosome-mitochondria contacts created by other mechanisms, such as endosome enlargement and cholesterol accumulation as in NPC1-deficient cells, may bring STARD3 at the periphery of mitochondria where it can transfer cholesterol to mitochondria by the START domain. This transport appears to play a role in CHO-NPC1-deficient cells, but it is unclear that it is relevant in other cells.

STARD3 Makes Specific Contacts With the ER Through VAPs and MOSPD2

A conserved FFAT-like motif marks the end of the MENTAL domain (Figure 1(a) and (b)). This motif is present in an unstructured region between the MENTAL and the START domain. Canonical FFAT motifs were originally described as linear peptide sequences (EFFDAXE) flanked by an acidic region (Loewen, Roy, & Levine, 2003). FFAT motifs are signals for the interaction with proteins containing a major sperm protein (MSP) domain including vesicle-associated membrane protein-associated proteins (VAP-A and VAP-B), (Furuita, Jee, Fukada, Mishima, & Kojima, 2010; Kaiser et al., 2005; Loewen et al., 2003; Mikitova & Levine, 2012) and motile sperm domain containing 2 (MOSPD2), (Di Mattia et al., 2018). MOSPD2 and VAP proteins contain an MSP domain able to recognize

FFAT motifs and to bind to FFAT-containing proteins like STARD3 and STARD3NL (Alpy et al., 2013; Di Mattia et al., 2018). The MSP domain has an immunoglobulin-like fold based on a seven-stranded beta-sandwich (Bullock, Roberts, & Stewart, 1996; Kaiser et al., 2005). Our in vitro analyses revealed that, despite sharing limited sequence homology, the MSP domains of MOSPD2 and VAPs have a conserved fold, the same mode of FFAT motif recognition, and similar affinities (Di Mattia et al., 2018). VAP-A, VAP-B, and MOSPD2 are tail-anchored proteins localized on the ER (Figure 4; Di Mattia et al., 2018; Lev, Ben Halevy, Peretti, & Dahan, 2008). In addition, these MSP domain-containing proteins are able to build ER-endosome contacts with STARD3 (Figure 4). It is unclear whether STARD3 competes with VAPs and MOSPD2 for binding and whether contact sites can contain different tethers. Of note, at the resolution of light microscopy (200–300 nm), we observed both VAPs and MOSPD2 in a given subdomain of the ER engaged in a contact with endosomes (Di Mattia et al., 2018). However, we cannot affirm that the presence of multiple tethers in the same region indicates that all of them are in complex with a partner on the facing membrane as most of these proteins can dimerize. Interestingly, contacts made by VAP and MOSPD2 are likely functionally different (Figure 4). Indeed, MOSPD2 is more than a VAP homolog; it contains an N-terminal cellular retinaldehyde-binding protein and triple functional domain protein (CRAL-TRIO) domain. This lipophilic domain was first identified in the Sec14-protein (Sec14p) of yeast and functions in exchanging phosphatidylinositol and phosphatidylcholine between lipid membrane bilayers (Bankaitis, Aitken, Cleves, & Dowhan, 1990). The function of the CRAL-TRIO domain of MOSPD2 is unknown, but we can speculate that its association with STARD3 might form a molecular machine able to counterexchange sterol with another lipid (Figure 4).

The Interaction Between STARD3, STARDNL, and VAP/MOSPD2 Proteins Has a Strong Impact on the Subcellular Architecture and on Endosome Dynamics

In cells overexpressing either STARD3 or STARD3NL, endosomes are covered by the ER. This ER-endosome tethering results in the formation of extended membrane contact sites where the distance between the ER and endosome membranes is less than 10 nm (Alpy et al., 2013). Of interest, extended ER-endosome contacts mediated by STARD3NL alter the dynamics of the endosomal compartment by preventing vesicle-to-tubule transitions (Alpy et al., 2013). Membrane

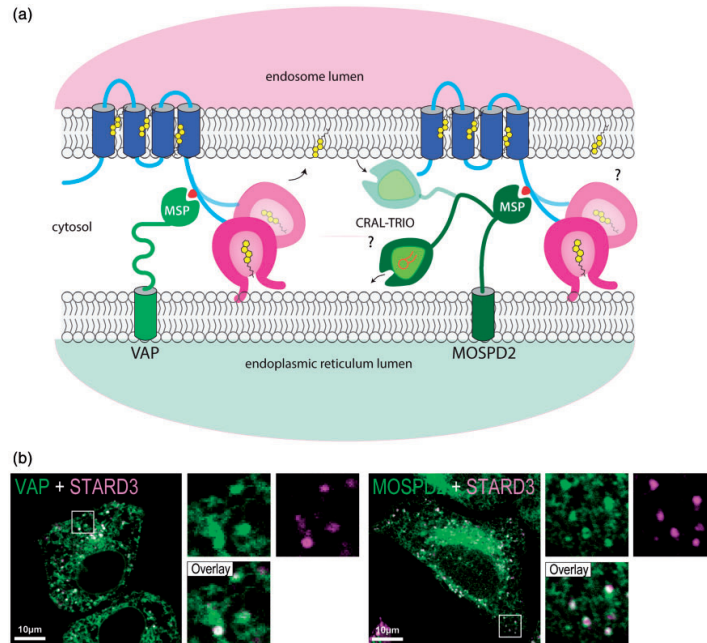


Figure 4. STARD3 creates membrane contacts between endosomes and the ER. (a) Schematic representation of STARD3 positioning in the context of the endocytic compartment and ER–endosome contact via interaction with the ER–proteins VAP and MOSPD2. (b) Localization of STARD3 with VAP and MOSPD2 at ER–endosome contacts. Merge images on the left of STARD3 (magenta) and VAP (green) labeling and on the right of STARD3 (magenta) and MOSPD2 (green) labeling. Insets correspond to a 3.5× magnification. Scale bar: 10 μm. VAP: vesicle-associated membrane protein-associated proteins; MOSPD2: motile sperm domain-containing 2; MSP: major sperm protein domain; CRAL-TRIO: cellular retinaldehyde-binding protein and triple functional domain protein domain; STARD3: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain-3.

contacts between the ER and endosomes have been previously described in the context of intracellular cholesterol sensing. They involved another sterol transfer protein named ORP1L (Johansson, Lehto, Tanhuanpää, Cover, & Olkkonen, 2005; Rocha et al., 2009). Of note, both STARD3 and ORP1L interact with VAPs and MOSPD2 proteins in the ER (Alpy et al., 2013; Di Mattia et al., 2018). However, at contacts between endosomes and the ER, ORP1L mediates cholesterol transfer from endosomes to the ER (Ridgway & Zhao, 2018; Zhao & Ridgway, 2017), while STARD3 mediates cholesterol transfer from the ER to endosomes (Wilhelm et al., 2017). In addition, in cells grown in the absence of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol condition, VAPs and ORP1L are required for transport of ER-derived cholesterol to a subpopulation of endosomes (Eden et al., 2016). These results support the idea that

ER–endosome contacts are built by distinct protein complexes and lipid transport at these sites might be flexible.

STARD3 and VAP Form an Autonomous Sterol Transfer Machine

STARD3 builds physical contacts between endosomes and the ER. How these contacts function in sterol exchange was recently uncovered using *in vitro* and *in vivo* approaches.

STARD3 Favors Cholesterol Transport in Endosomes and Reduces PM Cholesterol

Cholesterol *in situ* labeling in cells expressing high amount of STARD3 showed that STARD3 modulates the intracellular repartition of cholesterol (Wilhelm

et al., 2017). Consistent with earlier studies, STARD3 expression is associated with increased cholesterol in late endosomes (Alpy et al., 2001). To better understand the mechanism of this accumulation, we used STARD3 mutants impaired in their ability either to transfer cholesterol or to make contact sites. Mutants lacking the START domain or containing a two amino acid substitution in the START domain lipid-binding cavity did not accumulate cholesterol in endosomes. Likewise, mutation in the FFAT motif inactivating binding with VAP prevented cholesterol accumulation in endosome (Wilhelm et al., 2017). As the PM is enriched in cholesterol, we studied its cholesterol content in the context of STARD3 expression. The PM contains different pools of cholesterol (Das, Brown, Anderson, Goldstein, & Radhakrishnan, 2014). Cholesterol-enriched domains are accessible to the domain 4 (D4) of Perfringolysin O (Θ toxin), a cholesterol-binding toxin (Ohno-Iwashita et al., 2004). Using a fluorescent protein tagged GFP-D4 as a biosensor for membrane cholesterol in living cells, we showed that STARD3 expression was associated with a reduction of signal at the PM that we assumed reflects a reduction of PM cholesterol. Of note, Vassilev et al. (2015) reported that STARD3-GFP was implicated in cholesterol delivery in the PM at the expense of the ER in MCF7 cells. As we observed an opposite results in HeLa cells, where STARD3 expression is associated with cholesterol accumulation in endosome and cholesterol reduction at the PM (Wilhelm et al., 2017), we overexpressed an untagged version of STARD3 in MCF7 cells and looked at cholesterol distribution. We could not confirm Vassilev et al. (2015) observations; in MCF7 cells, STARD3 expression results in cholesterol accumulation in late endosomes and a reduction of PM cholesterol (our unpublished data).

Membrane Tethering Boosts Sterol Transport by the START Domain

In vivo studies support the model in which STARD3 and VAP-made late endosome-ER contacts allow cholesterol transport. To have direct evidence of this transport, we reconstituted the tethering complex in vitro using recombinant proteins and synthetic liposomes. As mentioned earlier, compared with STARD4, and indirectly with Lamp proteins (Iaea et al., 2015; Jentsch et al., 2018), the sterol transfer function of the soluble START domain of STARD3 is modest. But in contrast to STARD4, which is free, STARD3 is hooked on endosomes by the MENTAL domain and attached to the ER by a FFAT-MSP interaction (Figure 4). To test sterol transport in this defined context, contact sites were mimicked in vitro, by STARD3-decorated endosome-like liposomes and VAP-decorated ER-like liposomes, and sterol transport was measured in real time using a

fluorescence resonance energy transfer-based assay (Mesmin et al., 2011; Moser von Filseck, Vanni, Mesmin, Antonny, & Drin, 2015). In this in vitro setting, within the first second, endosome-ER contact formation occurred and was associated with a fast sterol transport; the equilibrium in sterol between both populations of liposomes was reached within few minutes. The initial transport rate was about 24 sterol molecules/min transported by one STARD3 molecule, an order of magnitude higher than unattached STARD3 (Wilhelm et al., 2017). This was not observed for START-like proteins; curiously, the sterol transfer capacity of Lam2p/Ysp2p and Aster B/GramD1b is not favored by tethering (Horenkamp et al., 2018). In the case of STARD3, sterol transport assays are consistent with in vivo studies (Wilhelm et al., 2017), showing that the complex formed by STARD3 and VAP in membrane contacts functions as an independent molecular machine transferring sterols in a rapid manner.

STARD3/VAP Contacts Move Cholesterol From the ER to Endosomes

It was first thought that STARD3 could export LDL-derived cholesterol from endosome to the ER where it is esterified. Many lines of evidence are against this idea: the expression of STARD3 in different cell lines including CHO, HeLa, and cells being CV-1 (simian) in Origin (COS) results in cholesterol accumulation in endosomes (Alpy et al., 2001; Holtta-Vuori et al., 2005; Liapis et al., 2012). In addition, STARD3 overexpression did not cause a significant change in cholesterol esterification (Liapis et al., 2012). Finally, STARD3 expression in NPC1- and NPC2-deficient fibroblasts does not alleviate cholesterol accumulation in endosomes, it rather increases sterol load (Alpy et al., 2001, 2002; Holtta-Vuori et al., 2005). To have a better insight on the source of cholesterol mobilized by STARD3/VAP contacts, we labeled cholesterol in situ in cells expressing STARD3, in the absence of LDL cholesterol, and in the absence of de novo synthesized cholesterol. Of interest, while the absence of LDL-derived cholesterol had no significant effect on cholesterol accumulation driven by STARD3, in the absence of de novo synthesis, cholesterol was not accumulated in endosomes. These results support the notion that STARD3/VAP contacts are involved in the delivery of neosynthesized cholesterol in endosomes (Wilhelm et al., 2017). The cellular processes involved in sterol uptake and synthesis are tightly regulated by the transcription factors from the SREBPs family (Horton, Goldstein, & Brown, 2002). Notably, SREBP-2 is a transcriptional regulator of genes participating in the synthesis and uptake of cholesterol. We were surprised to note that the endosomal-cholesterol accumulation and PM depletion driven by STARD3/

VAP contacts were imperceptible to the SREBP2 transcription factor despite the fact that the pathway was still functional (Wilhelm et al., 2017). All these results suggest that different pools of cholesterol coexist in endosomes, notably the LDL-cholesterol en route to the ER, and a pool of newly formed cholesterol moving to endosomes.

STARD3/VAP Contacts Modulate the Inner Membrane Composition of Endosomes

Endosomes are cholesterol rich organelles, and therefore bringing more cholesterol from the ER to endosomes appears counterintuitive. One recent study showed that cholesterol can move from the ER to endosomes. Eden et al. (2016) reported that ER-endosome contacts made by Annexin A1 and S100A11 support cholesterol transport by ORP1L from the ER to endosome in the context of Epidermal Growth Factor signaling. This ER-to-endosome transport made by ORP1L and VAP is involved in the formation of endosome intraluminal vesicles (Eden et al., 2016). Actually, the morphology of endosomes under conditions of VAP/STARD3 contacts is changed. Endosomes with homogenous intraluminal vesicles were rarer in these cells compared with control cells. The endosomes were generally pleomorphic and enriched in internal membranes including multilamellar and multivesicular structures (Wilhelm et al., 2017). Given that the complex formed by STARD3 and VAP fluxes cholesterol toward endosomes, this pool of cholesterol might be preferentially used to make inner membranes in endosomes.

STARD3, More Than a Cholesterol Transporter

A surprising function for STARD3 was discovered in silkworms (*Bombyx mori*). Silkworm larvae build cocoons in silk which naturally displays a yellow color. This color results from the presence of carotenoids in the silk, a chemical which is not synthesized by these animal but taken up from mulberry leaves through the alimentation (Sakudoh et al., 2007; Sakudoh & Tsuchida, 2009). Genetic analyses showed that in silkworms, the STARD3 gene has evolved to produce two different proteins by alternative promoter usage and splicing: A START-only protein named carotenoid-binding protein which is involved in carotenoid transport in the silk glands, and *Bombyx mori* Start1, which has the same structure as STARD3 found in other animals, and is likely involved in cholesterol transport (Sakudoh, Tsuchida, & Kataoka, 2005; Tabunoki et al., 2002). Of note, in humans, two carotenoids, lutein and zeaxanthin, accumulate in the central region of the retina, the macula lutea, that is responsible for central vision. The name

macula lutea originates from the yellow color of this structure, which results from the presence of carotenoids. Interestingly, a carotenoid-binding protein was purified from human retina (Bhosale et al., 2009). This protein binds lutein with a K_d of $0.45 \mu\text{M}$. Based on the molecular weight of this protein and its detection by anticarotenoid-binding protein antibodies, STARD3 was proposed to be the carotenoid-binding protein in human eyes (Bhosale et al., 2009). Accordingly, the START domain of STARD3 was shown to bind lutein with a K_d similar to that of cholesterol of $0.45 \mu\text{M}$ (Li, Vachali, Frederick, & Bernstein, 2011). These data suggest that STARD3 might be responsible for carotenoid accumulation in the human retina, thus implying that STARD3 could bind several ligands, and therefore have a general function in cholesterol transport and a specialized role in the retina.

STARD3 has been recently incriminated in viral infection and replication. Actually, factors implicated in endocytosis and intracellular cholesterol homeostasis are generally needed for viral infection. The NPC1 protein has been shown to be essential for filovirus infection notably Ebola virus infection (Carette et al., 2011; Cote et al., 2011; Herbert et al., 2015). In that case, the protein itself acts as a viral receptor. However, for many other viruses, endosomal cholesterol contributes to their entry and replication: notably Chikungunya, Zika, West Nile, and Dengue viruses (Wichit et al., 2017). Of interest, a recent publication reported that NPC1 and STARD3 were implicated in the entry and replication of Hepatitis C virus, and not of the Dengue virus (Stoeck et al., 2018). While the molecular mechanism implicating STARD3 is not known, it might bring cholesterol to the replication organelle, a structure composed of

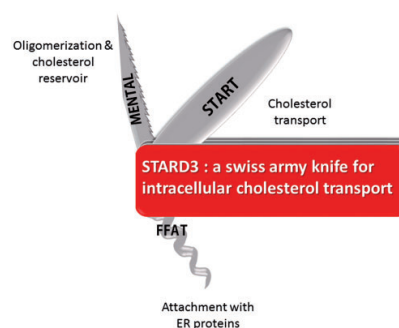


Figure 5. Title visual narrative. MENTAL: MLN64 N-terminal domain; FFAT: two phenylalanines in an acidic tract motif; START: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain; ER: endoplasmic reticulum; STARD3: steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer domain-3.

single and double membrane vesicles (Romero-Brey et al., 2012). This study supports the idea that individual LTPs like STARD3 may represent new vulnerabilities for many viruses.

Conclusion

STARD3 is an LTP able to transport cholesterol; the different structural and functional regions present in the protein cooperate to ensure a fast and efficient intracellular transport of cholesterol between endosomes and the ER (Figure 5). The fact that STARD3 can partner with three different ER receptors (VAPs and MOSPD2) suggests that it might be involved in the transport of different pools of cholesterol, coming and leaving endosomes, involving the ER and perhaps other organelles and LTPs. Along this line, the physiological relevance of a complex made of STARD3 and MOSPD2 on intracellular lipid transport needs to be addressed. The isolation, purification, and molecular characterization of the contacts made by STARD3 under different conditions will clarify its role in pathophysiological pathways. In addition, structure function experiments with the complete protein in complex with either VAP or MOSPD2 will help to capture the mechanism of sterol transport. The role of STARDNL, the START domain-less protein, remains enigmatic and should be clarified. We speculate that STARD3NL assists STARD3 by the creation of microdomains at the surface of late endosomes ready to assemble into extended membrane contact sites and to store a pool of cholesterol to be transferred by the START domain. The role of STARD3 in binding and trafficking other ligands has been established in silkworm and in the human retina; more studies are needed to understand the function of this transport. STARD3/VAP and STARD3/MOSPD2 complexes are examples of a growing number of molecular complexes implicated in inter-organelle communication and exchange, and their characterization will provide new insights about intracellular communication and lipid distribution.

Acknowledgments

The authors acknowledge core funds from the Institut National de Santé et de Recherche Médicale (<http://www.inserm.fr/>), the Centre National de la Recherche Scientifique (<http://www.cnrs.fr/>), the Université de Strasbourg (<http://www.unistra.fr/>), and the ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.




Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: LV is supported by an allocation from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France; <http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>). TDM is supported by a Fondation pour la Recherche Médicale fellowship. M. L. is supported by a fellowship from the Faculty of Medicine, University of Strasbourg. This work was supported by grants from the Institut National Du Cancer INCA (INCA_9269; www.e-cancer.fr) and the Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est; <https://www.ligue-cancer.net>).

ORCID iD

Massimo Lodi  <https://orcid.org/0000-0002-7593-6378>
 Fabien Alpy  <https://orcid.org/0000-0002-0526-0720>
 Catherine Tomasetto  <https://orcid.org/0000-0002-1811-5848>

References

- Alpy, F., Boulay, A., Moog-Lutz, C., Andarawewa, K. L., Degot, S., Stoll, I.,... Tomasetto, C. (2003). Metastatic lymph node 64 (MLN64), a gene overexpressed in breast cancers, is regulated by Sp/KLF transcription factors. *Oncogene*, *22*, 3770–3780.
- Alpy, F., Latchumanan, V. K., Kedinger, V., Janoshazi, A., Thiele, C., Wendling, C.,... Tomasetto, C. (2005). Functional characterization of the MENTAL domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*, 17945–17952.
- Alpy, F., Rousseau, A., Schwab, Y., Legueux, F., Stoll, I., Wendling, C.,... Levine, T. P. (2013). STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *Journal of Cell Science*, *126*, 5500–5512.
- Alpy, F., Stoeckel, M. E., Dierich, A., Escola, J. M., Wendling, C., Chenard, M. P.,... Rio, M. C. (2001). The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*, 4261–4269.
- Alpy, F., & Tomasetto, C. (2005). Give lipids a START: The StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *Journal of Cell Science*, *118*, 2791–2801.
- Alpy, F., & Tomasetto, C. (2014a). START ships lipids across interorganelle space. *Biochimie*, *96*, 85–95.
- Alpy, F., & Tomasetto, C. L. (2014b). STARD3: A lipid transfer protein in breast cancer and cholesterol trafficking. In B. J. Clark, & D. M. Stocco (Eds.), *Cholesterol transporters of the START domain protein family in health and disease* (pp. 119–138). New York, NY: Springer.

- Alpy, F., Wendling, C., Rio, M. -C., & Tomasetto, C. (2002). MENTHO, a MLN64 homologue devoid of the START domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 50780–50787.
- Balboa, E., Castro, J., Pinochet, M. J., Cancino, G. I., Matias, N., Jose Saez, P., ... Zanlungo, S. (2017). MLN64 induces mitochondrial dysfunction associated with increased mitochondrial cholesterol content. *Redox Biology*, *12*, 274–284.
- Bankaitis, V. A., Aitken, J. R., Cleves, A. E., & Dowhan, W. (1990). An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature*, *347*, 561–562.
- Bhosale, P., Li, B., Sharifzadeh, M., Gellermann, W., Frederick, J. M., Tsuchida, K., & Bernstein, P. S. (2009). Purification and partial characterization of a lutein-binding protein from human retina. *Biochemistry*, *48*, 4798–4807.
- Bièche, I., Tomasetto, C., Régnier, C. H., Moog-Lutz, C., Rio, M. C., & Lidereau, R. (1996). Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Research*, *56*, 3886–3890.
- Borthwick, F., Allen, A. -M., Taylor, J. M., & Graham, A. (2010). Overexpression of STARD3 in human monocyte/macrophages induces an anti-atherogenic lipid phenotype. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *119*, 265–272.
- Bose, H. S., Whittall, R. M., Baldwin, M. A., & Miller, W. L. (1999). The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*, 7250–7255.
- Bose, H. S., Whittall, R. M., Huang, M. C., Baldwin, M. A., & Miller, W. L. (2000). N-218 MLN64, a protein with StAR-like steroidogenic activity, is folded and cleaved similarly to StAR. *Biochemistry*, *39*, 11722–11731.
- Bose, H. S., Whittall, R. M., Ran, Y., Bose, M., Baker, B. Y., & Miller, W. L. (2008). StAR-like activity and molten globule behavior of StARD6, a male germ-line protein. *Biochemistry*, *47*, 2277–2288.
- Bullock, T. L., Roberts, T. M., & Stewart, M. (1996). 2.5 Å resolution crystal structure of the motile major sperm protein (MSP) of *Ascaris suum*. *Journal of Molecular Biology*, *263*, 284–296.
- Carette, J. E., Raaben, M., Wong, A. C., Herbert, A. S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., ... Dal Cin, P. (2011). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature*, *477*, 340–343.
- Charman, M., Kennedy, B. E., Osborne, N., & Karten, B. (2010). MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick Type C1 protein. *Journal of Lipid Research*, *51*, 1023–1034.
- Cote, M., Misasi, J., Ren, T., Bruchez, A., Lee, K., Filone, C. M., ... Cunningham, J. (2011). Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature*, *477*, 344–348.
- Das, A., Brown, M. S., Anderson, D. D., Goldstein, J. L., & Radhakrishnan, A. (2014). Three pools of plasma membrane cholesterol and their relation to cholesterol homeostasis. *Elife*, *3*, e02882.
- Di Mattia, T., Wilhelm, L. P., Ikhlef, S., Wendling, C., Spohner, D., Nomine, Y., ... Alpy, F. (2018). Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Reports*, *19*, e45453.
- Eden, E. R., Sanchez-Heras, E., Tsapara, A., Sobota, A., Levine, T. P., & Futter, C. E. (2016). Annexin A1 tethers membrane contact sites that mediate ER to endosome cholesterol transport. *Developmental Cell*, *37*, 473–483.
- Furuita, K., Jee, J., Fukada, H., Mishima, M., & Kojima, C. (2010). Electrostatic interaction between oxysterol-binding protein and VAMP-associated protein A revealed by NMR and mutagenesis studies. *Journal of Biological Chemistry*, *285*, 12961–12970.
- Gatta, A. T., Wong, L. H., Sere, Y. Y., Calderón-Noreña, D. M., Cockcroft, S., Menon, A. K., & Levine, T. P. (2015). A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport. *eLife*, *4*, e07253.
- Herbert, A. S., Davidson, C., Kuehne, A. I., Bakken, R., Braigen, S. Z., Gunn, K. E., ... Walkley, S. U. (2015). Niemann-pick C1 is essential for ebolavirus replication and pathogenesis in vivo. *MBio*, *6*, e00565–e00515.
- Holttä-Vuori, M., Alpy, F., Tanhuanpää, K., Jokitalo, E., Mutka, A. L., & Ikonen, E. (2005). MLN64 is involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles. *Molecular Biology of the Cell*, *16*, 3873–3886.
- Horenkamp, F. A., Valverde, D. P., Nunnari, J., & Reinisch, K. M. (2018). Molecular basis for sterol transport by StART-like lipid transfer domains. *The EMBO Journal*, *37*, e98002.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, *109*, 1125–1131.
- Horvath, M. P., George, E. W., Tran, Q. T., Baumgardner, K., Zharov, G., Lee, S., ... Bernstein, P. S. (2016). Structure of the lutein-binding domain of human STARD3 at 1.74 Å resolution and model of a complex with lutein. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, *72*, 609–618.
- Hulce, J. J., Cognetta, A. B., Niphakis, M. J., Tully, S. E., & Cravatt, B. F. (2013). Proteome-wide mapping of cholesterol-interacting proteins in mammalian cells. *Nature Methods*, *10*, 259–264.
- Iaea, D. B., Dikiy, I., Kiburu, I., Eliezer, D., & Maxfield, F. R. (2015). STARD4 membrane interactions and sterol binding. *Biochemistry*, *54*, 4623–4636.
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2001). Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *43*, 134–144.
- Jentsch, J. A., Kiburu, I., Pandey, K., Timme, M., Ramlall, T., Levkau, B., ... Menon, A. K. (2018). Structural basis of sterol binding and transport by a yeast StARKin domain. *Journal of Biological Chemistry*, *293*, 5522–5531.
- Johansson, M., Lehto, M., Tanhuanpää, K., Cover, T. L., & Olkkonen, V. M. (2005). The oxysterol-binding protein homologue ORPIL interacts with Rab7 and Alters functional properties of late endocytic compartments. *Molecular Biology of the Cell*, *16*, 5480–5492.

- Kaiser, S. E., Brickner, J. H., Reilein, A. R., Fenn, T. D., Walter, P., & Brunger, A. T. (2005). Structural basis of FFAT motif-mediated ER targeting. *Structure*, *13*, 1035–1045.
- Kennedy, B. E., Madreiter, C. T., Vishnu, N., Malli, R., Graier, W. F., & Karten, B. (2014). Adaptations of energy metabolism associated with increased levels of mitochondrial cholesterol in Niemann-Pick type C1-deficient cells. *Journal of Biological Chemistry*, *289*, 16278–16289.
- Khafif, M., Cottret, L., Balague, C., & Raffaele, S. (2014). Identification and phylogenetic analyses of VAST, an uncharacterized protein domain associated with lipid-binding domains in Eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, *15*, 222.
- King, S. R., Smith, A. G. A., Alpy, F., Tomasetto, C., Ginsberg, S. D., & Lamb, D. J. (2006). Characterization of the putative cholesterol transport protein metastatic lymph node 64 in the brain. *Neuroscience*, *139*, 1031–1038.
- Kishida, T., Kostetskii, I., Zhang, Z., Martinez, F., Liu, P., Walkley, S. U., ... Strauss, J. F. (2004). Targeted mutation of the MLN64 START domain causes only modest alterations in cellular sterol metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*, 19276–19285.
- Lavigne, P., Najmanovich, R., & LeHoux, J. -G. (2010). Mammalian StAR-related lipid transfer (START) domains with specificity for cholesterol: Structural conservation and mechanism of reversible binding. In J. R. Harris (Ed.), *Cholesterol binding and cholesterol transport proteins* (pp. 425–437). Dordrecht, the Netherlands: Springer.
- Lei, C., Xueming, H., & Ruihang, D. (2018). MLN64 deletion suppresses RANKL-induced osteoclastic differentiation and attenuates diabetic osteoporosis in streptozotocin (STZ)-induced mice. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, *505*, 1228–1235.
- Letourneau, D., Lefebvre, A., Lavigne, P., & LeHoux, J. G. (2015). The binding site specificity of STARD4 subfamily: Breaking the cholesterol paradigm. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *408*, 53–61.
- Lev, S., Ben Halevy, D., Peretti, D., & Dahan, N. (2008). The VAP protein family: From cellular functions to motor neuron disease. *Trends in Cell Biology*, *18*, 282–290.
- Li, B., Vachali, P., Frederick, J. M., & Bernstein, P. S. (2011). Identification of StARD3 as a lutein-binding protein in the macula of the primate retina. *Biochemistry*, *50*, 2541–2549.
- Liapis, A., Chen, F. W., Davies, J. P., Wang, R., & Ioannou, Y. A. (2012). MLN64 transport to the late endosome is regulated by binding to 14-3-3 via a non-canonical binding site. *PLoS One*, *7*, e34424.
- Loewen, C. J. R., Roy, A., & Levine, T. P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *The EMBO Journal*, *22*, 2025–2035.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Mi Park, Y., Buso, N., Cowley, A. P. & Lopez, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* 2013, *41*(W1): W597–W600.
- Mathieu, A. P., Fleury, A., Ducharme, L., Lavigne, P., & LeHoux, J. G. (2002). Insights into steroidogenic acute regulatory protein (STAR)-dependent cholesterol transfer in mitochondria: Evidence from molecular modeling and structure-based thermodynamics supporting the existence of partially unfolded states of StAR. *Journal of Molecular Endocrinology*, *29*, 327–345.
- Mesmin, B., Pipalia, N. H., Lund, F. W., Ramlall, T. F., Sokolov, A., Eliezer, D., & Maxfield, F. R. (2011). STARD4 abundance regulates sterol transport and sensing. *Molecular Biology of the Cell*, *22*, 4004–4015.
- Mikitova, V., & Levine, T. P. (2012). Analysis of the key elements of FFAT-like motifs identifies new proteins that potentially bind VAP on the ER, including two AKAPs and FAPP2. *PLoS One*, *7*, e30455.
- Moog-Lutz, C., Tomasetto, C., Régner, C. H., Wendling, C., Lutz, Y., Muller, D., ... Rio, M. C. (1997). MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *International Journal of Cancer*, *71*, 183–191.
- Moser von Filseck, J., Vanni, S., Mesmin, B., Antonny, B., & Drin, G. (2015). A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nature Communications*, *6*, 6671.
- Murcia, M., Faraldo-Gomez, J. D., Maxfield, F. R., & Roux, B. (2006). Modeling the structure of the START domains of MLN64 and StAR proteins in complex with cholesterol. *Journal of Lipid Research*, *47*, 2614–2630.
- Murley, A., Sarsam, R. D., Toulmay, A., Yamada, J., Prinz, W. A., & Nunnari, J. (2015). Ltc1 is an ER-localized sterol transporter and a component of ER-mitochondria and ER-vacuole contacts. *The Journal of Cell Biology*, *209*, 539–548.
- Murley, A., Yamada, J., Niles, B. J., Toulmay, A., Prinz, W. A., Powers, T., & Nunnari, J. (2017). Sterol transporters at membrane contact sites regulate TORC1 and TORC2 signaling. *The Journal of Cell Biology*, *216*, 2679–2689.
- Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Waheed, A. A., Hayashi, M., Inomata, M., Nakamura, M., ... Iwashita, S. (2004). Perfringolysin O, a cholesterol-binding cytolyisin, as a probe for lipid rafts. *Anaerobe*, *10*, 125–134.
- Ponting, C. P., & Aravind, L. (1999). START: A lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends in Biochemical Science*, *24*, 130–132.
- Radauer, C., Lackner, P., & Breiteneder, H. (2008). The Bet v 1 fold: An ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evolutionary Biology*, *8*, 286.
- Raposo, G., & Marks, M. S. (2007). Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*, 786–797.
- Ridgway, N. D., & Zhao, K. (2018). Cholesterol transfer at endosomal-organelle membrane contact sites. *Current Opinion in Lipidology*, *29*, 212–217.
- Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., ... Neeffjes, J. (2009). Cholesterol sensor ORPIL contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150Glued and late endosome positioning. *The Journal of Cell Biology*, *185*, 1209–1225.
- Romanowski, M. J., Soccio, R. E., Breslow, J. L., & Burley, S. K. (2002). Crystal structure of the *Mus musculus* cholesterol-regulated START protein 4 (StarD4) containing a StAR-related lipid transfer domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, 6949–6954.

- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J. Y., Chlanda, P., Haselman, U., . . . Walther, P. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathogens*, 8, e1003056.
- Roostaee, A., Barbar, E., Lavigne, P., & LeHoux, J. G. (2009). The mechanism of specific binding of free cholesterol by the steroidogenic acute regulatory protein: Evidence for a role of the C-terminal alpha-helix in the gating of the binding site. *Bioscience Reports*, 29, 89–101.
- Roostaee, A., Barbar, E., Lehoux, J. G., & Lavigne, P. (2008). Cholesterol binding is a prerequisite for the activity of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Biochemical Journal*, 412, 553–562.
- Sakudoh, T., Sezutsu, H., Nakashima, T., Kobayashi, I., Fujimoto, H., Uchino, K., . . . Kataoka, H. (2007). Carotenoid silk coloration is controlled by a carotenoid-binding protein, a product of the Yellow blood gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 8941–8946.
- Sakudoh, T., & Tsuchida, K. (2009). [How is cocoon colored?]. *Seikagaku*, 81, 27–31.
- Sakudoh, T., Tsuchida, K., & Kataoka, H. (2005). BmStart1, a novel carotenoid-binding protein isoform from *Bombyx mori*, is orthologous to MLN64, a mammalian cholesterol transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336, 1125–1135.
- Sandhu, J., Li, S., Fairall, L., Pfisterer, S. G., Gurnett, J. E., Xiao, X., . . . Hartman, C. L. (2018). Aster proteins facilitate nonvesicular plasma membrane to ER cholesterol transport in mammalian cells. *Cell*, 175, 514–529.e520.
- Soccio, R. E., & Breslow, J. L. (2003). StAR-related lipid transfer (START) proteins: Mediators of intracellular lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 22183–22186.
- Soffientini, U., Caridis, A. -M., Dolan, S., & Graham, A. (2014). Intracellular cholesterol transporters and modulation of hepatic lipid metabolism: Implications for diabetic dyslipidaemia and steatosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841, 1372–1382.
- Stocco, D. M. (2001). Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Molecular Endocrinology (Baltimore, MD)*, 15, 1245–1254.
- Stocco, D. M., & Clark, B. J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocrine Reviews*, 17, 221–244.
- Stoek, I. K., Lee, J. Y., Tabata, K., Romero-Brey, I., Paul, D., Schult, P., . . . Bartenschlager, R. (2018). Hepatitis C virus replication depends on endosomal cholesterol homeostasis. *Journal of Virology*, 92, e01196–e01217.
- Tabunoki, H., Sugiyama, H., Tanaka, Y., Fujii, H., Banno, Y., Jouni, Z. E., . . . Tsuchida, K. (2002). Isolation, characterization, and cDNA sequence of a carotenoid binding protein from the silk gland of *Bombyx mori* larvae. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 32133–32140.
- Tichauer, J. E., Morales, M. G., Amigo, L., Galdames, L., Klein, A., Quinones, V., . . . Rigotti, A. (2007). Overexpression of the cholesterol-binding protein MLN64 induces liver damage in the mouse. *World Journal of Gastroenterology*, 13, 3071–3079.
- Tomasetto, C., Régnier, C., Moog-Lutz, C., Mattei, M. G., Chenard, M. P., Lidereau, R., . . . Rio, M. C. (1995). Identification of four novel human genes amplified and over-expressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics*, 28, 367–376.
- Tong, J., Manik, M. K., & Im, Y. J. (2018). Structural basis of sterol recognition and nonvesicular transport by lipid transfer proteins anchored at membrane contact sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, E856–E865.
- Tsujishita, Y., & Hurley, J. H. (2000). Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nature Structural Biology*, 7, 408–414.
- van der Kant, R., Zondervan, I., Janssen, L., & Neeffes, J. (2013). Cholesterol-binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1. *Journal of Lipid Research*, 54, 2153–2165.
- Vassilev, B., Sihto, H., Li, S., Hölttä-Vuori, M., Ilola, J., Lundin, J., . . . Ikonen, E. (2015). Elevated levels of StAR-related lipid transfer protein 3 alter cholesterol balance and adhesiveness of breast cancer cells: Potential mechanisms contributing to progression of HER2-positive breast cancers. *The American Journal of Pathology*, 185, 987–1000.
- Wang, K. C., Cheng, A. L., Chuang, S. E., Hsu, H. C., & Su, I. J. (2000). Retinoic acid-induced apoptotic pathway in T-cell lymphoma: Identification of four groups of genes with differential biological functions. *Experimental Hematology*, 28, 1441–1450.
- Watari, H., Arakane, F., Moog-Lutz, C., Kallen, C. B., Tomasetto, C., Gerton, G. L., . . . Strauss, J. F. (1997). MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 8462–8467.
- Wichit, S., Hamel, R., Bernard, E., Talignani, L., Diop, F., Ferraris, P., . . . Thomas, F. (2017). Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. *Scientific Reports*, 7, 3145.
- Wilhelm, L. P., Wendling, C., Védie, B., Kobayashi, T., Chenard, M. -P., Tomasetto, C., . . . Alpy, F. (2017). STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *The EMBO Journal*, 36, 1412–1433.
- Wong, L. H., Gatta, A. T., & Levine, T. P. (2019). Lipid transfer proteins: The lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 85–101.
- Zhang, M., Liu, P., Dwyer, N. K., Christenson, L. K., Fujimoto, T., Martinez, F., . . . Strauss, J. F. (2002). MLN64 mediates mobilization of lysosomal cholesterol to steroidogenic mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 33300–33310.
- Zhao, K., & Ridgway, N. D. (2017). Oxysterol-binding protein-related protein 1L regulates cholesterol egress from the endo-lysosomal system. *Cell Reports*, 19, 1807–1818.

1.4.4. STARD3 et cancer du sein

STARD3 est essentiel à la croissance des cellules cancéreuses amplifiées par HER-2 (même les lignées cellulaires résistantes au trastuzumab), mais pas à celle des autres lignées cellulaires cancéreuses (230, 235). Malgré cette association génétique et fonctionnelle, aucun lien moléculaire n'a pour l'instant été trouvé entre STARD3 et HER2. Les protéines STARD3 et HER2 sont à des endroits différents dans les cellules cancéreuses et n'interagissent pas (230). La manière dont STARD3 modifie la croissance et contribue à la résistance aux traitements ciblés des cellules cancéreuses HER2 reste inconnue. Jusqu'à présent, les études cliniques visant à mesurer l'expression de STARD3 dans le cancer suggèrent que l'expression de STARD3 marque une population de mauvais pronostic dans le cancer du sein (236, 237, 238) et dans le cancer de la prostate (239). Étant donné que HER2 et STARD3 sont toujours co-amplifiés et co-exprimés, il est peu probable que l'association de STARD3 avec un mauvais pronostic soit indépendante de l'amplification de HER2. Cependant, il semble donc que STARD3 puisse représenter une cible des cancers du sein HER2-positifs.

Par conséquent, au fil des ans, l'équipe que j'ai rejointe a travaillé sur la caractérisation de la fonction de STARD3. Initialement, ils ont établi que STARD3 appartient à la famille des protéines contenant le domaine START, un groupe de protéines ayant des propriétés de transfert de lipides (240, 241, 242). Ils ont également souligné que STARD3 était une protéine de liaison aux stéroïdes située sur la membrane limitante des endosomes tardifs, très probablement impliquée dans l'échange de

cholestérol (231, 243). Plus tard, ils ont montré que STARD3 remodelait l'architecture subcellulaire et reliait les endosomes au réticulum endoplasmique (244, 245). Le mécanisme moléculaire de cet attachement a été élucidé et repose sur l'interaction spécifique entre STARD3 et les protéines VAP (234, 244) et MOSPD2 (246).

Ensuite, l'équipe a fourni des informations mécanistiques supplémentaires sur la fonction de STARD3, soulignant qu'il module la localisation du cholestérol dans la cellule, car il peut piloter les flux de cholestérol vers le compartiment endocytaire au détriment de la membrane plasmique (234). Ces résultats suggèrent un rôle de STARD3 dans l'organisation des sous-domaines de la membrane plasmique. Parmi ces domaines, les radeaux lipidiques, qui sont enrichis en cholestérol et en glycosphingolipides, sont d'une importance capitale. Ces radeaux lipidiques regroupent des protéines, y compris des récepteurs tyrosine kinases comme les autres membres de la famille des récepteurs épidermiques humains (protéines HER) (247). Ils sont impliqués dans la régulation de processus cellulaires cruciaux, dont beaucoup sont altérés dans les cellules cancéreuses (143, 248). Dans l'ensemble, ces résultats soutiennent le modèle de travail suivant : STARD3 agit sur les cellules cancéreuses HER2 en altérant le métabolisme normal du cholestérol et en modifiant les membranes cellulaires. Plus précisément, STARD3 pourrait modifier le nombre et la composition des radeaux lipidiques et favoriser ainsi la signalisation de HER2.

2. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE CETTE THESE

Dans cette première partie, nous avons vu que le cancer du sein est une maladie hétérogène, composée de différents sous-types biologiques qui ont des comportements et des pronostics distincts. Le cancer du sein HER2+ présente des caractéristiques et des traitements spécifiques qui sont en constante évolution. Le traitement systémique néoadjuvant présente des avantages notables sous réserve d'une bonne sélection des candidates.

Nous avons aussi mis en exergue la présence de STARD3 dans le cancer du sein HER2+ et évoqué la possibilité que STARD3 pourrait constituer une vulnérabilité du cancer du sein HER2+ et *in fine* une cible thérapeutique.

Plusieurs études fonctionnelles ont montré que l'expression de STARD3 participait à la croissance des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* (235, 238, 249, 250). Cependant aucune étude dans un modèle préclinique *in vivo* n'avait été réalisée. Un de mes objectifs a été d'étudier la dépendance des cellules HER2+ pour STARD3 *in vivo*. Pour réaliser cet objectif nous avons utilisé l'imagerie par bioluminescence (BLI). La BLI est une technique optique non invasive très sensible adaptée à l'étude du suivi de la croissance des tumeurs chez le petit animal.

De manière intéressante, peu de données sont disponibles à ce jour concernant le rôle et l'impact de l'expression de STARD3 dans la prise en charge des cancers du sein. Par conséquent, l'objectif principal de cette thèse était d'évaluer l'impact clinique de l'expression de STARD3 dans le cancer du sein HER2+ chez la femme : son intérêt prédictif de la réponse au traitement systémique néoadjuvant, sa valeur pronostique,

ainsi que sa valeur diagnostique. L'objectif secondaire était d'évaluer l'impact du traitement systémique néoadjuvant sur l'expression de STARD3 ainsi que les conséquences sur le pronostic.

3. RESULTATS

3.1. Analyse préclinique de la vulnérabilité de HER2 à STARD3

3.1.1. Hypothèses

Nous avons réalisé une étude sur modèle animal de souris de la vulnérabilité des tumeurs mammaires HER2+ à STARD3. Pour cela, nous avons comparé la croissance de cellules cancéreuses mammaires exprimant STARD3 à celle de ces mêmes cellules n'exprimant pas STARD3. L'objectif était d'évaluer la différence de croissance tumorale entre les deux groupes par une méthode robuste, en émettant l'hypothèse que dans le groupe sans STARD3 la croissance devait être moins importante puisque les cellules cancéreuses HER2+ sont dépendantes en STARD3 pour la prolifération et la survie. Comme modèle cellulaire représentatif du cancer HER2+, nous avons choisi la lignée HCC1954, car elle possède une amplification de la région q12-q21 du chromosome 17 et surexprime HER2 et STARD3. De plus, l'inhibition de l'expression de STARD3 dans cette lignée compromet la clonogénicité (Figure 14, Voilquin et al., non publiée).

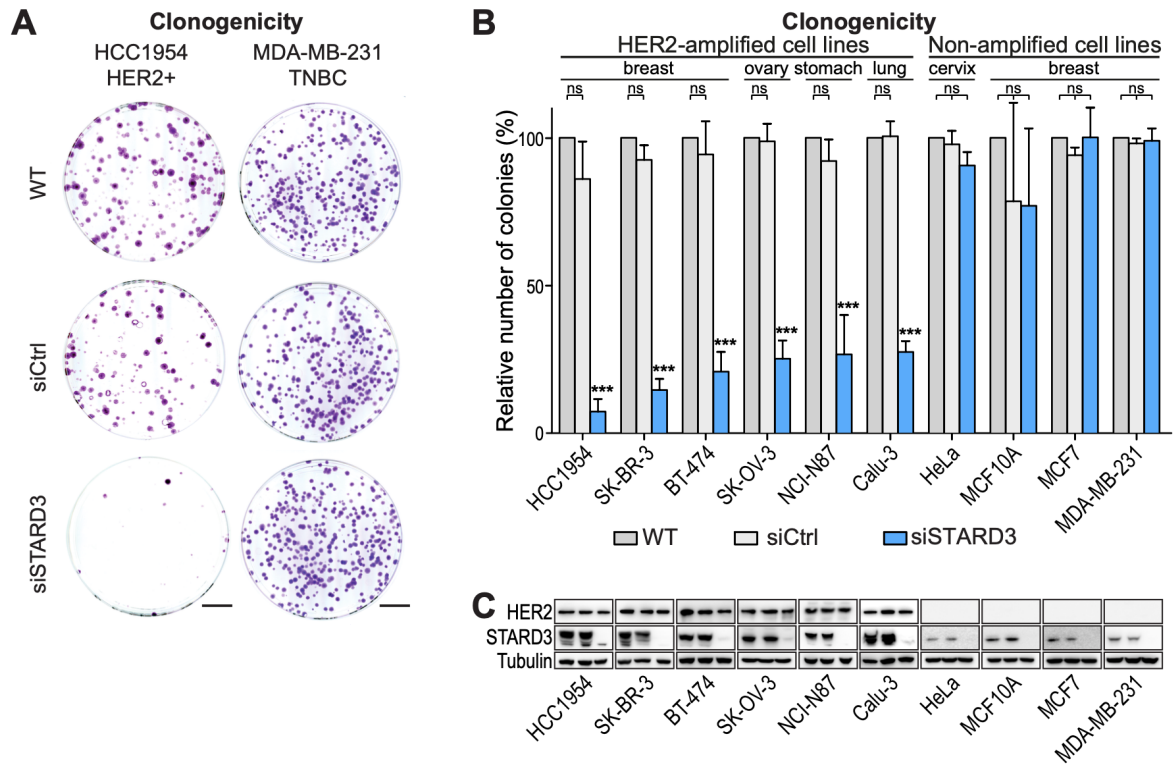


Figure 14. STARD3 est nécessaire spécifiquement pour la croissance des cellules HER2+ et non pour les cellules HER2-.

A. Test de clonogénicité des cellules HER2+ (HCC1954) et HER2- (MDA-MB-231) non transfectées (WT) et transfectées avec un siRNA de contrôle (siCtrl) et un siRNA ciblant STARD3 (siSTARD3). Après 7 jours (MDA-MB-231) ou 21 jours (HCC1954) de culture, les colonies ont été colorées au cristal violet et imagées. Des images représentatives sont présentées. Barres d'échelle : 25 mm.

*B. Quantification des tests de clonogénicité effectués sur des lignées cellulaires HER2-amplifiées (HCC1954, SK-BR-3, SK-OV-3, NCI-N87, Calu-3) et non amplifiées (HeLa, MCF10A, MCF7, MDA-MB-231). n = 3 expériences indépendantes ; moyenne ± écart-type ; *** p < 0,001, ANOVA avec test de comparaison multiple de Tukey. Les tests statistiques ont été réalisés entre WT, siCtrl et siSTARD3 pour chaque lignée cellulaire.*

C. Analyse par Western blot de l'expression de STARD3 et HER2 dans les lignées cellulaires HER2-amplifiées et non-amplifiées utilisées en B et C. La tubuline a été utilisée comme contrôle de chargement.

3.1.2. Méthodologie

Nous avons analysé 12 souris immunodéficientes (MOUSE BALB/C -NUDE FEMALE J, Charles River Laboratory, âge 6 semaines) que nous avons divisé en 2

groupes : un groupe nommé STARD3 (siSTARD3) et un groupe contrôle (siCtrl). Dans le groupe STARD3, une injection de 200.10^3 cellules cancéreuses HER2+ préalablement transfectées par un mélange de siRNA contre STARD3 a été réalisée, et dans le groupe contrôle une injection de 200.10^3 cellules cancéreuses HER2+ transfectées avec un siRNA contrôle ont été réalisées. Le site d'injection était la glande mammaire. Un suivi longitudinal sur une période de 53 jours depuis l'injection en bioluminescence a été réalisé. Les cellules cancéreuses HER2+ utilisées étaient les cellules HCC1954 exprimant de manière stable un rapporteur bioluminescent (HCC1954/Luc2).

Les animaux ont été suivis chaque semaine par imagerie bioluminescente (jusqu'à 8 semaines), à l'aide d'un système d'imagerie *in vivo* IVIS Spectrum (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). L'imagerie a été réalisée à l'Institut Clinique de la Souris (PHENOMIN-ICS) au sein de l'IGBMC. Lors de chaque imagerie, les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de D-luciférine (4 mg/souris ; Promega) dissoute dans du PBS. Cinq minutes après l'injection de luciférine, les souris ont été anesthésiées sous 2 % d'isoflurane dans une chambre d'induction. Une fois l'anesthésie adéquate atteinte, les animaux ont été transférés avec précaution sur la plateforme d'imagerie et maintenus anesthésiés à l'isoflurane dans la chambre d'induction. Les paramètres qui ont été ajustés pour contrôler le niveau du signal sont les suivants : Une région d'intérêt (ROI) standardisée au niveau du site d'injection a été réalisée pour chaque souris, ainsi qu'une ROI background pour ajuster le niveau du signal au bruit de fond. La bioluminescence, exprimée en radiance, a été quantifiée en p/s/cm²/sr et a été calculée à l'aide du logiciel Living Image version 4.5.5. 19626 (Perkin Elmer).

Nous avons comparé la différence d'intensité maximale de la radiance pour chaque tumeur en fonction de la présence de siSTARD3 ou siCtrl. Une analyse de la taille clinique des tumeurs avec un caliper a également été effectuée. Pendant la période d'étude, aucun décès n'a eu lieu. Au bout de 53 jours, les souris ont été sacrifiées en raison du volume tumoral important.

3.1.3. La croissance des tumeurs HER2+ est compromise par l'inhibition de STARD3

La Figure 15 montre la comparaison de l'intensité de signal des tumeurs HER2+ selon le groupe siSTARD3 versus siCtrl. On note que lors du suivi, l'intensité de du signal de bioluminescence du groupe contrôle exprimant STARD3 (siCtrl) est plus élevée que celle du groupe n'exprimant pas STARD3 (siSTARD3), la différence étant significative, nous pouvons conclure que chez les souris la réduction de l'expression de STARD3 par la méthode d'interférence à l'ARN compromet la croissance tumorale.

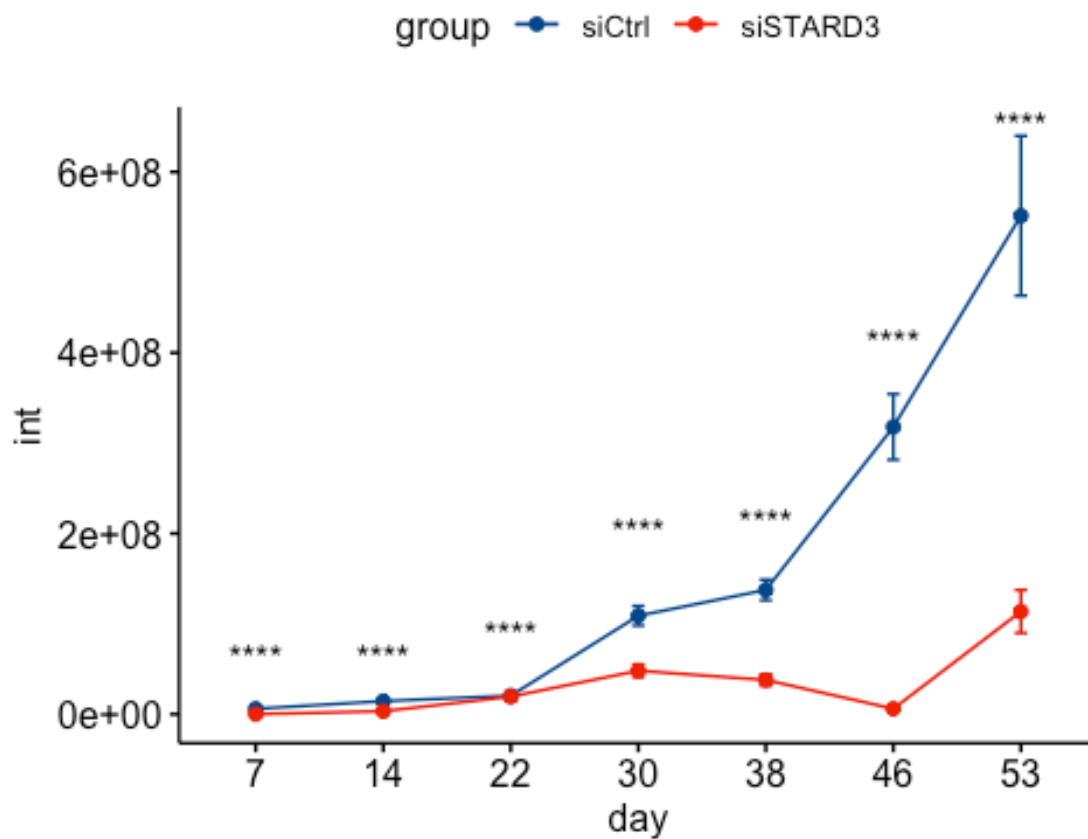


Figure 15. Analyse de la radiance des tumeurs HER2+ selon le groupe (siSTARD3/SiCtrl)

Nous avons réalisé des mesures de la taille clinique des tumeurs lorsque celles-ci étaient assez volumineuses (Figure 16). En comparant la taille en fin de protocole, on note que la taille était significativement plus importante dans le groupe siCtrl en comparaison avec le groupe siSTARD3 (3,14 mm *versus* 0,78 mm, $p = 0,035$).

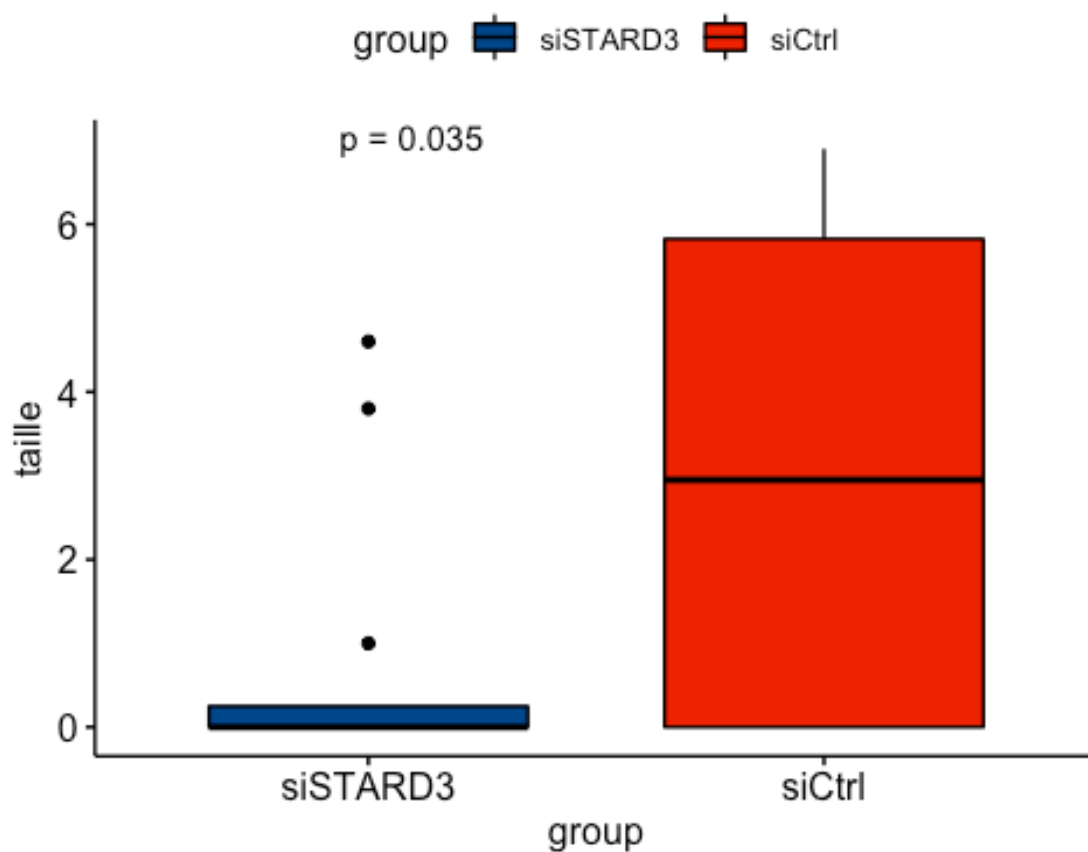


Figure 16. Comparaison de la taille clinique des tumeurs HER2+ selon le groupe siSTARD3/siCtrl

Ces données suggèrent donc que les tumeurs mammaires HER2+ sont dépendantes de STARD3 pour leur croissance.

3.2. Quantification immunohistochimique de STARD3 dans le cancer du sein HER2+

3.2.1. Constitution de la cohorte

Afin d'étudier l'expression de STARD3 en immunohistochimie, nous avons constitué une cohorte rétrospective monocentrique de patientes atteintes d'un cancer du sein HER2-positif et ayant eu une chimiothérapie néoadjuvante associée au trastuzumab. Entre 2007 et 2020, 112 patientes ont été incluses. La démarche a suivi les recommandations Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) (251). La sélection des patientes est décrite dans l'article : Lodi M, Voilquin L, Alpy F, Molière S, Reix N, Mathelin C, Chenard M-P, Tomasetto C-L. STARD3: A New Biomarker in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers*. 2023; 15(2):362. <https://doi.org/10.3390/cancers15020362> ; ainsi que dans le diagramme de flux suivant (Figure 17).

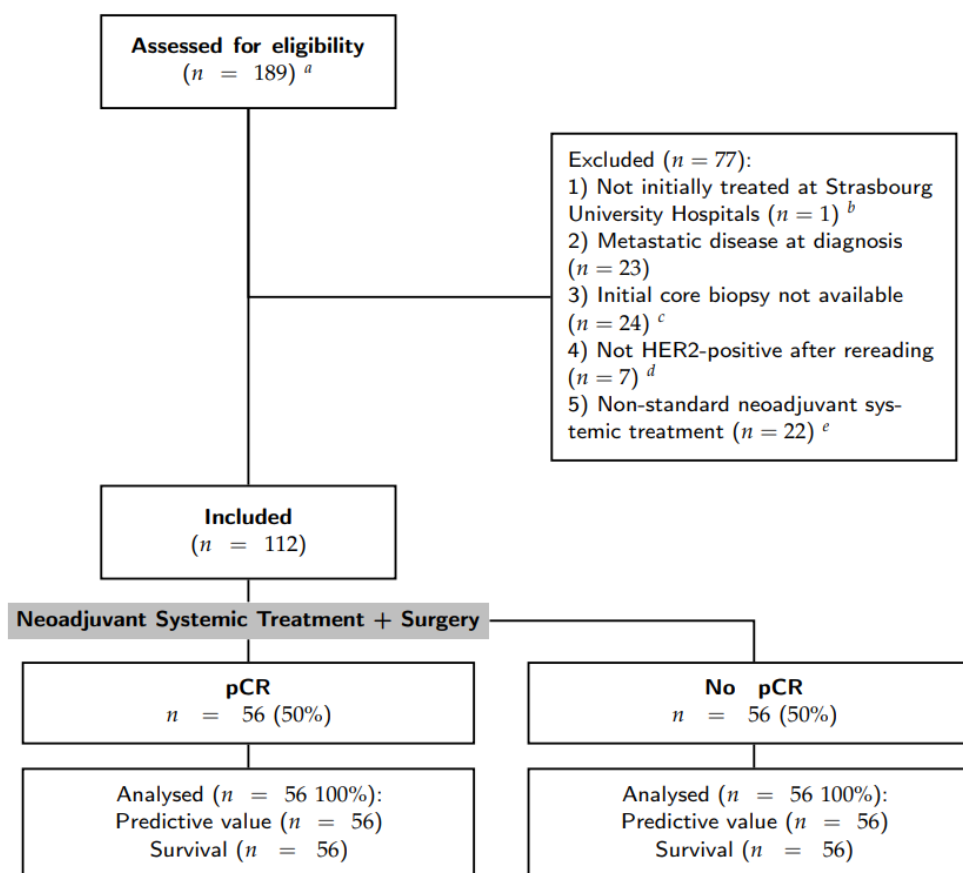


Figure 17. Diagramme de flux de la constitution de la cohorte.

^a La requête initiale concernait tous les cas de cancer du sein HER2+ traités par chirurgie ; ^b Une patiente a été exclue car il s'agissait d'une relecture demandée par un autre centre de pathologie ; ^c certaines microbiopsies initiales étaient archivées dans d'autres laboratoires de pathologie, et malgré que les requêtes leur aient été adressées à 3 reprises, certains prélèvements n'ont pas pu être rapatriés pour les analyses, ou bien il n'y avait plus assez de matériel pour réaliser des nouvelles analyses ; ^d soit un score HER2 0-1 ou 2+ avec une SISH non amplifiée ; ^e sans anthracyclines et/ou avec pertuzumab

3.2.2. Déclarations éthiques

Les tumeurs humaines de cancer du sein proviennent de la tumorothèque du Centre de Ressources Biologiques des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (numéro 1970 390 v0).

La partie clinique de cette recherche a été menée sur une cohorte nommée SENOMETRY (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02810093), qui a reçu l'avis

favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) Est IV en 2016 et le Comité d'éthique des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Le fichier informatique du CRB a été déclaré à la Commission Nationale Informatique et Liberté, sous le numéro 1187586. Les échantillons et les données médicales associées ont été rendus anonymes, ce qui permet de les traiter automatiquement à des fins de recherche.

3.2.3. Développement de la technique d'immunohistochimie

Nous avons désarchivé deux blocs de paraffine pour chaque patiente : la microbiopsie initiale et la pièce tumorale. Chaque bloc a été découpé à l'aide d'un microtome, produisant des lames de 4 µm qui ont été déparaffinées et identifiées. Ensuite, nous avons réalisé une coloration immunohistochimique automatisée (BenchMark Ultra, Ventana, Roche). Pour le marquage STARD3, nous avons utilisé l'anticorps primaire anti-STARD3 3G11 (anticorps monoclonal de souris, IGBMC) à une dilution au 1/500 appliquée pendant 32 min à 36°C. Ces anticorps anti-STARD3 ont été développés dans le cadre d'un projet antérieur (données non publiées). La description détaillée de la méthodologie d'immunohistochimie de STARD3 est détaillée ci-dessous.

L'analyse immunohistochimique a été effectuée « à l'aveugle » car les lecteurs (Pr. Marie-Pierre Chenard et moi-même) ne connaissaient pas la réponse au TSN. De plus, les lames HER2 ont été relues pour chaque cas afin de confirmer la positivité 3+.

3.2.3.1. Désarchivage des blocs de pathologie et traitement initial

Nous avons désarchivé deux blocs pour chaque patiente (la biopsie initiale et la pièce tumorale) à partir des archives de pathologie situées à l'Hôpital Civil de Strasbourg. Lors du prélèvement initial, chaque spécimen de cancer a été fixé dans du formaldéhyde 4% [Formaldéhyde 4% tamponné à pH 6,9, Réactifs Carlo Erba] puis déshydraté par l'utilisation de plusieurs bains en série contenant de l'éthanol puis du xylène. Enfin, le spécimen a été enrobé en bloc de paraffine par un automate. S'agissant d'une étude rétrospective, aucune de ces étapes précédentes n'a été réalisée dans le cadre de cette étude.

3.2.3.2. Microtomie

Chaque bloc est découpé à l'aide d'un microtome. Le bloc est refroidi sur une plaque réfrigérée (-15°C) puis placé sur le porte-bloc du microtome (Figure 18A). La lame coupe des tranches de 4 µm à chaque passage sur le bloc, produisant un ruban constitué de plusieurs tranches. Le ruban est ensuite placé en flottaison dans un bain d'eau chaude (40°C), ce qui permet de lisser le ruban. Ensuite, le ruban est soulevé de l'eau à l'aide d'une lame de verre placée en dessous. Les lames de verre utilisées ont une charge positive [VWR SuperFrost® Plus] afin d'améliorer l'adhérence avec le ruban de tissu, chargé négativement. Chaque lame est identifiée par un code-barres et une identification de l'échantillon et du protocole. Ensuite, les lames sont placées dans un four à tissus à 55°C pendant 1 heure pour commencer la déparaffinisation, qui sera complétée dans l'automate.



A

Paraffin block in the block holder

Microtome blade



B



C



D

Slide stage (heated)

Figure 18. Matériel et automates utilisés pour le protocole d'immunohistochimie (A) microtome et (B) automate d'immunohistochimie, avec les cassettes pour les lames (C) et les kits de détection (D) comprenant : 1 = inhibiteur (H₂O₂), 2 = multimère HRP, 3 = chromogène (DAB), 4 = substrat (H₂O₂), 5 = cuivre and 6 = contre-coloration (Hematoxylin II)

3.2.3.3. *Système automatisé de coloration des lames IHC STARD3*

Le système automatisé de coloration des lames IHC BenchMark Ultra (Figure 18B, Ventana, Roche) et le kit de détection DAB UltraView Universal (Ventana, Roche) sont utilisés pour l'ensemble du protocole (Figure 18D). Les lames sont placées à des étapes appropriées (Figure 18C) dans l'automate. La première étape est la déparaffinisation en chauffant les lames à 72°C puis en les lavant quatre fois avec la solution EZ Prep™ 1x (950-102, Ventana). A partir de cette étape, et plusieurs fois durant tout le protocole, de l'huile de paraffine est appliquée sur la lame pour protéger la couche aqueuse de la lame de l'évaporation.

Ensuite, un prétraitement est nécessaire pour la récupération des antigènes. Cette étape consiste à réduire les liaisons disulfuriques par l'association du chauffage à 95°C et de la solution Cell Conditioning 1™ (CC1, Ventana, Roche). Le protocole standard de 64 minutes est choisi pour notre étude. A la fin du prétraitement, les lames sont chauffées à 36°C jusqu'à la fin de l'ensemble du protocole. Les lames sont lavées 3 fois avec le tampon de réaction.

L'étape suivante est l'inhibition des enzymes endogènes. Les peroxydases endogènes sont inhibées par du H₂O₂ contenu dans UltraView Inhibitor™ (Ventana, Roche) appliqué pendant 4 minutes. Les lames sont lavées 2 fois avec le tampon de réaction.

Ensuite, l'anticorps primaire anti-STARD3 3G11 (anticorps monoclonal de souris, IGBMC) à une dilution de 1/500 est appliqué pendant 32 min à 36°C. Initialement, différents anticorps anti-STARD3 et différentes dilutions ont été testés à cette étape

afin de choisir la meilleure situation expérimentale. Les lames sont lavées 2 fois avec le tampon de réaction.

Ensuite, de l'UltraView HRP Multimer™ (Ventana, Roche) est placé sur les lames pendant 8 minutes à 36°C. Cette solution multimère contient des anticorps secondaires anti-souris couplés à la peroxydase de raifort (HRP) par un multimère sans couplage biotine-avidine. Les lames sont lavées 3 fois avec le tampon de réaction.

À ce stade, les solutions UltraView DAB™ et DAB H2O2™ (Ventana, Roche) sont appliquées sur les lames pendant 8 minutes à 36°C. Ces solutions contiennent le substrat 3,3'-diaminobenzidine (DAB) et de l'H2O2. Le DAB est oxydé par le HRP en présence de l'H2O2, ce qui entraîne le dépôt d'un précipité brun sur le site de l'activité enzymatique. Les lames sont lavées une fois avec le tampon de réaction.

Plus tard, la solution UltraView Copper™ (Ventana, Roche) contenant du Cu²⁺ est appliquée, assombrissant le signal DAB brun orangé en brun noirâtre, plus facile à lire. Les lames sont lavées une fois avec le tampon de réaction.

Enfin, une contre-coloration avec de l'hématoxyline II (Ventana, Roche) pendant 8 minutes est effectuée. Les lames sont lavées 3 fois et le protocole complet est terminé. L'option "Ultra-Wash" - qui consiste à effectuer plus de lavages que le protocole standard - a été ajoutée à l'ensemble du protocole afin de réduire le bruit de fond.

3.2.3.4. Post-traitement

Les lames sont retirées de l'automate et lavées avec du liquide vaisselle pour éliminer l'huile de paraffine. Ensuite, les lames sont déshydratées sous la hotte par

l'utilisation de 3 bains en série, le 1^{er} contenant de l'éthanol à 100% puis 2 bains de xylène à 100%, 2 à 5 minutes chacun. Les lames sont montées avec la machine Cover Tech Microm CTM6 (Thermo Scientific) en utilisant le milieu de séchage rapide Pertex® pour le montage (Histolab) et des lamelles de 24x50 mm (Mezel-Glöser).

3.2.3.5. *Lecture et sauvegarde des lames*

Chaque lame a été lue en microscopie optique à fond clair dans le laboratoire de pathologie sous la supervision du Professeur M.P. Chenard. Les lames ont été scannées avec le NanoZoomer-XR (Hamamatsu) en utilisant le système "whole slide imaging".

3.2.4. Étude de l'expression de STARD3 en immunohistochimie

Afin d'étudier l'expression de STARD3 par immunohistochimie, nous avons commencé par explorer différents paramètres séparément : l'intensité, le pourcentage de cellules positives, le motif et la distribution du signal. Les différentes données sur les microbiopsies initiales (n = 112) et sur les pièces opératoires où persistaient des cellules tumorales (n = 61) sont résumées dans le Tableau IX.

Tableau IX. Paramètres immunohistochimiques de STARD3.

	Paramètre immunohistochimique de SARD3	Valeur
Microbiopsie initiale (n = 112)	Intensité	
	Moyenne (ET)	2.13 (0.90)
	Intervalle	0 – 3
	Nombre de cellules positives	
	Moyenne (ET)	90.3 (28.8)
	Intervalle	0 – 100
	Distribution du signal	
	Absent	8 (7.1%)
	Diffus	93 (83.0%)
	Marginalisé	11 (9.8%)
Pièce opératoire (n = 61)	Granularité du signal	
	Non	15 (13.4%)
	Oui	97 (86.6%)
	Intensité	
	Moyenne (ET)	1.60 (0.78)
	Intervalle	0 – 3
	Nombre de cellules positives (%)	
	Moyenne (ET)	87.6 (31.3)
	Intervalle	0 – 100
	Distribution du signal	
Absent	5 (9.8%)	
Diffus	35 (68.6%)	
Marginalisé	11 (21.6%)	
Pièce opératoire (n = 61)	Granularité du signal	
	Non	14 (27.5%)
	Oui	37 (72.5%)

ET = écart-type

3.2.4.1. L'intensité du signal STARD3

Tout d'abord, nous avons étudié l'intensité STARD3 en utilisant une classification des intensités de 0 à 3+, similaire à celle utilisée actuellement pour HER2. La Figure 19 décrit la distribution de l'intensité du signal STARD3 dans les microbiopsies initiales et les pièces opératoires. L'intensité était de 2,13 en moyenne pour les microbiopsies et

1,60 pour les pièces opératoires.

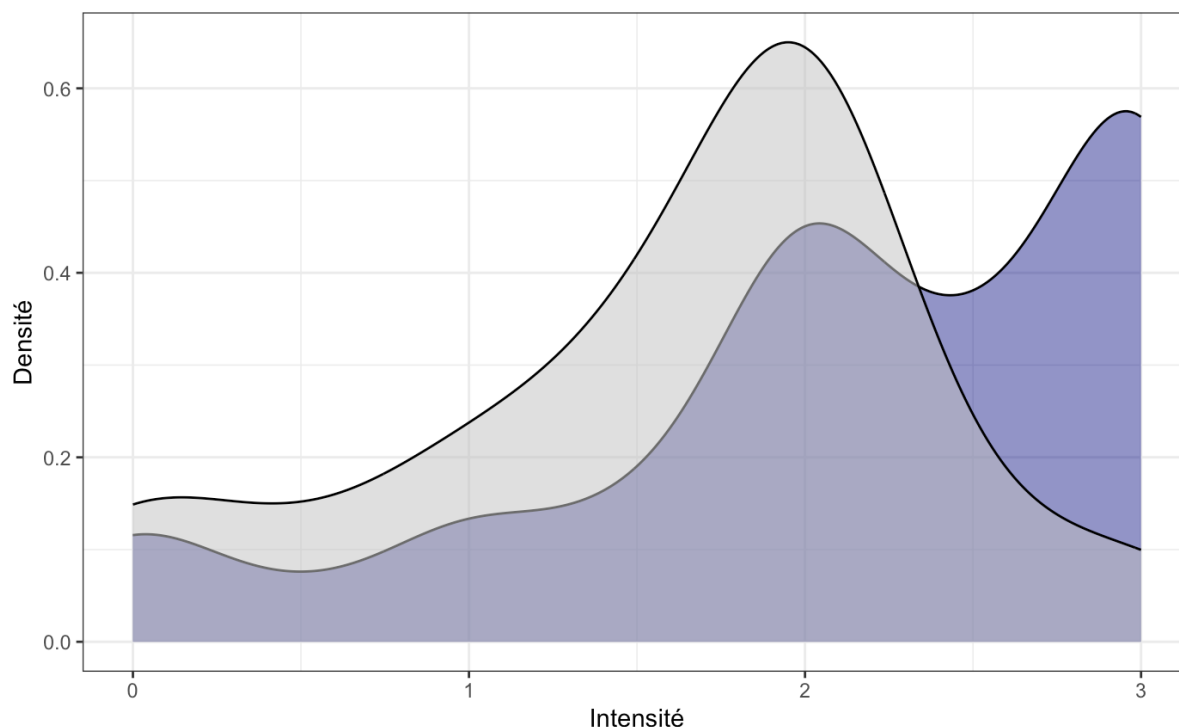


Figure 19. Distribution de l'intensité du signal STARD3 dans les microbiopsies initiales (bleu) et pièces opératoires (gris)

3.2.4.2. Le pourcentage de cellules cancéreuses STARD3-positives

Comme l'hétérogénéité intra-tumorale est une caractéristique importante des cancers du sein HER2+, nous avons ensuite évalué le pourcentage de cellules cancéreuses positives pour le STARD3 (Figure 20). Dans cette cohorte, nous avons observé une surexpression homogène de STARD3 dans toutes les cellules de la majorité des tumeurs sans hétérogénéité intra-tumorale. Sur les microbiopsies initiales, la grande majorité des tumeurs étaient positives pour STARD3 dans l'ensemble de la tumeur (n = 100 ; 89,2%), les tumeurs négatives de manière homogène étaient plus rares (n = 8 ; 7,1%), et 4 cas étaient effectivement hétérogènes (3,6%). Cette distribution était similaire pour les pièces opératoires, avec 3 cas hétérogènes (4,9%).

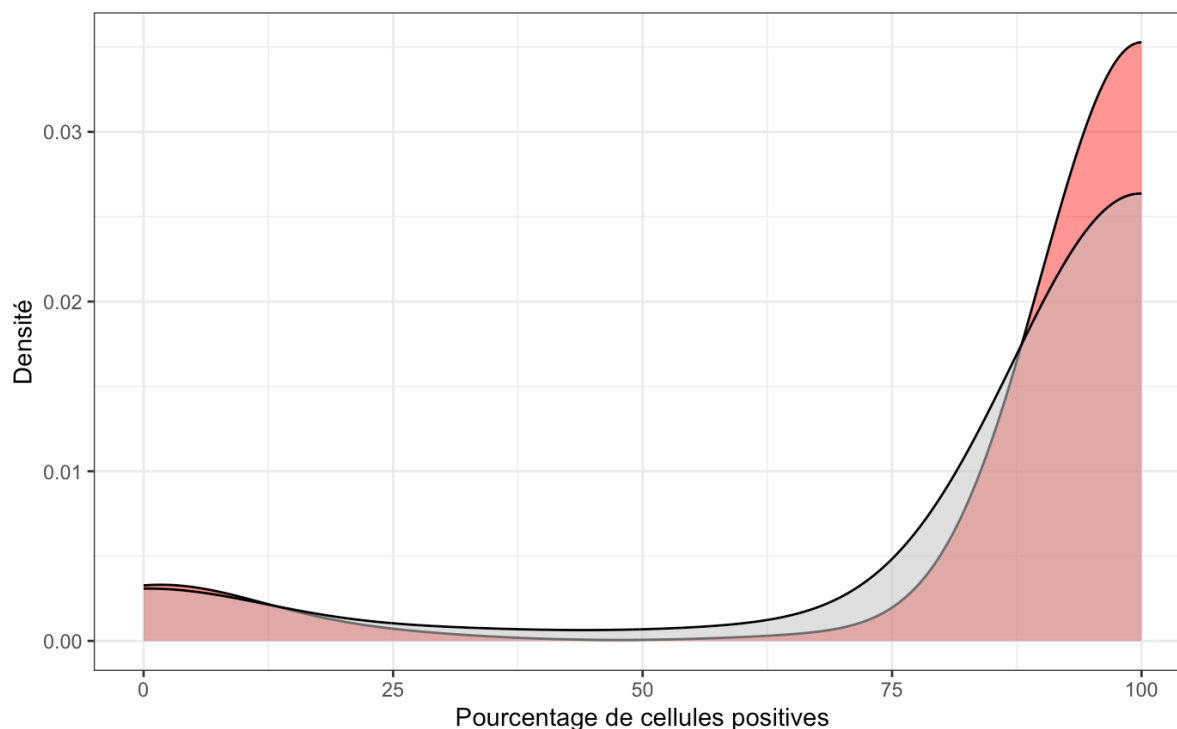


Figure 20. Distribution du pourcentage de cellules positives pour STARD3 dans les microbiopsies initiales (rouge) et dans les pièces opératoires (gris).

3.2.4.3. *Le motif et de la distribution du signal STARD3*

En immunohistochimie, STARD3 était principalement détecté sous la forme de points intracytoplasmiques (Figure 21C). Ces points, ou « grains », étaient parfois volumineux et parfois fins, et des associations de différentes tailles de « grains » étaient également observées. STARD3 est une protéine endosomale capable de créer des sites de contact entre le réticulum endoplasmique et les endosomes (244). De plus, ces contacts sont impliqués dans l'accumulation de cholestérol dans les endosomes et dans la réduction du cholestérol au niveau de la membrane plasmique (234). Il a été démontré que cette fonction cellulaire spécifique était liée à la localisation endosomale de STARD3. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce signal granulaire de STARD3 correspond à sa présence sur les endosomes qui sont des vésicules cytoplasmiques.

A l'inverse, certaines tumeurs avaient un signal non granulaire, soit entièrement négatif (Figure 21A), soit sous la forme d'un marquage flou diffus dans l'ensemble du cytoplasme (Figure 21D).

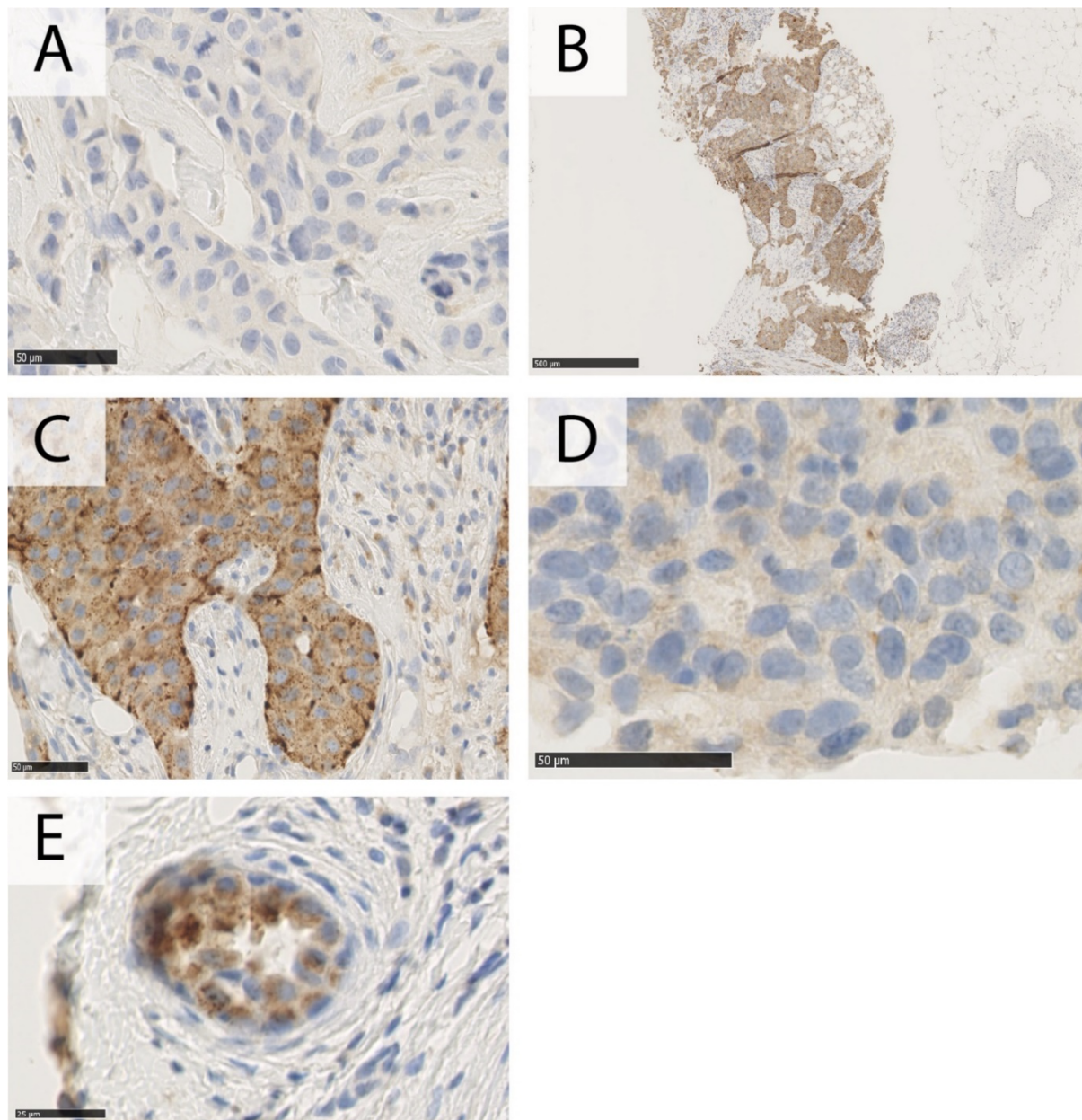


Figure 21. Motifs du signal de STARD3 en immunohistochimie

Cette figure regroupe différentes photographies de colorations immunohistochimiques de STARD3 (anticorps 3G11, 1/500 + UltraWash®). (A) un signal négatif ; (B) Signal d'intensité 3+ ; (C) Signal ponctiforme (score positif) ; (D) Signal diffus et de faible intensité (score négatif) ; (E) Néoplasie canalaire in situ STARD3-positives

3.2.4.4. Localisation de STARD3 dans le carcinome canalaire *in situ*

L'amplification du locus HER2 n'est pas spécifique du carcinome invasif. De nombreuses études ont rapporté que les carcinomes canauxaires *in situ* (CCIS) présentent une amplification et une surexpression de HER2 (252). En particulier, une étude sur les DCIS purs a montré une co-amplification et une co-expression avec HER2 de plusieurs gènes voisins dont STARD3 et GRB7 (253). La présence de lésions *in situ* associées aux carcinomes infiltrant étant fréquente, nous avons recherché l'expression de STARD3 dans les composants *in situ* et invasifs des tumeurs de notre série. Nous avons trouvé 56 CCIS associés dans la série, ce qui représente environ la moitié des échantillons. De manière intéressante, les CCIS présentaient une expression de STARD3 (Figure 21E). Le niveau d'expression de STARD3 était identique dans les composantes invasives et *in situ* des tumeurs ; 52 cas de CCIS étaient STARD3-positifs et 4 étaient STARD3-négatifs.

En conclusion, la mise au point de la technique d'immunohistochimie nous a permis de quantifier l'expression de la protéine STARD3 dans les tumeurs mammaires humaines HER2+. Ces premières analyses nous ont permis d'évaluer par la suite l'impact de l'expression de STARD3 sur la réponse histologique complète, sur le pronostic et sur la capacité à discriminer les amplifications des non amplifications d'HER2.

3.3. Développement du score STARD3

3.3.1. Comparaison de l'expression de STARD3 selon la réponse complète histologique

Afin d'étudier quels paramètres de l'expression de STARD3 pourraient être les plus significatifs sur la prédiction de la pCR, nous avons tout d'abord comparé les différences entre les groupes « pCR » et « absence de pCR ».

Tableau X. Comparaison des caractéristiques de l'expression de STARD3 selon la réponse histologique

	Absence de pCR (N=56)	de pCR (N=56)	Total (N=112)	P-valeur	
				UV	MV
Cellules positives (%)					
Moyenne (ET)	83.750 (36.260)	96.875 (16.557)	90.312 (28.823)	0.015	0.308
Intervalle	0.000 - 100.000	0.000 - 100.000	0.000 - 100.000		
Intensité					
Moyenne (ET)	1.991 (0.979)	2.277 (0.797)	2.134 (0.900)	0.093	0.592
Intervalle	0.000 - 3.000	0.000 - 3.000	0.000 - 3.000		
Distribution					
Absent	7 (12.5%)	1 (1.8%)	8 (7.1%)	0.088	0.857*
Diffus	44 (78.6%)	49 (87.5%)	93 (83.0%)		
Marginalisation	5 (8.9%)	6 (10.7%)	11 (9.8%)		
Signal granulaire					
Non	12 (21.4%)	3 (5.4%)	15 (13.4%)	0.013	0.227
Oui	44 (78.6%)	53 (94.6%)	97 (86.6%)		

*Légende : pCR = réponse histologique complète ; ET = écart-type ; UV et MV = uni- et multi-varié ; * : comparaison de la catégorie « marginalisation » versus les autres*

Dans le Tableau X, on note que le pourcentage de cellules positives et le signal granulaire sont associés avec la présence d'une pCR, toutefois l'analyse multivariée ne nous permet pas d'affirmer qu'il s'agit de caractéristiques indépendantes des autres paramètres. Par conséquent, nous avons voulu étudier par différentes approches pour

établir un score immunohistochimique qui privilégie performances et simplicité d'utilisation.

3.3.2. Classifications supervisées par différents modèles de machine learning à partir des paramètres immunohistochimiques de STARD3

3.3.2.1. *Méthodologie*

Nous avons développé et testé différents modèles prédictifs à l'aide du logiciel Orange Data Mining (version 3.32.0). La Figure 22 résume le processus de développement et évaluation des différents modèles.

Dans une première partie, nous avons sélectionné uniquement les paramètres immunohistochimiques de l'expression de STARD3 sur les microbiopsies initiales :

- Le nombre de cellules positives (variable continue ; 0-100)
- L'intensité du signal (variable continue ; 0-3)
- La distribution du signal (variable catégorique ; absent, diffus, marginalisé)
- Le signal granulaire (variable binaire)
- L'aspect du signal granulaire (variable catégorique ; absent, flou, grains fins, gros grains, grains mixtes fins et gros)

Ensuite, nous avons intégré les autres paramètres cliniques et pathologiques disponibles au diagnostic afin d'étudier si un score combiné pouvait améliorer les performances :

- Age
- Grade tumoral

- Expression des récepteurs hormonaux (H-scores)
- Ki67
- Stade TNM initial
- Sous-type histologique
- Unifocalité

Dans chaque situation, nous avons développé différents modèles basés sur les algorithmes suivants :

- Régression logistique : régularisation LASSO (L1), $C = 0,020$
- Random forest : nombre d'arbres = 1000 ; limite des sous-catégories = 5
- k Nearest Neighbors (kNN) : nombre de voisins = 5 ; métrique euclidienne ; poids uniforme
- Bayes naïf
- Gradient Boosting : méthode scikit-learn ; nombre d'arbres = 100 ; limite des sous-catégories = 2 ; taux d'apprentissage = 0,100
- Réseau neuronal : nombre de neurones dans les couches cachées = 100 ; fonction d'activation = ReLu (Rectified Linear Unit) ; algorithme d'optimisation stochastique = Adam ; $\alpha = 0,0001$; nombre maximal d'itérations = 200.

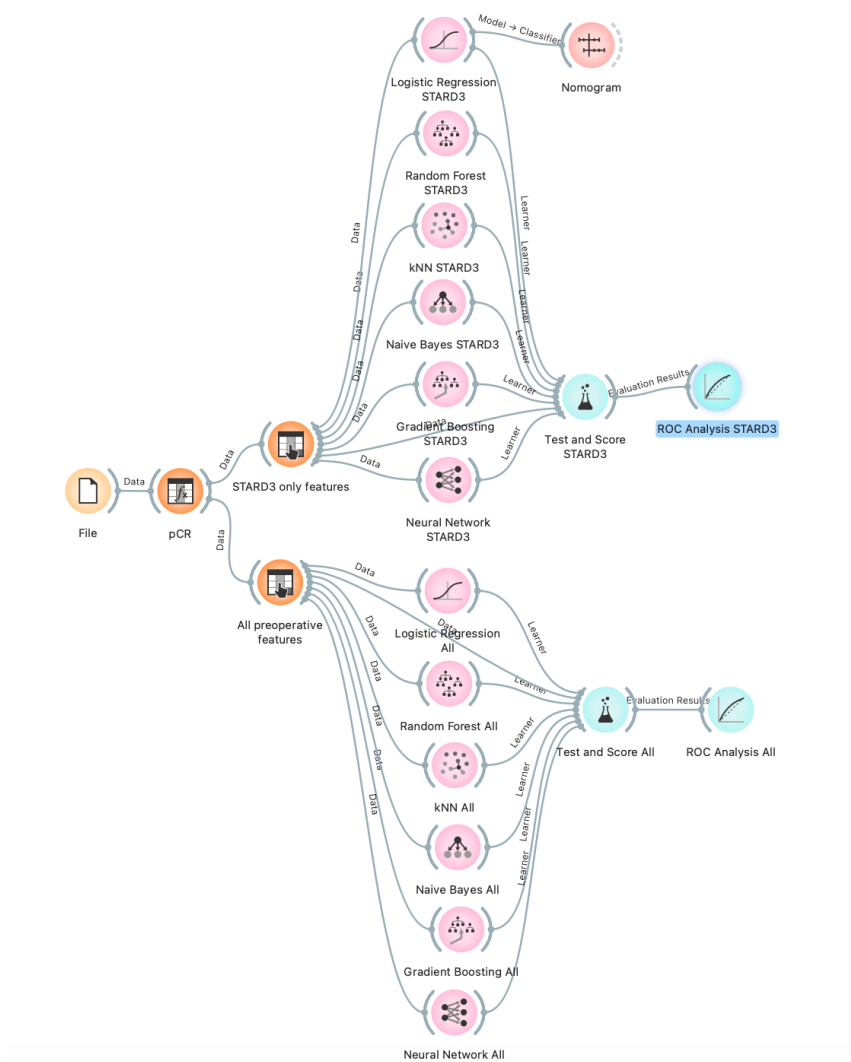


Figure 22. Workflow du développement des modèles prédictifs

Légende : pCR = pathological Complete Response (réponse histologique complète) ; kNN = k-Nearest Neighbors ; ROC = Receiver Operating Characteristic

3.3.2.2. Résultats

Le Tableau XI résume les performances des différents modèles qui se basent uniquement sur les paramètres immunohistochimiques de STARD3. On note que les aires sous les courbes allaient de 49,3% (régression logistique) à 64,2% (kNN). Le modèle kNN était celui avec les meilleures performances (F1-score 66,6% ; moyenne harmonique entre la précision [valeur prédictive positive] et le « recall » ou sensibilité).

Tableau XI. Performances des modèles prédictifs basés uniquement sur les paramètres immunohistochimiques de STARD3

Modèle	AUC	F1-score	Précision	Sensibilité	Spécificité
kNN STARD3	0,642	0,666	0,676	0,670	0,670
Random Forest STARD3	0,627	0,633	0,635	0,634	0,634
Neural Network	0,607	0,538	0,547	0,545	0,545
Gradient Boosting STARD3	0,600	0,597	0,600	0,598	0,598
Naive Bayes STARD3	0,556	0,508	0,585	0,554	0,554
Logistic Regression STARD3	0,493	0,333	0,250	0,500	0,500

Légende : AUC = aire sous la courbe ; F1-score = moyenne harmonique de la précision (valeur prédictive positive) et de la sensibilité

Lorsqu'on intègre les différents paramètres cliniques et pathologiques initiaux supplémentaires, on note que les performances prédictives sont meilleures (Tableau XII). Le modèle le plus performant dans cette série est celui basé sur l'algorithme des forêts aléatoires, avec une AUC à 74,2% et un F1-score à 63,7%.

Tableau XII. Performances des modèles prédictifs basés sur les paramètres immunohistochimiques de STARD3 et les autres caractéristiques clinico-pathologiques initiales

Modèle	AUC	F1-score	Précision	Sensibilité	Spécificité
Random Forest All	0,742	0,637	0,632	0,643	0,625
Gradient Boosting All	0,742	0,667	0,692	0,643	0,714
Logistic Regression All	0,714	0,643	0,643	0,643	0,643
Naive Bayes All	0,692	0,617	0,647	0,589	0,679
kNN	0,612	0,610	0,581	0,643	0,536
Neural Network	0,583	0,564	0,541	0,589	0,500

Légende : AUC = aire sous la courbe ; F1-score = moyenne harmonique de la précision (valeur prédictive positive) et de la sensibilité

Bien que les performances des différents modèles soient correctes (notamment en

cas d'intégration de l'ensemble des caractéristiques cliniques et pathologiques initiales), l'utilisation de ce type d'algorithmes n'est pas facile d'utilisation en pratique courante et la complexité des différents modèles rend l'explication du poids des différents facteurs difficile et peu intuitive. Par conséquent, nous avons voulu analyser si d'autres approches plus simples et tout aussi performantes existaient.

3.3.3. Classification non supervisée par machine learning à partir des paramètres immunohistochimiques de STARD3

3.3.3.1. *Méthodologie*

Afin d'identifier des groupes homogènes d'expression de STARD3, nous avons réalisé une classification non supervisée selon la méthode hiérarchique agglomérative à l'aide du logiciel R et des bibliothèques *cluster* et *factoextra*. Dans cette méthode, chaque observation est affectée à son propre cluster. Ensuite, la similarité (ou la distance) entre chaque cluster est calculée et les deux clusters les plus similaires sont fusionnés en un seul. Afin de calculer la distance entre les différentes observations, plusieurs méthodes existent, dans cette analyse nous avons utilisé la méthode de Ward qui minimise la variance intra-cluster et qui a donné les meilleures performances (coefficient agglomératif de 0,9964237 versus 0,9872295 pour les autres méthodes). Ensuite, nous avons testé différents nombres de clusters déterminés par l'algorithme avec la mesure du taux de réponse complète dans chaque cluster, afin d'identifier des sous-groupes spécifiques.

3.3.3.2. *Résultats*

Lorsque l'algorithme divisait la cohorte en clusters, les performances n'étaient pas satisfaisantes (résultats non décrits). A l'inverse, lors de la division en 15 clusters différents, l'interprétation devenait trop compliquée et pas assez intuitive. Nous avons retenu une classification en 10 clusters distincts présentée dans le Tableau XIII.

Tableau XIII. Distribution en 10 clusters lors de l'analyse non supervisée

Cluster	Signal granulaire	Intensité moyenne	Distribution diffuse	Distribution marginalisée	Cellules positives	Taux de pCR
3	Oui	1.2	Oui	Non	100%	88,9%
4	Oui	1.9	Non	Oui	96%	66,7%
1	Oui	3.0	Oui	Non	100%	61,6%
8	Non	0.5	Oui	Non	17%	50,0%
2	Oui	2.0	Oui	Non	100%	39,1%
7	Oui	2.5	Oui	Non	100%	37,5%
6	Non	1.0	Oui	Non	100%	33,3%
9	Non	0.0	Non	Non	0%	12,5%
5	Oui	2.0	Oui	Non	10%	0,0%
10	Non	1.0	Non	Oui	100%	0,0%

Légende : pCR = pathological complete response

Les 3 groupes avec le meilleur taux de réponse (61-89%) étaient ceux ayant un :

- Signal granulaire diffus de faible intensité [cluster #3]
- Signal granulaire marginalisé (toute intensité confondue) [cluster #4]
- Signal granulaire diffus de forte intensité [cluster #1]

Les 3 groupes avec le taux de réponse le plus faible (0-12,5%) étaient les suivants :

- Signal absent [cluster #9]
- Signal granulaire diffus mais hétérogène au niveau tumoral [cluster #5]
- Signal non granulaire marginalisé de faible intensité [cluster #10]

Au total, en analyse non supervisée, le signal granulaire traduisait un bon taux

de réponse sauf en cas de tumeur hétérogène avec faible contingent STARD3+. Le signal granulaire diffus de faible intensité semblait meilleur que celui de forte intensité. La marginalisation du signal soit vers le noyau soit vers la membrane plasmique semblait être associée à une bonne réponse uniquement si le signal était granulaire. Les tumeurs STARD3 négatives complètes avaient des mauvaises réponses au TSN. En raison de la difficulté à établir un score simple d'utilisation à partir des groupes précédemment identifiés, le choix du critère binaire "signal granulaire ou non" demeurait le meilleur compromis entre performances et simplicité d'utilisation.

3.3.4. Étude du poids des paramètres immunohistochimiques de STARD3

3.3.4.1. *Methodologie*

Afin d'évaluer le poids de chaque paramètre du score STARD3 dans la prédiction de la réponse complète, nous avons réalisé une régression logistique. La variable d'intérêt était la pCR qui est binaire (oui/non). Les variables explicatives de STARD3 étaient les suivantes :

- Intensité : continue (0-3) ou binaire (≥ 2)
- Signal granulaire : binaire (oui/non)
- Distribution : catégorique (absente / marginale / diffuse)
- Taux de cellules positives : continue (0-100) et son corollaire l'hétérogénéité tumorale définie comme un taux $< 80\%$
- Cluster de l'analyse non supervisée (cf. supra)

Nous avons réalisé différents modèles qui comprenaient une ou plusieurs variables

explicatives

3.3.4.2. Comparaison des modèles

Les meilleurs modèles sont définis par l'AIC (Akaike information criterion) et le BIC (Bayesian Information Criterion) les plus bas, ce qui équivaut à la vraisemblance la plus élevée. En comparant les différents modèles, nous pouvons observer que le score obtenu à partir de l'analyse non supervisée de hiérarchisation est légèrement meilleur que celui avec la granularité uniquement. Toutefois, en raison de la simplicité d'utilisation de la catégorisation en signal granulaire ou pas en pratique clinique, ce dernier semble être le meilleur compromis pour définir la positivité pour STARD3.

Tableau XIV. Comparaison des modèles de régression logistique du score immunohistochimique STARD3

Paramètres	Place	AIC	BIC
Granularité (seule)	2	154.6	162.8
Cluster (haut/bas risqué, binaire)	2	146.1	154.2
Cluster de l'analyse non supervisée (cluster individuel)	5	146.0	162.0
Granularité + Intensité ≥ 2 + Distribution diffuse + Hétérogénéité	5	155.0	171.3
Granularité + Intensité (continue) + Distribution marginalisée + Hétérogénéité	6	160.9	180.0
Granularité + Intensité ≥ 2 + Distribution + Hétérogénéité	6	155.8	174.8
Intensité = 3 + Granulaire + Distribution + Hétérogénéité	6	161.2	180.3

Légende : AIC = Akaike information criterion ; BIC = Bayesian Information Criterion

3.3.4.3. Pondération des variables dans la régression logistique

Dans le modèle qui comporte uniquement le signal granulaire comme variable

explicative pour la réponse complète, la probabilité d'une réponse complète est 4.18x supérieure qu'en cas de signal non granulaire, et ceci de manière statistiquement significative ($p = 0.002$)

3.3.5. Conclusion sur le score STARD3

Après cette recherche extensive d'une approche à la fois simple et performante pour prédire la réponse histologique complète selon l'expression de STARD3, on retient que le signal granulaire à lui tout seul présente le meilleur rapport et le plus d'intérêt. Par conséquent, dans les parties suivantes de cette thèse c'est ce paramètre qui a été retenu pour constituer le score STARD3.

3.4. STARD3 : un nouveau biomarqueur dans le cancer du sein HER2-positif

L'article suivant décrit les résultats les différentes parties des résultats ci-dessous : Lodi M, Voilquin L, Alpy F, Molière S, Reix N, Mathelin C, Chenard M-P, Tomasetto C-L. STARD3: A New Biomarker in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers*. 2023; 15(2):362. <https://doi.org/10.3390/cancers15020362>

3.4.1. Corrélation entre l'amplification et l'expression de HER2 et STARD3 par analyse des banques de données publiques






3.4.2. Valeur prédictive de STARD3 sur la réponse histologique complète

3.4.3. Valeur pronostique de STARD3

3.4.4. Impact du traitement systémique néoadjuvant sur l'expression de STARD3

Article

STARD3: A New Biomarker in HER2-Positive Breast Cancer

Massimo Lodi ^{1,2,3} , Laetitia Voilquin ³, Fabien Alpy ³ , Sébastien Molière ^{1,2,3} , Nathalie Reix ¹, Carole Mathelin ^{1,2,3} , Marie-Pierrette Chenard ¹ and Catherine-Laure Tomasetto ^{3,*} 

¹ Department of Pathology, Strasbourg University Hospital, 67200 Strasbourg, France

² Surgical Oncology Department, Institut de cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), 17 Rue Albert Calmette, 67200 Strasbourg, France

³ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS UMR7104, INSERM U1258, Université de Strasbourg, 1 Rue Laurent Fries, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

* Correspondence: cat@igbmc.fr

Simple Summary: One out of 8 breast cancers is of a particular type called “HER2-positive”, which is more aggressive and is treated by surgery and a medical treatment associating chemotherapy and a targeted drug against the protein HER2, possibly followed by radiotherapy and endocrine therapy. When the medical treatment is performed before others (neoadjuvant) and that all cancer cells are gone, this is called “pathological complete response”, which is an important good-prognosis marker. This article studied on a group of 112 patients with HER2-positive breast cancer, the presence of a protein called STARD3, which has a strong biological and genetic association with HER2. It found that STARD3 was strongly associated with pathological complete response and could predict this response. It also investigated if the presence of STARD3 had an impact on prognosis (such as survival and the risk of cancer recurrence). This work suggests that the study of STARD3 for HER2-positive breast cancers could lead to a better treatment planning, and further studies are needed.

Abstract: Pathological complete response (pCR) after neoadjuvant systemic treatment (NST) is an important prognostic factor in HER2-positive breast cancer. The majority of HER2-positive breast cancers are amplified at the HER2 gene locus, several genes are co-amplified with HER2, and a subset of them are co-expressed. The STARD3 gene belongs to the HER2 amplicon, and its role as a predictive marker was never addressed. The objective of this study was to investigate the predictive value of STARD3 protein expression on NST pathological response in HER2-positive breast cancer. In addition, we studied the prognostic value of this marker. **Methods.** We conducted a retrospective study between 2007 and 2020 on 112 patients with non-metastatic HER2-positive breast cancer treated by NST and then by surgery. We developed an immunohistochemistry assay for STARD3 expression and subcellular localization and determined a score for STARD3-positivity. As STARD3 is an endosomal protein, its expression was considered positive if the intracellular signal pattern was granular. **Results:** In this series, pCR was achieved in half of the patients. STARD3 was positive in 86.6% of cases and was significantly associated with pCR in univariate analysis ($p = 0.013$) and after adjustment on other known pathological parameters ($p = 0.044$). Performances on pCR prediction showed high sensitivity (96%) and negative predictive value (87%), while specificity was 23% and positive predictive value was 56%. Overall, specific, relapse-free, and distant metastasis-free survivals were similar among STARD3 positive and negative groups, independently of other prognosis factors. **Conclusion:** NST is an opportunity for HER2-positive cancers. In this series of over a hundred HER2-positive and non-metastatic patients, a STARD3-negative score was associated with the absence of pathological complete response. This study suggests that determining STARD3 overexpression status on initial biopsies of HER2-positive tumors is an added value for the management of a subset of patients with high probability of no pathological response.

Keywords: breast cancer; human epidermal growth-factor receptor 2 (HER2); neo-adjuvant systemic treatment; STARD3; pathological complete response



Citation: Lodi, M.; Voilquin, L.; Alpy, F.; Molière, S.; Reix, N.; Mathelin, C.; Chenard, M.-P.; Tomasetto, C.-L. STARD3: A New Biomarker in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers* **2023**, *15*, 362. <https://doi.org/10.3390/cancers15020362>

Academic Editors: Christian Singer and Andrea Nicolini

Received: 20 November 2022

Revised: 23 December 2022

Accepted: 29 December 2022

Published: 5 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Breast cancer is a heterogeneous disease, composed of different biological subtypes which have distinct behaviors and prognosis. Amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is present in 13–15% of cases [1] and leads to a biologically aggressive malignancy with increased sensitivity to chemotherapy. Today, in the clinical practice, HER2 positivity is established by pathologists using immunohistochemistry (IHC), possibly in situ hybridization (ISH) and follows international guidelines [2]. HER2-positive cancers have a specific treatment sequence based on the combination of chemotherapy and anti-HER2 targeted therapies. This specific patient care protocol includes, in most cases, a systemic treatment of cytotoxic chemotherapy (with or without anthracyclines), which is associated with targeted anti-HER2 therapies blocking either the receptor itself or its tyrosine kinase activity. Over the years, clinicians have noted that in the case of non-metastatic diseases, neoadjuvant systemic treatment (NST) has multiple benefits. First, NST reduces tumor size and favors breast-conserving surgery with a better aesthetic result. Second, it accelerates systemic treatment, which is beneficial in case of the presence of occult distant disease and when surgery must be delayed. This might happen during pregnancy or during oncogenetic testing, given that the results can change the surgical treatment. Third, NST allows for the evaluation of tumoral response to a given therapeutic regimen. Notably, pathological response to NST gives a direct indication of treatment efficiency and constitutes an important prognostic factor. The presence of residual invasive disease either in the breast or in axillary nodes after NST with single or dual HER2-targeted therapy is an indication for a postoperative adjuvant treatment with the next generation of anti-HER2 therapy ado-trastuzumab emtansine (T-DM1). The number of anti-HER2 therapies is continuously increasing, and with the expansion of this therapeutic arsenal, there is a need to properly tailor anti-HER2 targeted treatment. Moreover, given that these treatments are cost-effective and may have deleterious side-effects, much attention is being paid to improve the prediction of clinical benefits. Some clinicopathological factors are associated with pCR such as high grade, hormone receptor negativity, absence of lymphovascular invasion, or high Ki67 [3–5]. Conversely, large tumor size [6] and lymphovascular invasions [7] are inversely associated with pCR. Compared with the other subtypes, HER2+ breast cancers achieve higher rates of pCR [5], with the rates that vary between clinical trials being estimated to reach 50% with taxanes-anthracyclines-based regimens in association with trastuzumab [8–10]. Other regimens without anthracyclines have been published, such as in the TRAIN study comparing carboplatin-taxanes-trastuzumab with or without pertuzumab (pCR rates of 67 versus 68%, respectively, not significantly different) [11,12] or in the TRYPHAENA study comparing anthracyclines, docetaxel, carboplatin, trastuzumab, and pertuzumab [13]. Nonetheless, a number of cases do not respond to NST, and there is a need to find additional predictive factors. In our laboratory, we have identified a gene named StAR-related lipid transfer domain-3 (STARD3) co-amplified and co-expressed with HER2 in breast cancer [14,15]. STARD3 is present in the HER2 minimal region of amplification in cancers [16–18], and importantly, STARD3 functions in HER2+ cancer cells. The reduction of STARD3 expression in HER2-positive cancer cell lines reduces their growth [19–21]. Of interest, Salberg et al. noted that cell lines resistant to anti-HER2 therapies were still dependent on STARD3 expression [21], suggesting that STARD3 has a unique role in the biology of HER2-positive cancer cells and may be a predictive factor for pCR.

The objective of this study was to investigate the prognostic and predictive value of STARD3 protein expression on NST pathological responses in HER2-positive breast cancer.

2. Materials and Methods

2.1. Expression Analyses from Public Databases

Data were extracted from the Cancer Cell Line Encyclopedia website, Broad Institute of MIT and Harvard [22]. We collected mRNA expression (RNAseq) and DNA copy number for each gene on 51 different breast cancer cell lines (Table S1). Statistical analyses

and graphical plotting were carried out using R version 4.1.3 (10 March 2022) [23] and R packages *Hmisc*, *ggpubr*, *ggplot2*, and *GEOquery*. For correlation, we used Pearson correlation test, and the regression line was made with a linear model. A breast invasive carcinoma study was identified in cBioPortal (cbioportal.org) for Cancer Genomics [24]. Genomic profiles corresponding to mRNA expression z score relative to all samples (log microarray) were selected. The ERBB2 and STARD3 genes were queried. The correlation between ERBB2 and STARD3 mRNA expression was determined using the plot tab, and horizontal axis and vertical axes corresponded to STARD3 and ERBB2 mRNA expression (microarray), respectively. The regression line tab was selected. The Gene Expression Omnibus (GEO) repository [25] was queried for HER2-positive breast cancers specimens treated with similar neoadjuvant systemic treatment (see eligibility criteria) and measuring pathological complete response. Two studies were found, evaluating gene expression by RNA sequencing, including $n = 24$ [26] and $n = 57$ specimens [27]. A comparison of STARD3 RNA between the “pCR” and “no pCR” groups was performed with a Wilcoxon test.

2.2. Cell Culture and Transfections

HCC1954 (American Type Culture Collection CRL-2338) cells were maintained in RPMI w/o HEPES with 10% fetal calf serum (FCS) and 40 µg/mL gentamycin. HeLa (ATCC CCL-2) cells were maintained in DMEM with 5% FCS and 40 µg/mL gentamycin. Transient siRNA transfections were performed using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, P/N 56532) according to the manufacturer’s instructions. Control siRNA (D-001810-10) and STARD3-targeting siRNAs (L-017665-00) were from SMARTpool ON-TARGETplus obtained from Horizon Discovery. siRNAs were used at 10 nM final concentration and cells were transfected 24–72 h prior to experiments. Plasmid transient transfections were done in 6-well plate using X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) and 1 µg of pEGFP-STARD1, pEGFP-STARD2, pEGFP-STARD3, pEGFP-STARD4, pEGFP-STARD5, or pEGFP-STARD6. Protein extracts were obtained 48 h after transfection by scraping phosphate-buffered saline 1X (PBS) washed cells with 300 µL of lysis buffer (150 mM Tris.HCl, Ph 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 1X Complete protease inhibitor from Roche). After 15 min on ice, cell extracts were centrifuged for 10 min at 10,000 rpm, and supernatants were collected and quantified.

2.3. Immunofluorescence and Western Blot

HCC1954 cells were grown to 70% confluence on glass coverslips. After washing with PBS 1X, cells were fixed 10 min at room temperature in 4% paraformaldehyde in PBS 1X then permeabilized for 10 min with 0.1% Triton X-100 in PBS. After blocking in 1% bovine serum albumin in PBS, cells were incubated at 4 °C overnight with the primary mouse anti-STARD3 3G11 (1:1000) antibody (IGBMC). Secondary antibody (1:1000) was Donkey anti Mouse Alexa-555 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Nuclei were counterstained with the Hoechst-33258 dye (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Slides were mounted in ProLong Gold (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Observations were made with a confocal microscope (Leica SP8 UV, 63×, NA 1.4). For Western blot analysis, nearly equal amounts of proteins (20 µg) were separated into 7–14% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with non-fat dry milk 3% in 1× PBS, Tween-20 0.1%, and incubated overnight at 4 °C with anti-STARD3 (3G11; 1/1000), anti-GFP (1/2000) (TP401, Torrey Pines Biolabs, Secaucus, NJ, USA), and anti-Rab7 (#2576 1/1000). Secondary horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-Mouse and anti-Rabbit antibodies were from Jackson ImmunoResearch. Signals were acquired using the LAS Quant 4000 System (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). All the whole western blot figures can be found in the Supplementary Materials.

2.4. STARD3 Immunohistochemistry Assay on Human Breast Cancer

2.4.1. Study Design

We conducted a retrospective analysis of STARD3 expression in HER2-positive human breast cancers. For that, we constituted a cohort of patients diagnosed with a HER2-positive primary breast cancer by routine immunohistochemistry (score 3+) treated at the Strasbourg University Hospital between 2007 and 2020. This clinical study included 112 HER2-positive breast cancer patients treated with NST at Strasbourg University Hospitals and was conducted following the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) guidelines [28].

2.4.2. Eligibility Criteria

Inclusion criteria were: (1) primary breast cancer with stage I to III at diagnosis; (2) HER2-positive breast cancer defined by a IHC score of 3+; (3) surgical treatment and pathological analysis of the operative specimen at the Strasbourg University Hospitals; (4) anthacycline-based NST with trastuzumab [(F)EC-TH protocols]: epirubicin and cyclophosphamide with or without fluorouracil (respectively, FEC and EC) every three weeks for three to four cycles, followed by taxanes (weekly paclitaxel for nine to twelve cycles or docetaxel every three weeks for three to four cycles) and trastuzumab every three weeks; and 5) patient informed consent. Patients with initial metastatic disease and those for whom the initial core biopsy was not available for analysis were excluded. Patient selection was resumed in the CONSORT diagram (see Figure 1).

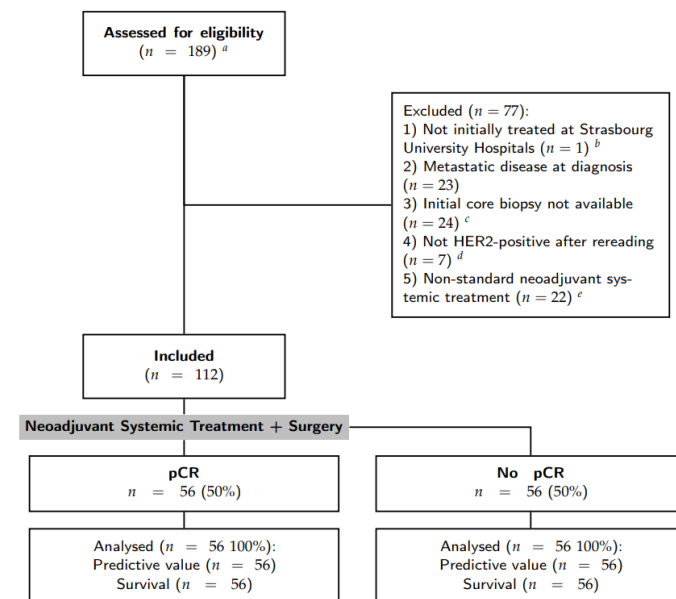


Figure 1. Flow chart of patient selection. ^a The initial query was all breast specimens HER2+ treated by surgery; ^b one patient was excluded as it was a second pathology opinion after a surgery in another center; ^c some initial core biopsies were stored in other pathology laboratories. Requests for stored material in other laboratories were made 3 times, some were recovered but others were not available or did not have residual material to perform immunohistochemistry assays; ^d either HER2 score 0–1 or 2+ with non-amplified in situ hybridization; ^e without anthracyclines and/or with trastuzumab.

2.4.3. Study Endpoints

Primary endpoint was the detection and location of STARD3 protein expression by IHC in core biopsies before NST and its performances in pCR prediction. The secondary endpoint was survival (overall, specific, and event-free) according to STARD3 expression.

2.4.4. Patient Selection

We performed an initial query in the pathology laboratory database of the Strasbourg University Hospital (DIAMIC[®], INFOLOGIC-Santé, Valence, France). Then, we gathered different clinical and pathological parameters for each patient from the electronic health record. According to the therapeutic response, we divided the cohort into two groups: “pCR” and “no pCR”. pCR was defined by a complete tumor regression after NST, and included patients with no residual cancer cells (ypT0N0 according to the TNM classification [29]) or with residual in situ neoplasia and the absence of infiltrative cancer (ypTisN0). The “no pCR” group included all the other patients.

2.4.5. Clinical and Pathological Characteristics

Hormone receptor and HER2 expression were quantified according to the American Society of Clinical Oncology (ASCO)/College of American Pathologists (CAP) guidelines [2,30]. Tumors were considered hormone receptor positive if H-Score was >10. HER2 was considered negative if the score was 0 or 1+ and positive for 3+. In the case of HER2 score 2+, silver in situ hybridization (SISH) was performed to assess HER2 amplification. Nuclear grade was described according to the Elston and Ellis modified Scarff–Bloom–Richardson (SBR) grading system [31]. Tumor stage was defined according to the TNM Classification of the American Joint Committee on Cancer classification [29]. Survival was calculated from time of diagnosis. We considered a patient lost to follow-up if the last known date was greater than 1 year and the patient did not complete the recommended follow-up program.

2.4.6. STARD3 Immunohistochemistry Protocol

For each patient, we gathered clinical and pathological data. Then, we unarchived the initial core biopsy of the tumor, which was previously fixed in formaldehyde and embedded in a paraffin block. Each block was cut in 4 µm slices using a microtome that were placed on positive-charged glass slides [VWR SuperFrost[®] Plus, Rosny-sous-Bois, France] after a bath in 40 °C water. Each slide was identified with a bar code and specimen and protocol identification. We then proceeded to automated deparaffinization and staining using BenchMark Ultra IHC slide staining system automat (Ventana, Roche, Basel, Switzerland) with UltraView Universal DAB detection kit (Ventana, Roche). The first step was deparaffinization by heating slides to 72 °C then washing them four times with EZ Prep[™] 1x (950-102, Ventana, Roche) solution. Then, a pre-treatment was performed by association of heating to 95 °C and Cell Conditioning 1[™] solution (CC1, Ventana, Roche) with the 64-min standard protocol. At the end of pre-treatment, slides were at 36 °C until the end of the whole protocol. Slides were washed 3 times with reaction buffer. Endogenous enzyme inhibition was performed with UltraView Inhibitor[™] (Ventana, Roche) applied for 4 min. Slides were washed 2 times with reaction buffer. Then, anti-STARD3 3G11 primary antibody (mouse monoclonal antibody, IGBMC, [32]) at 1/500 dilution was applied for 32 min at 36 °C. Initially, different anti-STARD3 antibodies and different dilutions were tested in order to choose the best experimental situation. Slides were washed two times with reaction buffer. Next, secondary anti-mouse antibody coupled with horseradish peroxidase (UltraView HRP Multimer[™] (Ventana, Roche)) was applied for 8 min at 36 °C. Slides were washed 3 times with reaction buffer. At this point, UltraView DAB[™] and DAB H₂O₂[™] (Ventana, Roche) were applied on the slides for 8 min at 36 °C, and UltraView Copper[™] (Ventana, Roche) was used to improve staining readability. Slides were washed once with reaction buffer. Ultimately, a counterstaining with Hematoxylin II (Ventana, Roche) for 8 min was performed. Slides were dehydrated with ethanol and xylene, then mounted with the machine Cover Tech Microm CTM6 (Thermo Scientific) using Pertex[®] rapid drying

medium for mounting (Histolab, Askim, Sweden) and 24 × 50 mm cover slips (Mezel-Glöser, VWR). For each patient, we examined STARD3 and HER2 immunohistochemistry assays using brightfield microscopy, and those slides were scanned with NanoZoomer-XR (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) using the whole slide imaging system.

2.4.7. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with R version 4.1.3 (10 March 2022) [23]. When comparing qualitative variables, we performed two-sided Chi² tests with Yates's correction (or Fisher's exact tests if the samples sizes were small). When comparing quantitative variables (such as age) we used two-sided Wilcoxon tests. We measured the test performance using sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, and calculated their 95% confidence intervals (95% CI). For multivariate analysis of dichotomous variables (pCR versus no pCR), we performed a binomial logistic regression with a generalized linear model (*logit* model). Odds ratio and their 95% CI were obtained with exponential of each variable coefficient and confidence intervals. For survival analysis, we used the Kaplan–Meier method and the log-rank test, and the Cox Proportional Hazard survival models for multivariate analysis.

3. Results

3.1. A Strong Association between STARD3 and HER2 in Breast Cancers

Gene amplification is an important mechanism in cancer, leading to increased gene expression and gain of function [33]. In our previous studies, using cell lines and breast tumors, we showed that STARD3 gene amplification and overexpression paralleled that of HER2 [14,15,34]. In order to precisely establish the relationship between DNA copy number and RNA expression levels for STARD3 and other genes from the HER2 amplicon in independent samples, we took advantage of the CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) project [22]. We extracted DNA copy number and RNA expression data for HER2, GRB7, STARD3, and TOPA2 genes in 51 breast cancer cell lines (Table S1). The correlation coefficient between DNA copy number and RNA expression was calculated for the different genes tested. STARD3 expression showed a strong positive correlation with its own DNA copy number (Figure 2A), a feature shared by HER2 and Growth factor receptor-bound protein 7 (GRB7) (Figure 2B). More important, STARD3 DNA copy number showed a strong positive correlation with HER2 DNA copy number, and both STARD3 DNA copy number and its expression (RNA level) are strongly correlated with that of HER2 (Figure 2). We next explored a large-scale cancer genomics database using the cBioPortal resource [24]. In this collection of invasive breast tumors, STARD3 expression was positively correlated with HER2 expression (Figure 2C).

Several studies reported a poor prognostic value for STARD3 expression in breast cancers [35,36]. However, data about its potential interest as a predictive biomarker regarding therapeutic intervention are still missing. In this study, we investigated STARD3 expression on a cohort of HER2-positive breast cancers. With the aim of examining STARD3 expression by immunohistochemistry (IHC), we tested the specificity of an anti-STARD3 antibody developed in our laboratory [32]. We first analyzed STARD3 expression by western blot on a HER2-positive cell line (HCC1954). The 3G11 antibody detected STARD3 in wild-type cells and cells transfected with control small interfering RNAs (siRNAs) while no signal was detected in cells treated with specific siRNAs against STARD3 (Figure 3A). Next, because STARD3 belongs to a family of 15 related proteins in mammals [37], we studied signal specificity with respect to the other members of the START protein family. To this aim, different constructs expressing fusion proteins between the GFP and a number of STARD proteins were transfected in HeLa cells and analyzed by western blot. We expressed STARD1 and STARD4-D6, as they are the STARD3 closest homologs in the family. The anti-STARD3 antibody recognized only the GFP-STARD3 construct (Figure 3B), indicating its specificity. We then tested the antibody by immunofluorescence on HCC1954 cells. This experiment showed that the anti-STARD3 antibody recognized a punctate cytoplasmic

signal typical of STARD3 in wild-type and control cells, while the signal was lost in cells transfected with siRNAs against STARD3 (Figure 3C). Finally, the antibody was tested by IHC on fine needle breast biopsies. As shown in Figure 3D, the antibody detected a specific punctate or granular signal in the cytoplasm of cancer cells, while normal epithelial and stromal cells were negative.

Altogether, these data confirmed the strong correlation between STARD3 and HER2 DNA amplification and RNA expression in breast cancer and prompted us to examine STARD3 protein expression in a clinical series by IHC using a specific anti-STARD3 antibody.

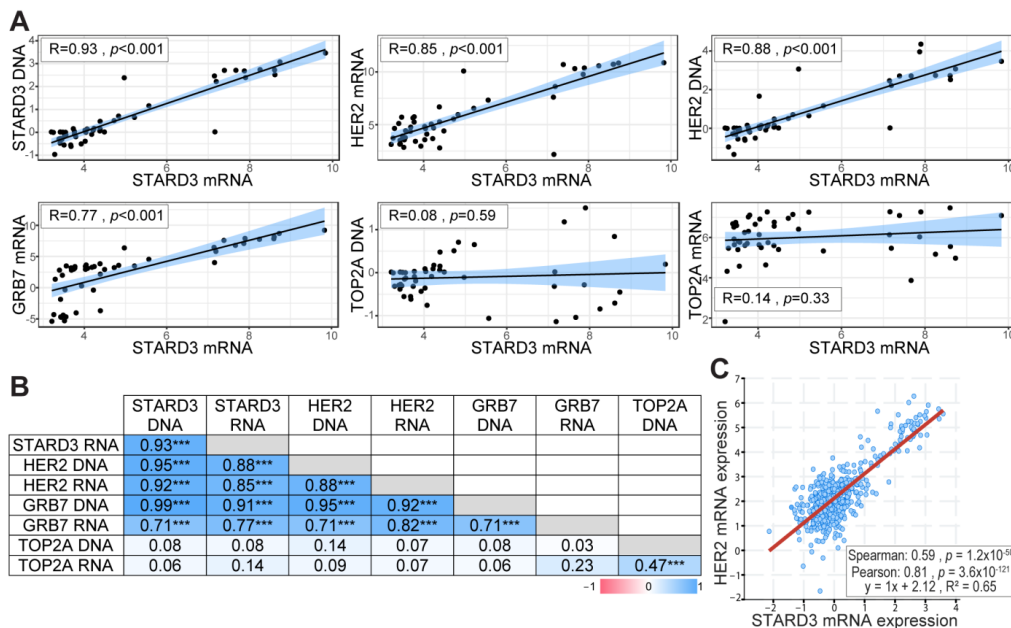


Figure 2. STARD3 and HER2 expression are correlated in breast cancers. (A) Pearson correlation coefficient and regression line showing the correlation between STARD3 DNA, HER2 RNA, HER2 DNA, GRB7 RNA, TOP2A DNA, TOP2A RNA, and STARD3 RNA. RNA and DNA data were obtained from the Cancer Cell Line Encyclopedia database. RNA expressions are Log2 values, DNA represents copy number variation. (B) Pearson correlation coefficient (r) matrix and its statistical significance (***) = $p < 0.001$) between STARD3, HER2, GRB7, TOP2A DNA, and RNA. STARD3 is correlated with HER2 and GRB7 but not with TOP2A. (C) Correlation between STARD3 and HER2 mRNA expression (microarray, log2 values) in a cohort of breast cancers from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

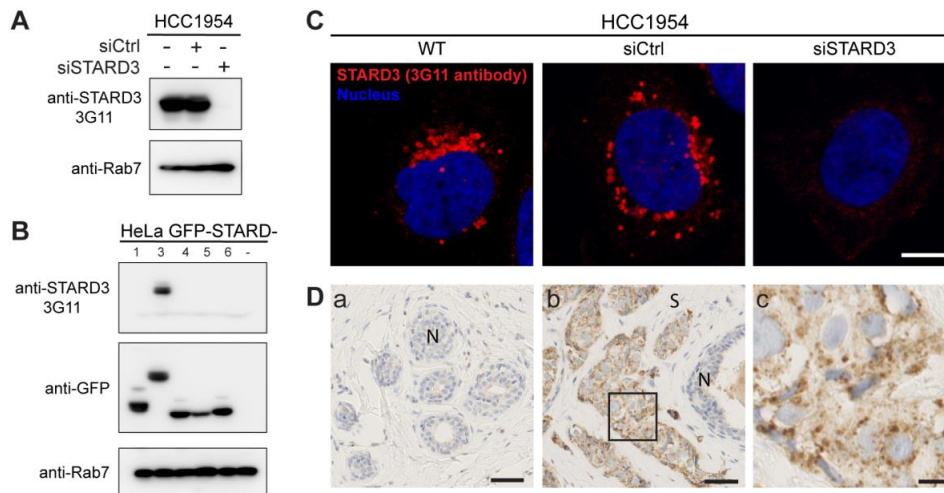


Figure 3. Generation of a specific anti-STARD3 antibody for immunohistochemistry. (A) Western blot analysis of STARD3 expression using the anti-STARD3 antibody 3G11 in HCC1954 cells (WT and transfected with control (siCtrl) and STARD3-targeting (siSTARD3)-siRNAs). Anti-Rab7 antibody was used as a loading control. (B) Western blot analysis of HeLa cells transiently expressing STARD1, STARD3, STARD4, STARD5, and STARD6 fused to GFP (GFP-STARD) using anti-STARD3 3G11 antibody. Anti-Rab7 antibody was used as a loading control. (C) HCC1954 cells (WT) and HCC1954 cells transfected with control siRNAs (siCtrl), and siRNAs targeting STARD3 (siSTARD3) were labeled with anti-STARD3 3G11 antibodies (red). Nuclei are stained blue. Scale bar: 10 μ m. (D) Immunohistochemistry on normal breast (a) and HER2+ breast tumor (b) sections using anti-STARD3 3G11 antibody. N marks the position of a normal duct. S marks the tumor stroma. The subpanel (c) is a higher magnification image (4.5 \times) of the area outlined in black in (b). Scale bar: 50 μ m (a,b) and 10 μ m (c). All the whole western blot figures can be found in the Supplementary Materials.

3.2. Patient Characteristics

To study the predictive value of STARD3 protein expression regarding therapeutic intervention, we conducted a retrospective clinical study on HER2+ tumors. Tumor samples were obtained between 2007 and 2020 from 112 HER2-positive breast cancer patients treated with NST at Strasbourg University Hospitals (for patient selection, see Figure 1). Table 1 shows the clinical, morphological, and treatment characteristics of the study cohort classified according to pCR. Of the 112 patients included, 56 achieved pCR (50%) and 56 did not (50%). The median age at diagnosis, the presence of multifocal disease, the histological subtype, and the initial tumor size were similar amongst the two groups. Likewise, there were no differences associated with the distinct NST regimens used. Of interest, ER expression was correlated with pCR, as lower ER H-Scores were observed in the pCR group (91.7 versus 178.8, $p < 0.001$). A similar tendency was observed with PR expression, but it was not significant. Of note, high grade (SBR III) was associated with pCR (73.2% versus 48.2%, $p = 0.007$).

These data show that this cohort is representative of HER2+ breast-cancer treated with NST, as pCR rates are similar to those reported in other studies, and clinicopathological factors associated with pCR are consistent with the literature.

Table 1. Cohort description according to pCR.

	pCR N = 56	No pCR N = 56	Total N = 112	p-Value
Age				
Mean (SD)	53 (11.4)	54 (12.0)	54 (11.7)	0.735
Range	34–76	27–85	27–85	
Multifocal disease				
Yes	9 (16.1%)	10 (17.9%)	19 (17.0%)	0.801
No	47 (83.9%)	46 (82.1%)	93 (83.0%)	
Histological subtype				
Ductal	53 (94.6%)	54 (96.4%)	107 (95.5%)	0.310
Lobular	1 (1.8%)	2 (3.6%)	3 (2.7%)	
Lymphoid stroma	2 (3.6%)	0 (0%)	2 (1.8%)	
Initial size (mm)				
Mean (SD)	34.8 (21.1)	37.2 (24.4)	36.0 (22.7)	0.588
Range	5–110	10–140	5–140	
Initial node involvement (TNM classification)				
cN0	24 (42.9%)	27 (48.2%)	51 (45.5%)	0.481
cN1	27 (48.2%)	27 (48.2%)	54 (48.2%)	
cN2	5 (8.9%)	2 (3.6%)	7 (6.2%)	
ER H-score				
Mean (SD)	91.8 (114.9)	178.8 (118.4)	135.2 (124.1)	<0.001
Range	0–300	0–300	0–300	
RP H-score				
Mean (SD)	50.3 (95.5)	75.5 (107.0)	62.9 (101.8)	0.191
Range	0–300	0–300	0–300	
High grade (SBR III)				
No	15 (26.8%)	29 (51.8%)	44 (39.3%)	0.007
Yes	41 (73.2%)	27 (48.2%)	68 (60.7%)	
High Ki67 (≥30%)				
Unknown	2	1	3	0.052
No	9 (16.7%)	18 (32.7%)	27 (24.8%)	
Yes	45 (83.3%)	37 (67.3%)	82 (75.2%)	
NST protocol				
EC-TH	18 (32.1%)	20 (35.7%)	38 (33.9%)	0.285
FEC-TH	34 (60.7%)	32 (57.2%)	66 (58.9%)	
TCH	0 (0%)	2 (3.6%)	2 (1.8%)	
TH	4 (7.1%)	2 (3.6%)	6 (5.4%)	
Breast surgery				
Radical mastectomy	22 (39.3%)	19 (33.9%)	41 (36.6%)	0.556
Conservative treatment	34 (60.7%)	37 (66.1%)	71 (63.4%)	
Breast surgery				
Sentinel lymph node biopsy	5 (8.9%)	11 (19.6%)	16 (14.3%)	0.105
Axillary lymph node dissection	51 (91.1%)	45 (80.4%)	96 (85.7%)	

Legend: pCR = pathological complete response; SD = standard deviation; ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptors; SBR = Scarff–Bloom–Richardson; NST = neoadjuvant systemic treatment; EC-TH = epirubicin-cyclophosphamide taxane-trastuzumab; FEC-TH fluorouracil-epirubicin-cyclophosphamide taxane-trastuzumab; TCH = taxane-cyclophosphamide-trastuzumab; TH = taxane -trastuzumab; STARD3 = StAR-related lipid transfer domain-3.

3.3. Immunohistochemistry on Initial Biopsies

We analyzed by IHC STARD3 protein expression in 112 HER2-positive invasive breast cancers on the initial tumor biopsies. The tumors analyzed had been classified in the HER2-positive subgroup by routine immunohistochemistry performed on the same biopsy. STARD3 expression was scored according to signal intensity, the number of positive cancer cells, and staining patterns (Figure 4 and Table 2). Intensity was evaluated with a 4-value

subjective scale from 0 (none) to 3 (very strong) (Figure 4A). High STARD3 expression was found in the majority of samples: out of 112 samples, 104 tumors were positive and 8 were negative (Table 2). We also looked at the percentage of cancer cells positive for STARD3 in these samples. In the 104 STARD3-positive tumors, the protein was overexpressed in almost all cancer cells, but in rare cases, heterogeneity was observed (Table 2). Consistent with the known localization of STARD3 in endosomes [38], in most positive cases (97 out of 104), the STARD3 staining pattern was granular (Figure 4 and Table 2). In the majority of cases, the granular staining was dispersed in the cytosol (Figure 4B(a,c)), and in fewer cases the granular signal was polarized either close to the plasma membrane or in the perinuclear area (Figure 4B(b)). Finally, in some tumors, no signal or a weak diffuse signal was observed (Figure 4A(c) and 4B(d)). For these tumors, the overexpression and amplification of HER2 was controlled (Figure 4A(c)). All these cases had HER2 overexpression (controlled by HER2 score 3+ in immunohistochemistry assays). Silver in situ hybridization (SISH) was performed for all STARD3 negative cases ($n = 15$), and we found that among them 12 had HER2 amplification while 3 were not amplified, suggesting that in these tumors HER2 overexpression is independent from amplification and is caused by transcription. Interestingly, all STARD3-negative and HER2-positive but non-amplified (SISH-negative) cases did not achieve pCR.

Amplification at the HER2 locus is not specific to invasive carcinoma. Many studies reported that ductal carcinoma in situ (DCIS) have HER2 amplification and overexpression [39]. In particular, one study in pure DCIS showed co-amplification and co-expression along with HER2 of several neighboring genes, including STARD3 and GRB7 [40]. Because the presence of DCIS is frequent in invasive carcinoma, we looked for STARD3 expression in the in situ and invasive components of tumors from our series. We found 55 associated DCIS in the initial core biopsy, representing about half of the samples. In all these cases, the level of STARD3 expression was identical in the invasive and in situ components of the tumors; 49 cases were STARD3-positive and 6 were STARD3-negative (Table S2).

Collectively, these results show that STARD3 is overexpressed at high levels in the majority of HER2 positive tumors. Its granular staining pattern is consistent with the localization of the protein in endosomes. Interestingly, like HER2, STARD3 overexpression is stable during the transition of in situ to invasive carcinomas.

Table 2. STARD3 immunohistochemistry assay according to pCR.

	pCR N = 56	No pCR N = 56	Total N = 112	p-Value
		STARD3 negative signal		
No	55 (98.2%)	49 (87.5%)	104 (92.9%)	0.028
Yes	1 (1.8%)	7 (12.5%)	8 (7.1%)	
		STARD3 intensity		
Mean (SD)	2.28 (0.80)	1.99 (0.98)	2.13 (0.90)	0.093
Range	0–3	0–3	0–3	
		STARD3 distribution		
Absent	1 (1.8%)	7 (12.5%)	8 (7.1%)	0.088
Diffuse	49 (87.5%)	44 (78.6%)	93 (83.0%)	
Marginal	6 (10.7%)	5 (8.9%)	11 (9.8%)	
		STARD3 granular pattern		
Not granular	3 (5.4%)	12 (21.4%)	15 (13.4%)	0.013
Granular	53 (94.6%)	44 (78.6%)	97 (86.6%)	
		STARD3 cell positivity (%)		
Mean (SD)	97 (16.6)	84 (36.2)	90 (28.8)	0.015
Range	0–100	0–100	0–100	

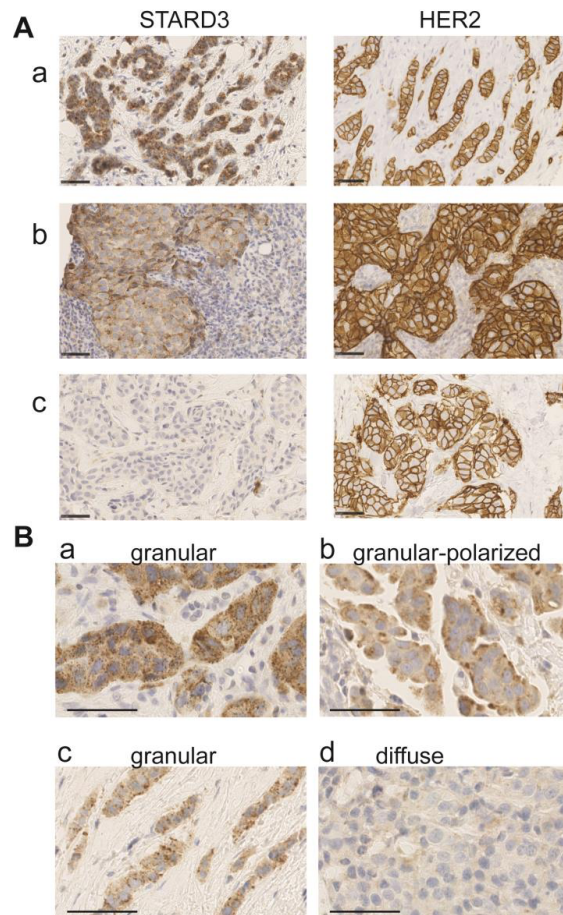


Figure 4. STARD3 staining patterns in breast cancer. (A) Representative immunohistochemistry signals for STARD3 and HER2 on three biopsies. STARD3 protein is expressed at high levels in the majority of HER2-positive tumors (a,b). STARD3 expression is absent in some HER2-positive tumors (c). (B) Staining patterns for STARD3 in breast tumors. STARD3 is predominantly detected with a granular scattered pattern in the cytoplasm of cancer cells (a,c). In some cases, the granular STARD3 staining is polarized (b). In a few cases, the staining is weak and diffuse in the cytoplasm (d). Bars are 50 μ m, nuclei are counterstained in blue with hematoxylin.

3.4. Immunohistochemistry on Residual Disease

We conducted an analysis on residual cancer after NST. Among the cohort, we had 56 patients with partial/absent pathological response. Five cases were excluded from the analysis because there was no sufficient material to perform IHC assays ($n = 4$) or because there was a complete response (i.e., no residual breast tumor) on the breast but partial/absent response on the axillary lymph nodes ($n = 1$). Among the 51 patients in whom STARD3 could be evaluated in tumoral resections, we noted that, in most cases (82%, $n = 43/51$), no change for the STARD3 score was observed when comparing initial biopsies with residual disease samples after NST. Three cases had a gain in STARD3 expression (6%,

negative to positive, $n = 3$) and 6 cases became negative, with a loss in STARD3 expression (12% positive to negative, $n = 6$) (see Table 3).

Table 3. STARD3 and HER2 expression after neoadjuvant systemic treatment.

Initial	STARD3 Score		HER2		Post-NST ISH		Detail
	Post-NST	Change	Post-NST	Amplification	No Amplification		
Negative	Negative	No ($n = 8$)	Negative ($n = 1$)	0	1	No change ($n = 1$)	
			Positive ($n = 7$)	7	0	No change ($n = 6$) Change: loss of amplification ($n = 1$)	
	Positive	Yes: gain ($n = 3$)	Negative ($n = 1$)	0	1	No change ($n = 1$)	
			Positive ($n = 2$)	2	0	No change ($n = 2$)	
Positive	Negative	Yes: loss ($n = 6$)	Negative ($n = 5$)	3	2	No change ($n = 3$) Change: loss of amplification ($n = 2$)	
			Positive ($n = 1$)	1	0	No change ($n = 1$)	
	Positive	No ($n = 34$)	Positive	Not performed ($n = 31$)			

Legend: pCR = pathological complete response; NST = neoadjuvant systemic treatment; STARD3 = StAR-related lipid transfer domain-3; HER2 = Human epidermal growth-factor receptor 2; SISH = in situ hybridization.

First, we investigated whether the change in STARD3 was associated with a change in HER2 expression. We found that when STARD3 score changed after NST, HER2 expression change (loss) was also observed in 67% of cases (versus 2.4% when STARD3 score was unchanged, $p < 0.001$). Second, we investigated whether HER2 amplification detected by SISH was lost after NST. We found that in 4 cases (20%) there was no amplification in the tumoral specimen. These modifications were not associated with STARD3 changes ($p = 0.403$).

Taken together, these data suggest that STARD3 and HER2 expressions remain associated when the HER2 status is lost in the residual disease after NST. This may be explained by the fact that NST may select a tumoral clone which is more resistant to the treatment, or because of initial tumor heterogeneity with the coexistence of two tumors that had been missed by the initial core biopsy.

3.5. STARD3 and the Pathological Complete Response

Several anti-HER2 drugs are available in the clinical practice, and the selection of the most effective treatment for each patient is a current challenge. In this context, it is still unclear if determining STARD3 expression together with HER2 expression on the initial biopsy could assist therapy selection. To examine this possibility, we studied the association between STARD3 expression and pCR in our retrospective cohort. We found that a small proportion of HER2-positive breast cancers were STARD3-negative (8/112). However, the majority of them (7/8) fell in the “no pCR” group following neoadjuvant therapy, and the association was significant (Table 2, $p = 0.028$). Tumor heterogeneity regarding STARD3 overexpression in this series was rare (4%, $n = 3/112$ had a positive and a negative contingent), however a higher percentage of STARD3-positive tumor cells was significantly associated with pCR ($p = 0.015$, Table 2). Signal intensity varied between 0, 1+, 2+, and 3+, mean signal intensity was 2.13, and there was no difference between the pCR and “no pCR” groups (Table 2). Regarding staining patterns, the granular staining pattern predominated, out of 112 tumors, 97 had a granular staining pattern while 7 had a diffuse cytoplasmic staining pattern and 8 were negative. The granular pattern was significantly associated with pCR (Table 2). Within the granular staining patterns, we studied the association between either scattered or polarized staining and pCR and we did not find a significant association.

Next, we investigated if these findings were consistent with public databases. We queried the Gene Expression Omnibus (GEO) repository for studies investigating genome expression in HER2-positive breast cancer treated with NST (and similar protocol, see eligibility criteria). We found two studies evaluating gene expression by RNA sequencing, representing $n = 24$ [26] and $n = 57$ specimens [27]. Results are shown in Figure 5. Both distributions suggest that low STARD3 expression is associated with no pCR. However, there was no statistically significant difference between the “no pCR” and “pCR” groups ($p = 0.18$ and $p = 0.41$). Because RNA sequencing does not take into account STARD3 protein localization and function, contrary to IHC, we hypothesize that the number of STARD3-negative samples (weak and diffuse staining) is underestimated. Moreover, the size of the cohorts might be limited to reach statistical power.

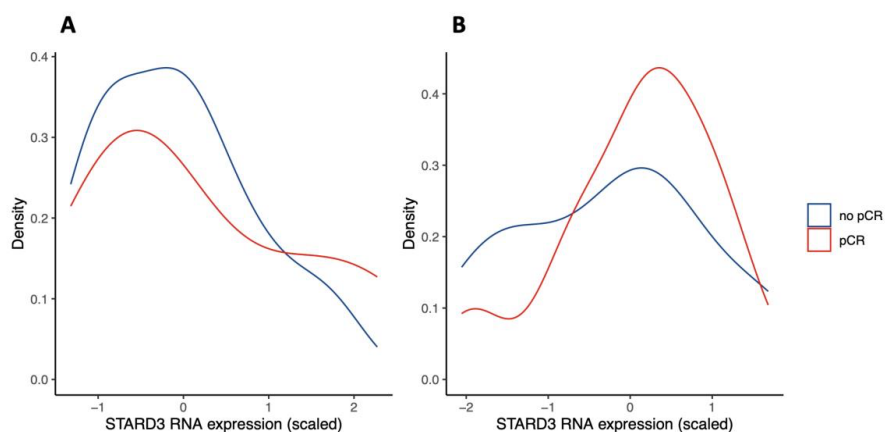


Figure 5. STARD3 gene expression in Gene Expression Omnibus (GEO) repository studies (density plots). Legend: panel (A) shows scaled STARD3 gene expression (RNA sequencing) in a study of $n = 24$ initial biopsies [26]. Panel (B) shows scaled STARD3 gene expression (RNA sequencing) in a study of $n = 57$ initial biopsies [27].

Altogether, considering different parameters of STARD3 expression in this series, we found a significant association between the absence of staining, the diffuse staining pattern, and the low number of positive cancer cells with “no PCR” group.

3.6. Establishment of a STARD3 Score and Prediction of pCR Using the STARD3 Score

Given that STARD3 is a protein from endosomes and that its function relies on its endosomal localization [32], we thought that a weak diffuse staining could not reflect the presence of an active protein. Based on this reasoning, we built a binary score. Tumors were classified as STARD3-positive (STARD3+) if a granular staining was observed, and as STARD3-negative (STARD3-) if the staining was either absent or diffuse. Then, we evaluated the predictive value of this binary score on pCR. Performances of this score are calculated and reported on in Table 4. Of note, we found that the STARD3 score had a high sensitivity (96%, [88–100%]) and a negative predictive value (87%, [60–98%]), while specificity and positive predictive value were lower (23 and 56%, respectively).

Next, we compared the STARD3 score with other pathological parameters that had been previously associated with pCR. We fitted a logistic regression model, including the STARD3 score, ER and PR negativity, high grade (SBR III), and high Ki67 expression (over 30%), to evaluate pCR versus “no pCR”. Results corresponding to this model are expressed as odd ratio and shown in Table 5. Interestingly, STARD3+ score was significantly associated with pCR with an odd ratio of 5.3 and a 95% confidence interval (CI) 1.24 to

36.44, $p = 0.044$, and this was independent of all other parameters tested in the model. Moreover, in this series, only the STARD3 score was significantly associated with pCR.

Table 4. STARD3 score performances on pCR prediction.

Characteristics	Value (95% CI)
True prevalence	0.50 (0.40, 0.60)
Sensitivity	0.96 (0.88, 1.00)
Specificity	0.23 (0.13, 0.36)
Positive predictive value	0.56 (0.45, 0.66)
Negative predictive value	0.87 (0.60, 0.98)
Correctly classified proportion	0.60 (0.50, 0.69)

Legend: CI = confidence interval.

Table 5. Multivariate analysis of pathological parameters impact on pCR.

Parameter	Odds Ratio	2.5%	97.5%	p -Value
STARD3	5.24	1.24	36.42	0.044 *
granular signal				
ER negativity	2.70	0.94	8.15	0.069
PR negativity	1.20	0.43	3.27	0.729
SBR III	2.05	0.81	5.26	0.129
Ki67 $\geq 30\%$	1.29	0.44	3.80	0.641

Legend: STARD3 = StAR-related lipid transfer domain-3; ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor; SBR = Scarff–Bloom–Richardson. * $p < 0.05$

Collectively, STARD3 expression quantified with a binary score considering the localization of the protein has a predictive value on NST-treated HER2+ breast cancers.

3.7. Prognostic Value of STARD3

We assessed the prognostic value of STARD3 in the entire cohort of HER2-positive breast cancers. For the 112 patients included in the study, the median follow-up period was 71.3 months (range 8.5–185.2). Over the period, 8 deaths occurred (5 related to breast cancer and 3 unrelated) and 16 patients experienced disease relapse (11 distant, 5 local, and 2 both local and distant). Fourteen patients were lost during the follow-up (12.5%) and censored at last contact. Finally, survival outcome was examined in the whole cohort that we separated into two groups based on the STARD3 score. By univariate analysis (Figure 6), comparing survival in the STARD3+ and STARD3− groups, we found no significant difference on overall ($p = 0.5$), breast cancer-specific ($p = 0.89$), local relapse-free ($p = 0.20$), and distant metastasis-free ($p = 0.7$) survivals. Then, we used a multivariate analysis, using a fitted Cox Proportional Hazard model to evaluate STARD3 score on prognosis considering all relevant clinical and pathological parameters: age and stage at diagnosis, hormone receptor expression, pCR, histological subtype, Ki67 expression, SBR grade, and lymphovascular invasion (adjustment parameters). The survival analyses showed that STARD3+ patients did not have significantly different overall (HR 0.15 [95% CI = 0.01, 1.70]; $p = 0.127$), breast cancer-specific (HR = 0.05 [95% CI = 0.00, 2.54], $p = 0.132$), relapse-free (HR 0.63 [95% CI = 0.12, 3.41]; $p = 0.59$), and distant metastasis-free (HR 0.48 [95% CI = 0.08, 2.79]; $p = 0.41$) survivals than STARD3 patients, and this was independent to the adjustment parameters.

Next, we assessed the prognostic value of STARD3 gene expression on all breast cancers using a public online database with KMplot [41]. We computed overall (OS), relapse-free (RFS), and distant metastasis-free (DMFS) survivals comparing groups based on STARD3 (split by upper quartile). These results (reported in Figure 6) showed that high STARD3 expression was associated with shorter OS (hazard ratio [HR] = 1.47; 95% confidence interval [CI] 1.2–1.81; $p = 0.00022$; $n = 1879$ patients), RFS (HR = 1.2; 95% CI 1.07–1.34; $p = 0.0018$; $n = 4929$ patients), and DMFS (HR = 1.3; 95% CI 1.1–1.54; $p = 0.002$; $n = 2765$ patients) survivals. However, after adjustment on HER2, these results showed that STARD3 was not significantly associated with OS (HR = 1.17; 95% CI 0.8–1.71; $p = 0.4205$),

RFS (HR = 0.95; 95% CI 0.81–1.12; $p = 0.5334$) and DMFS (HR = 1.03; 95% CI 0.81–1.31; $p = 0.784$) survivals. Conversely, HER2 was significantly associated with RFS and DFMS (respectively $p = 0.0001$ and 0.0039) but not for OS ($p = 0.1452$). Finally, we selected a subset of patients with HER2+ breast cancer and neoadjuvant systemic treatment and found no difference in OS ($p = 0.4622$, $n = 77$ patients), RFS ($p = 0.4661$, $n = 90$ patients), and DFMS ($p = 0.074$, $n = 49$ patients).

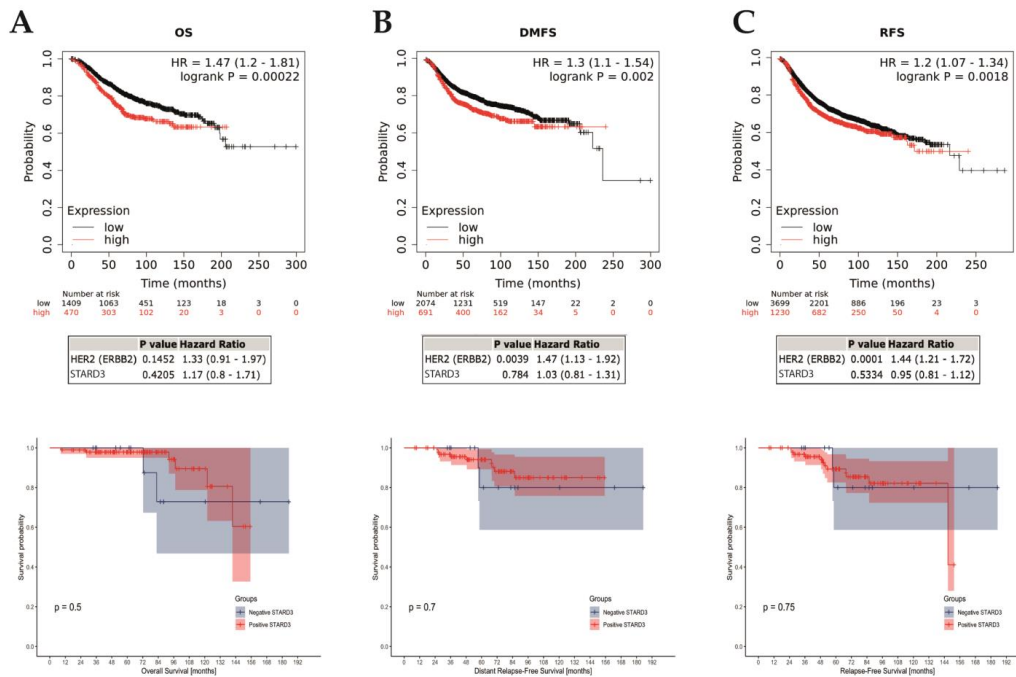


Figure 6. STARD3 prognosis. Association of STARD3 mRNA expression with survival (A): overall [OS]; (B): distant-metastasis free [DFMS]; (C): relapse-free [RFS] in a cohort of breast cancers from the Kaplan–Meier plotter (KM plotter database) in the upper row, with multivariate analysis on HER2 below. The last row shows survivals in the studied cohort. Of interest, there are cross-overs in the survival curves, which indicate a non-proportional hazard. Consequently, in this survival analysis, p -values (log-rank tests) must be interpreted with caution, given the greater risk of wrongly concluding a statistically significant difference.

Altogether, these data suggest that STARD3 expression is not associated with prognosis in HER2+ breast cancer. Considering all breast cancer subtypes, STARD3 expression is associated with a poorer prognosis, like HER2 expression. The impact of STARD3 on prognosis is not independent from HER2 oncogenic function and is likely a direct consequence of the strong association between HER2 and STARD3 co-amplification and co-expression.

4. Discussion

In this study, we assessed the predictive value of STARD3 protein expression on a cohort of primary breast cancer specimens from the HER2-positive subtype that were all treated by neoadjuvant therapy. We evaluated for the first time, to our knowledge, the association of STARD3 expression with pathological complete response (pCR) after NST.

We studied the association of STARD3 expression and breast cancer-specific survival and compared it to other relevant patient and tumor characteristics in this HER2-positive series. In addition, we describe a staining and scoring method for STARD3 expression that can be implemented in the routine practice in breast pathology laboratories.

STARD3 is expressed in most tissues at low levels. In addition, STARD3 exists in the whole animal kingdom [42]. Functional studies in cells showed that STARD3 pilots intracellular cholesterol flux from the endoplasmic reticulum to the endosomes/lysosomes [32]. Since STARD3 knock-out mice have no phenotype [43], it is thought that in normal tissues, STARD3 function is balanced by other homeostatic mechanisms regulating cholesterol distribution. Consistent with this idea, silencing STARD3 by siRNAs in HeLa cells (an endometrium HER2-negative cancer cell line) has no impact on viability and cell growth [20]. However, in HER2-amplified cancer, where STARD3 is overexpressed to high levels, functional studies showed that STARD3 silencing is associated with reduced cell growth [19–21]. All these studies are consistent and demonstrate that HER2-amplified cancer cells have a specific dependency towards STARD3 expression. It appears that in contrast to other cells, STARD3 function cannot be rescued in HER2-positive cancer cells, indicating a specific role for STARD3 in these cells. Why HER2+ cancer cells are dependent on high STARD3 expression remains unclear, but given its role in cholesterol traffic, it is postulated that STARD3 acts on HER2 cancer cells biology by modulating cholesterol homeostasis. Since STARD3 function on cholesterol rely on its localization in endosomes [32], we reasoned that only the granular staining pattern should reflect the presence of an active protein and should be considered to build an immunohistochemistry score. Of interest, this reasoning is consistent with a previous report on STARD3 protein expression in a Finnish breast cancer patient cohort. The authors suggested that the STARD3 granular (or dot-like) staining pattern should be regarded as positive [35]. In that study, STARD3 staining intensity was graded either negative, low, or high. Samples with high STARD3 expression had a granular staining pattern and were associated with HER2 positivity and reduced survival. Tumors with low expression were not different from negative tumors [35].

4.1. STARD3 and Pathological Complete Response

HER2 tumors are heterogeneous and pCR rates are higher compared to other molecular subtypes, underlying the clinical diversity of these tumors [44,45]. pCR rates found in this study are consistent with published studies with anthracycline-based regimens with trastuzumab [8–10]. This study suggests that STARD3 expression is correlated with pCR, and therefore that STARD3 may be implicated in anti-HER2 treatment sensitivity and chemo-sensitivity.

Indeed, even though it has been demonstrated that anti-HER2 therapies increase chemo-sensitivity, and despite the fact that combined chemotherapy and anti-HER2 therapy have largely improved HER2-positive breast cancer prognosis, resistances to these treatments exist. De novo and acquired resistances are frequent [12,46,47]. Several biological mechanisms explaining resistance have been implicated, such as signaling from other HER receptors, PI3K/AKT/mTOR activation, MUC4 overexpression, and expression of the p95 isoform of HER2 [48]. Recently, new anti-HER2 targeted therapies have been developed and validated in clinical practice [49], such as conjugated antibody-cytotoxic drugs. For example, trastuzumab-deruxtecan is an HER2-directed antibody-drug conjugate composed of trastuzumab and a cytotoxic topoisomerase I inhibitor [50]. In the phase III Destiny-Breast03 trial, this treatment has shown a significant advantage in terms of progression-free survival compared to T-DM1, another HER2-directed antibody-drug conjugate composed of an antimicrotubule agent attached to trastuzumab [51].

As pCR is an important prognostic factor, STARD3 expression in the initial management of HER2-positive BC could designate some cases with high probability of de novo treatment resistance, therefore providing a rationale to divert from standard medical protocol to increase the probability of pCR and eventually improve patient prognosis. In general, first and next generations of targeted therapies also have significant adverse effects,

therefore new predictive indicators of therapeutic response would be useful for patient management.

Of interest, other biomarkers are currently under investigation for predicting pCR. Among them, tumor infiltrating lymphocytes (TIL) have yielded interesting results. A study found that a high proportion of TIL (>50%) in initial biopsies was associated with higher rates of pCR (odds ratio of 6.49; $p < 0.001$) in HER2-positive breast cancer treated with taxanes-cyclophosphamide-trastuzumab-pertuzumab regimens [52]. Another study found that numerous TIL were associated with higher pCR rates in a large cohort [53]. Similarly, a secondary analysis of the NeoALTTO trial (Neoadjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization) also found an association between TIL and pCR [54]. TIL are implicated in a major hallmark of cancer [55]. We suppose that evaluating STARD3 and TIL could be complementary in pCR prediction in HER2-positive breast cancer.

4.2. STARD3 and Prognosis

To date, five clinical studies evaluating STARD3 expression in cancer investigated prognosis [35,36,56–58]. Lamy et al. [57] conducted a study including 86 patients with HER2-positive breast cancer (confirmed by in situ hybridization) with a median follow-up of 55 months. They found no association between STARD3 gene amplification (quantified by DNA polymerase chain reaction) with overall and relapse-free survival. Conversely, Vinatzer et al. [36] established a cohort of 85 patients with breast cancer (HER2 negative and positive) with a median follow-up of 10.95 years. They found a worse overall and disease-free survival in case of high STARD3 expression (quantified by RNA reverse-transcriptase polymerase chain reaction), and in patients with HER2 and STARD3 high expression, thus suggesting that STARD3 is a bad prognosis marker. However, the authors could not discriminate whether worse outcomes in HER2+/STARD3+ cases were due to HER2 or STARD3 expression, as these two genes are highly correlated. Vassilev et al. published a study including 1193 patients. Among them, 218 had HER2+ breast cancer [35]. They studied STARD3 expression with immunohistochemistry assays and divided their cohorts into three groups based on STARD3 expression: negative ($n = 538$), low ($n = 538$), and high ($n = 117$). Among HER2-positive breast cancers ($n = 213$), 16% were STARD3 negative, a proportion that is similar to this study. The authors found that high STARD3 expression was significantly associated with lower specific survival, however no adjustment was performed on HER2 positivity. Fararjeh et al. [56] conducted a study on an online database (GEPiA, gene expression profile integrative analysis) and found that high levels of STARD3 mRNA were significantly associated with worse overall and event-free survivals. Moreover, they found a significant association between STARD3 mRNA levels and worse overall survival in HER2-positive breast cancers. However, no data were shown on event-free and specific survivals among this subgroup. Finally, Li et al. recently published a study on 1641 primary breast cancers cases [58]. STARD3 expression was evaluated with immunohistochemistry assay. They found 16.6% of STARD3-positive tumors, and STARD3 expression was strongly correlated to HER2 expression. This team also found that patients with STARD3+ breast cancers had significantly lower overall survival, but no adjustment was performed on HER2 positivity.

In this study, we found that on the contrary HER2+/STARD3+ patients with NST had better overall survival compared to HER2+/STARD3– ones. This discrepancy can be explained by (1) the fact that included populations were different as this study included only HER2-positive breast cancers with NST; and (2) STARD3 was measured differently (protein expression or gene amplification/expression). In addition, this study investigated STARD3 prognostic value independently of HER2 and other significant clinical and pathological characteristics.

4.3. STARD3 as a Therapeutic Target

Given the in vitro dependence of HER2-positive cells to STARD3, and the findings of this study, STARD3 can be a possible therapeutic target in HER2-positive breast cancer.

Indeed, a STARD3 inhibitor was recently developed and tested by Lapillo et al. [59] on different cancer cell lines, including breast and colon. In the context of heterogeneity of HER2-positive breast cancers, and the frequent resistance mechanisms developed against anti-HER2 targeted therapies, a novel therapeutic target such as STARD3 may become a good alternative.

Furthermore, STARD3 could also be implicated in other HER2-positive cancers, such as ovarian, gastric, pulmonary, vesical, and prostatic cancers. Finally, STARD3 has a potential interest in other non-tumoral pathologies, such as hepatitis C and atherosclerosis. RNA interference-mediated knockdowns identified STARD3 as necessary for Hepatitis C Virus replication, as it depends on endosomal cholesterol homeostasis [60]. Additionally, it has been shown that STARD3 protein over-expression in dysregulated macrophages restores an impaired cholesterol homeostasis and induces an anti-atherogenic macrophage lipid phenotype, positing a potentially therapeutic strategy [61].

4.4. Limitations

This work has some limits. Indeed, this study was conducted in a retrospective setting, and this can lead to inclusion biases. To eliminate this possibility, we read HER2 staining in all cases, and we performed *in situ* hybridization in the case of equivocal results. As a result, seven cases were excluded after a second reading by the pathologist and were classified as HER2-negative, and because of the loss of contact with some patients during follow-up. Moreover, HER2-positivity was determined by measuring protein expression (IHC) and not HER2 gene amplification (*in situ* hybridization). Finally, the amplification status remains unknown in the majority of cases. In this cohort, we included only anthracycline-based chemotherapy, as it is the standard of care in our hospital. Therefore, these results cannot be extrapolated to other regimens. In addition, the performance of the STARD3 score resulted in a low specificity (i.e., high false positive rate). However, as false positives correspond to patients with positive STARD3 score which do not achieve pCR, they will receive standard of care treatment. On the contrary, the high sensitivity (i.e., low false negative rate) remains the most important parameter as it lowers potential risks of iatrogeny (i.e., changing NST protocol for patient who would not have achieved pCR with standard of care). Nonetheless, further investigations are needed to improve specificity, possibly with other clinical and pathological parameters. Finally, few events were recorded during the follow-up, thus limiting interpretation of the results; a longer follow-up is needed to confirm the impact of STARD3 expression on prognosis.

5. Conclusions

In the light of these findings, we believe it is of prime interest to explore the potential of STARD3 protein as a predictive marker for treatment response. STARD3 expression is able to identify a subgroup of HER2-positive BC with a high risk of no pCR and provides a rationale to investigate a distinct neoadjuvant systemic regimen in this subgroup. Future studies are needed on independent cohorts and larger numbers in a prospective setting to evaluate the impact of STARD3 expression on pCR and on prognosis.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15020362/s1>, Table S1. mRNA expression and DNA copy number for each gene on 51 different breast cancer cell lines. Data were collected from the Cancer Cell Line Encyclopedia website, Broad Institute of MIT & Harvard. Table S2. Clinical and pathological characteristics according to STARD3 expression. All the whole western blot figures can be found in the supplementary materials Figure S1.

Author Contributions: Conceptualization, C.-L.T., F.A., M.-P.C. and C.M.; methodology, C.-L.T. and F.A.; software, M.L.; validation, C.M. and M.-P.C.; formal analysis, M.L.; investigation, M.L. and L.V.; resources, C.-L.T., C.M. and M.-P.C.; data curation, M.L.; writing—original draft preparation, M.L. and L.V.; writing—review and editing, C.-L.T., F.A., N.R. and S.M.; visualization, M.L. and C.-L.T.; supervision, M.-P.C.; project administration, C.-L.T.; funding acquisition, C.-L.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from the Institut National Du Cancer INCA (INCA_9269; www.e-cancer.fr), and by grants from the Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est; <https://www.ligue-cancer.net>), the Fondation ARC (www.fondation-arc.org), and SEVE Sein et Vie. This work of the Interdisciplinary Thematic Institute IMCBio, as part of the ITI 2021-2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and Inserm, was supported by IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002), and by SFRI-STRAT'US project (ANR 20-SFRI-0012) and EUR IMCBio (ANR-17-EURE-0023) under the framework of the French Investments for the Future Program.

Institutional Review Board Statement: Human breast cancer tumors came from the tumor bank "Centre de Ressources Biologiques" (CRB) of the "Hôpitaux Universitaires de Strasbourg" (number 1970 390 v0). All the samples were collected from patients treated in the Strasbourg University Hospital. Local Ethics Committee gave its approbation for the study. This research was conducted on a cohort named SENOMETRY ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) Identifier: NCT02810093), which has received the favorable opinion of the *Committee for the Protection of Persons* (CPP) Est IV in 2016, the Institutional Review Board for the Strasbourg University Hospital. The CRB's computer file has been declared to the French *Commission Nationale Informatique et Liberté*, under the number 1187586. The samples and the associated medical data were made anonymous, enabling them to be processed automatically for research purposes.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We thank the members of the Molecular and Cellular Biology of Breast Cancer team (IGBMC), the departments of Breast Surgery and Pathology of the Strasbourg City Hospital. for helpful advice and discussions. We are especially thankful to Martine Muckensturm for her help with immunohistochemistry assays and Corinne Wendling for her help to test the anti-STARD3 antibody.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Harbeck, N.; Penault-Llorca, F.; Cortes, J.; Gnant, M.; Houssami, N.; Poortmans, P.; Ruddy, K.; Tsang, J.; Cardoso, F. Breast cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2019**, *5*, 66. [[CrossRef](#)]
2. Wolff, A.C.; Hammond, M.E.H.; Allison, K.H.; Harvey, B.E.; Mangu, P.B.; Bartlett, J.M.S.; Bilous, M.; Ellis, I.O.; Fitzgibbons, P.; Hanna, W.; et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2018**, *142*, 1364–1382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kurozumi, S.; Inoue, K.; Takei, H.; Matsumoto, H.; Kurosumi, M.; Horiguchi, J.; Takeyoshi, I.; Oyama, T. ER, PgR, Ki67, p27(Kip1), and histological grade as predictors of pathological complete response in patients with HER2-positive breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy using taxanes followed by fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide concomitant with trastuzumab. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 622. [[CrossRef](#)]
4. Samiei, S.; Simons, J.M.; Engelen, S.M.E.; Beets-Tan, R.G.H.; Classe, J.M.; Smidt, M.L. Axillary Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Systemic Therapy by Breast Cancer Subtype in Patients With Initially Clinically Node-Positive Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Surg.* **2021**, *156*, e210891. [[CrossRef](#)]
5. Schettini, F.; Pascual, T.; Conte, B.; Chic, N.; Brasó-Maristany, F.; Galván, P.; Martínez, O.; Adamo, B.; Vidal, M.; Muñoz, M.; et al. HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat. Rev.* **2020**, *84*, 101965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Baron, P.; Beitsch, P.; Boselli, D.; Symanowski, J.; Pellicane, J.V.; Beatty, J.; Richards, P.; Mislowsky, A.; Nash, C.; Lee, L.A.; et al. Impact of Tumor Size on Probability of Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann. Surg. Oncol.* **2016**, *23*, 1522–1529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sasanpour, P.; Sandoughdaran, S.; Mosavi-Jarrahi, A.; Malekzadeh, M. Predictors of Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Iranian Breast Cancer Patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2018**, *19*, 2423–2427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Buzdar, A.U.; Suman, V.J.; Meric-Bernstam, F.; Leitch, A.M.; Ellis, M.J.; Boughey, J.C.; Unzeitig, G.; Royce, M.; McCall, L.M.; Ewer, M.S.; et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC-75) followed by paclitaxel plus trastuzumab versus paclitaxel plus trastuzumab followed by FEC-75 plus trastuzumab as neoadjuvant treatment for patients with HER2-positive breast cancer (Z1041): A randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, 1317–1325. [[CrossRef](#)]

9. Robidoux, A.; Tang, G.; Rastogi, P.; Geyer, C.E.; Azar, C.A.; Atkins, J.N.; Fehrenbacher, L.; Bear, H.D.; Baez-Diaz, L.; Sarwar, S.; et al. Lapatinib as a component of neoadjuvant therapy for HER2-positive operable breast cancer (NSABP protocol B-41): An open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, 1183–1192. [[CrossRef](#)]
10. Untch, M.; Loibl, S.; Bischoff, J.; Eidtmann, H.; Kaufmann, M.; Blohmer, J.U.; Hilfrich, J.; Strumberg, D.; Fasching, P.A.; Kreienberg, R.; et al. Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): A randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 135–144. [[CrossRef](#)]
11. van der Voort, A.; van Ramshorst, M.S.; van Werkhoven, E.D.; Mandjes, I.A.; Kemper, I.; Vulink, A.J.; Oving, I.M.; Honkoop, A.H.; Tick, L.W.; van de Wouw, A.J.; et al. Three-Year Follow-up of Neoadjuvant Chemotherapy With or Without Anthracyclines in the Presence of Dual ERBB2 Blockade in Patients With ERBB2-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of the TRAIN-2 Randomized, Phase 3 Trial. *JAMA Oncol.* **2021**, *7*, 978–984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. van Ramshorst, M.S.; van der Voort, A.; van Werkhoven, E.D.; Mandjes, I.A.; Kemper, I.; Dezentjé, V.O.; Oving, I.M.; Honkoop, A.H.; Tick, L.W.; van de Wouw, A.J.; et al. Neoadjuvant chemotherapy with or without anthracyclines in the presence of dual HER2 blockade for HER2-positive breast cancer (TRAIN-2): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2018**, *19*, 1630–1640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Schneeweiss, A.; Chia, S.; Hickish, T.; Harvey, V.; Eniu, A.; Waldron-Lynch, M.; Eng-Wong, J.; Kirk, S.; Cortes, J. Long-term efficacy analysis of the randomised, phase II TRYPHAENA cardiac safety study: Evaluating pertuzumab and trastuzumab plus standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer. *Eur. J. Cancer* **2018**, *89*, 27–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bièche, I.; Tomasetto, C.; Régnier, C.H.; Moog-Lutz, C.; Rio, M.C.; Lidereau, R. Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3886–3890.
15. Tomasetto, C.; Régnier, C.; Moog-Lutz, C.; Mattei, M.G.; Chenard, M.P.; Lidereau, R.; Basset, P.; Rio, M.C. Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics* **1995**, *28*, 367–376. [[CrossRef](#)]
16. Glynn, R.W.; Miller, N.; Kerin, M.J. 17q12–21—The pursuit of targeted therapy in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2010**, *36*, 224–229. [[CrossRef](#)]
17. Jacot, W.; Fiche, M.; Zaman, K.; Wolfer, A.; Lamy, P.J. The HER2 amplicon in breast cancer: Topoisomerase IIA and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1836*, 146–157. [[CrossRef](#)]
18. Kauraniemi, P.; Kallioniemi, A. Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. *Endocr.-Relat. Cancer* **2006**, *13*, 39–49. [[CrossRef](#)]
19. Kao, J.; Pollack, J.R. RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes. *Genes Chromosom. Cancer* **2006**, *45*, 761–769. [[CrossRef](#)]
20. Alpy, F.; Tomasetto, C.L. STARD3: A lipid transfer protein in breast cancer and cholesterol trafficking. In *Cholesterol Transporters of the START Domain Protein Family in Health and Disease: START Proteins-Structure and Function*; Springer: New York, NY, USA, 2014; pp. 119–138. [[CrossRef](#)]
21. Sahlberg, K.K.; Hongisto, V.; Edgren, H.; Makela, R.; Hellstrom, K.; Due, E.U.; Moen Vollan, H.K.; Sahlberg, N.; Wolf, M.; Borresen-Dale, A.L.; et al. The HER2 amplicon includes several genes required for the growth and survival of HER2 positive breast cancer cells. *Mol. Oncol.* **2013**, *7*, 392–401. [[CrossRef](#)]
22. Barretina, J.; Caponigro, G.; Stransky, N.; Venkatesan, K.; Margolin, A.A.; Kim, S.; Wilson, C.J.; Lehar, J.; Kryukov, G.V.; Sonkin, D.; et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **2012**, *483*, 603–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022.
24. Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2012**, *490*, 61–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Edgar, R.; Domrachev, M.; Lash, A.E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 207–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Triulzi, T.; De Cecco, L.; Sandri, M.; Prat, A.; Giussani, M.; Paolini, B.; Carcangiu, M.L.; Canevari, S.; Bottini, A.; Balsari, A.; et al. Whole-transcriptome analysis links trastuzumab sensitivity of breast tumors to both HER2 dependence and immune cell infiltration. *Oncotarget* **2015**, *6*, 28173–28182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. de Ronde, J.J.; Rigai, G.; Rottenberg, S.; Rodenhuis, S.; Wessels, L.F. Identifying subgroup markers in heterogeneous populations. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e200. [[CrossRef](#)]
28. von Elm, E.; Altman, D.G.; Egger, M.; Pocock, S.J.; Gotsche, P.C.; Vandenbroucke, J.P.; Initiative, S. The Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: Guidelines for reporting observational studies. *J. Clin. Epidemiol.* **2008**, *61*, 344–349. [[CrossRef](#)]
29. WHO. *Classification of Tumours: Breast Tumours*, 5th ed.; WHO: Geneva, Switzerland, 2019; Volume 2.
30. Allison, K.H.; Hammond, M.E.H.; Dowsett, M.; McKernin, S.E.; Carey, L.A.; Fitzgibbons, P.L.; Hayes, D.F.; Lakhani, S.R.; Chavez-MacGregor, M.; Perlmutter, J.; et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 1346–1366. [[CrossRef](#)]

31. Robbins, P.; Pinder, S.; de Klerk, N.; Dawkins, H.; Harvey, J.; Sterrett, G.; Ellis, I.; Elston, C. Histological grading of breast carcinomas: A study of interobserver agreement. *Hum. Pathol.* **1995**, *26*, 873–879. [[CrossRef](#)]
32. Wilhelm, L.P.; Wendling, C.; Vedie, B.; Kobayashi, T.; Chenard, M.P.; Tomasetto, C.; Drin, G.; Alpy, F. STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *EMBO J.* **2017**, *36*, 1412–1433. [[CrossRef](#)]
33. Vogelstein, B.; Papadopoulos, N.; Velculescu, V.E.; Zhou, S.; Diaz, L.A., Jr.; Kinzler, K.W. Cancer genome landscapes. *Science* **2013**, *339*, 1546–1558. [[CrossRef](#)]
34. Alpy, F.; Boulay, A.; Moog-Lutz, C.; Andarawewa, K.L.; Degot, S.; Stoll, I.; Rio, M.C.; Tomasetto, C. Metastatic lymph node 64 (MLN64), a gene overexpressed in breast cancers, is regulated by Sp/KLF transcription factors. *Oncogene* **2003**, *22*, 3770–3780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Vassilev, B.; Sihto, H.; Li, S.; Holtta-Vuori, M.; Ilola, J.; Lundin, J.; Isola, J.; Kellokumpu-Lehtinen, P.L.; Joensuu, H.; Ikonen, E. Elevated levels of StAR-related lipid transfer protein 3 alter cholesterol balance and adhesiveness of breast cancer cells: Potential mechanisms contributing to progression of HER2-positive breast cancers. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 987–1000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Vinatzer, U.; Dampier, B.; Streubel, B.; Pacher, M.; Seewald, M.J.; Stratowa, C.; Kaserer, K.; Schreiber, M. Expression of HER2 and the coamplified genes GRB7 and MLN64 in human breast cancer: Quantitative real-time reverse transcription-PCR as a diagnostic alternative to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 8348–8357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Alpy, F.; Tomasetto, C. START ships lipids across interorganelle space. *Biochimie* **2014**, *96*, 85–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Alpy, F.; Stoeckel, M.E.; Dierich, A.; Escola, J.M.; Wendling, C.; Chenard, M.P.; Vanier, M.T.; Gruenberg, J.; Tomasetto, C.; Rio, M.C. The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4261–4269. [[CrossRef](#)]
39. Latta, E.K.; Tjan, S.; Parkes, R.K.; O'Malley, F.P. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod. Pathol.* **2002**, *15*, 1318–1325. [[CrossRef](#)]
40. Vincent-Salomon, A.; Lucchesi, C.; Gruel, N.; Raynal, V.; Pierron, G.; Goudefroye, R.; Rey, F.; Radvanyi, F.; Salmon, R.; Thiery, J.P.; et al. Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1956–1965. [[CrossRef](#)]
41. Lanczky, A.; Györfy, B. Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation. *J. Med. Internet Res.* **2021**, *23*, e27633. [[CrossRef](#)]
42. Voilquin, L.; Lodi, M.; Di Mattia, T.; Chenard, M.-P.; Mathelin, C.; Alpy, F.; Tomasetto, C. STARD3: A Swiss Army Knife for Intracellular Cholesterol Transport. *Contact* **2019**, *2*, 251525641985673. [[CrossRef](#)]
43. Kishida, T.; Kostetskii, I.; Zhang, Z.; Martinez, F.; Liu, P.; Walkley, S.U.; Dwyer, N.K.; Blanchette-Mackie, E.J.; Radice, G.L.; Strauss, J.F., 3rd. Targeted mutation of the MLN64 START domain causes only modest alterations in cellular sterol metabolism. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19276–19285. [[CrossRef](#)]
44. Garrett, J.T.; Arteaga, C.L. Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: Mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *11*, 793–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pohlmann, P.R.; Mayer, I.A.; Mernaugh, R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 7479–7491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gianni, L.; Eiermann, W.; Semiglazov, V.; Manikhas, A.; Lluch, A.; Tjulandin, S.; Zambetti, M.; Vazquez, F.; Byakhov, M.; Lichinitser, M.; et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): A randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet* **2010**, *375*, 377–384. [[CrossRef](#)]
47. Romond, E.H.; Perez, E.A.; Bryant, J.; Suman, V.J.; Geyer, C.E., Jr.; Davidson, N.E.; Tan-Chiu, E.; Martino, S.; Paik, S.; Kaufman, P.A.; et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1673–1684. [[CrossRef](#)]
48. Lavaud, P.; Andre, F. Strategies to overcome trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancers: Focus on new data from clinical trials. *BMC Med.* **2014**, *12*, 132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Giordano, S.H.; Franzoi, M.A.B.; Temin, S.; Anders, C.K.; Chandralapaty, S.; Crews, J.R.; Kirshner, J.J.; Krop, I.E.; Lin, N.U.; Morikawa, A.; et al. Systemic Therapy for Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: ASCO Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* **2022**, *40*, 2612–2635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Modi, S.; Saura, C.; Yamashita, T.; Park, Y.H.; Kim, S.B.; Tamura, K.; Andre, F.; Iwata, H.; Ito, Y.; Tsurutani, J.; et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 610–621. [[CrossRef](#)]
51. Cortes, J.; Kim, S.B.; Chung, W.P.; Im, S.A.; Park, Y.H.; Hegg, R.; Kim, M.H.; Tseng, L.M.; Petry, V.; Chung, C.F.; et al. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1143–1154. [[CrossRef](#)]
52. Hwang, H.W.; Jung, H.; Hyeon, J.; Park, Y.H.; Ahn, J.S.; Im, Y.H.; Nam, S.J.; Kim, S.W.; Lee, J.E.; Yu, J.H.; et al. A nomogram to predict pathologic complete response (pCR) and the value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2019**, *173*, 255–266. [[CrossRef](#)]
53. Denkert, C.; von Minckwitz, G.; Darb-Esfahani, S.; Lederer, B.; Heppner, B.I.; Weber, K.E.; Budczies, J.; Huober, J.; Klauschen, F.; Furlanetto, J.; 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*, 40–50. [[CrossRef](#)]

54. Salgado, R.; Denkert, C.; Campbell, C.; Savas, P.; Nuciforo, P.; Aura, C.; de Azambuja, E.; Eidtmann, H.; Ellis, C.E.; Baselga, J.; et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA Oncol.* **2015**, *1*, 448–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Fararjeh, A.F.S.; Al Khader, A.; Kaddumi, E.; Obeidat, M.; Al-Fawares, O.I. Differential Expression and Prognostic Significance of STARD3 Gene in Breast Carcinoma. *Int. J. Mol. Cell. Med.* **2021**, *10*, 34–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Lamy, P.J.; Fina, F.; Bascoul-Mollevi, C.; Laberrenne, A.C.; Martin, P.M.; Ouafik, L.; Jacot, W. Quantification and clinical relevance of gene amplification at chromosome 17q12-q21 in human epidermal growth factor receptor 2-amplified breast cancers. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, R15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Li, P.; Zhang, Z.; Lv, H.; Sun, P. Inhibiting the expression of STARD3 induced apoptosis via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway on ER⁺ breast cancer. *Tissue Cell* **2022**, *79*, 101971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Lapillo, M.; Salis, B.; Palazzolo, S.; Poli, G.; Granchi, C.; Minutolo, F.; Rotonondo, R.; Caligiuri, I.; Canzonieri, V.; Tuccinardi, T.; et al. First-of-its-kind STARD3 Inhibitor: In Silico Identification and Biological Evaluation as Anticancer Agent. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 475–480. [[CrossRef](#)]
60. Stoeck, I.K.; Lee, J.Y.; Tabata, K.; Romero-Brey, I.; Paul, D.; Schult, P.; Lohmann, V.; Kaderali, L.; Bartenschlager, R. Hepatitis C Virus Replication Depends on Endosomal Cholesterol Homeostasis. *J. Virol.* **2018**, *92*, e01196-17. [[CrossRef](#)]
61. Borthwick, F.; Allen, A.M.; Taylor, J.M.; Graham, A. Overexpression of STARD3 in human monocyte/macrophages induces an anti-atherogenic lipid phenotype. *Clin. Sci.* **2010**, *119*, 265–272. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3.5. Valeur diagnostique de STARD3 dans les HER2 score

2+

La plus petite région d'amplification de HER2 (amplicon HER2) (143) contient plusieurs gènes co-exprimés et co-amplifiés avec *HER2* (230) dont le gène *STARD3*. Étant donné cette association au niveau génétique, nous nous sommes interrogés si la présence d'une expression de STARD3 au niveau de la cellule tumorale permettait, en cas d'expression intermédiaire d'HER2, de discriminer les cas HER2-amplifiés des autres.

3.5.1. Constitution de la cohorte

Pour cela, nous avons conduit une étude rétrospective monocentrique de patientes atteintes d'un cancer du sein infiltrant diagnostiquées aux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Patiente majeure ayant une microbiopsie analysée dans le département de pathologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg à partir du 1^{er} janvier 2010.
- Ayant donné son consentement éclairé
- Ayant eu une évaluation de l'expression d'HER2 par immunohistochimie et dont le résultat était un score 2+
- Ayant eu une évaluation de l'amplification d'HER2 par hybridation in situ (silver in situ hybridization, SISH)

L'expression de STARD3 a été évaluée selon les mêmes modalités décrites dans la partie « 3.2.

Quantification immunohistochimique de STARD3 dans le cancer du sein HER2+ ». La démarche a suivi les recommandations Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) (251). Notre objectif était d'évaluer si l'expression de STARD3 en immunohistochimie était associée à l'amplification d'HER2 à la SISH.

3.5.2. Paramètres associés à l'amplification d'HER2 en SISH

Au total, 104 patientes consécutives présentant un score HER2 2+ et ayant eu une SISH ont été incluses dans l'étude (Tableau XV). Parmi l'ensemble, 45 avaient une amplification d'HER2, et 59 une absence d'amplification. En analyse univariée, le grade SBR élevé était associé à l'amplification d'HER2 ($p = 0,027$), ainsi que le H-Score RP faible (0,043).

Tableau XV. Paramètres associés à l'amplification d'HER2 dans la cohorte d'étude de la valeur diagnostique de STARD3

	Amplification d'HER2 (N=45)	Absence d'amplification d'HER2 (N=59)	Total (N=104)	P- valeur
Sous-type histologique				
Canalaire	40 (88.9%)	47 (79.7%)	87 (83.7%)	0.335
Lobulaire	4 (8.9%)	4 (6.8%)	8 (7.7%)	
Mixte	1 (2.2%)	4 (6.8%)	5 (4.8%)	
Mucineux	0 (0.0%)	1 (1.7%)	1 (1.0%)	
Tubuleux	0 (0.0%)	3 (5.1%)	3 (2.9%)	
Grade tumoral (SBR)				
1	2 (4.4%)	10 (16.9%)	12 (11.5%)	0.027
2	21 (46.7%)	33 (55.9%)	54 (51.9%)	
3	22 (48.9%)	16 (27.1%)	38 (36.5%)	
Récepteurs aux estrogènes (H-score)				
Moyenne	238.9	233.5	235.8	0.814
Écart-type	109.9	120.9	115.7	
Récepteurs à la progestérone (H-score)				
Mean (SD)	89.5	138.6	117.4	0.043
Range	108.5	130.0	123.0	
Ki67				
Moyenne	28.5	23.8	25.8	0.142
Écart-type	14.2	17.2	16.1	

3.5.3. Analyse immunohistochimique de STARD3

Nous avons ensuite analysé quels paramètres du score STARD3 étaient associés à l'amplification d'HER2 dans les cas où un HER2 score 2+ était retrouvé en IHC (Tableau XVI). L'intensité moyenne de STARD3 était significativement plus importante en cas d'amplification d'HER2 (1,3 *versus* 0,66, $p < 0,001$). De même, le signal avait une distribution granulaire plus fréquente en cas d'amplification d'HER2 (68,9% *versus* 23,7%, $p < 0,001$). Le taux de cellules positives pour STARD3 était également plus important en cas d'amplification (86,1% *versus* 65,0%, $p = 0,012$). La

distribution intracellulaire du signal n'était pas significativement différente entre les deux groupes (p =0,066).

Tableau XVI. Paramètres de l'expression de STARD3 selon l'amplification d'HER2 à la SISH en cas d'HER2 score 2+

	Amplification d'HER2 (N=45)	Absence d'amplification d'HER2 (N=59)	Total (N=104)	P- valeur
Intensité du signal STARD3				
Moyenne (ET)	1.300 (0.710)	0.661 (0.679)	0.938 (0.759)	<
Intervalle	0.000 - 3.000	0.000 - 3.000	0.000 - 3.000	0.001
Distribution granulaire du signal STARD3				
Non	14 (31.1%)	45 (76.3%)	59 (56.7%)	<
Oui	31 (68.9%)	14 (23.7%)	45 (43.3%)	0.001
Pourcentage de cellules STARD3+				
Moyenne (ET)	86.111 (34.359)	65.000 (46.396)	74.135 (42.742)	0.012
Intervalle	0.000 - 100.000	0.000 - 100.000	0.000 - 100.000	
Distribution intracellulaire du signal STARD3				
Absent	6 (13.3%)	19 (32.2%)	25 (24.0%)	0.066
Diffus	29 (64.4%)	27 (45.8%)	56 (53.8%)	
Marginalisé	10 (22.2%)	13 (22.0%)	23 (22.1%)	

Au total, dans cette cohorte de 104 cas HER2 score 2+, les paramètres histologiques et immunohistochimiques associés à l'amplification d'HER2 en SISH étaient le grade élevé, le H-Score RP faible, l'intensité du signal STARD3, sa distribution granulaire et la proportion élevée de cellules tumorales STARD3+.

3.5.4. Analyse multivariée

Nous avons ensuite réalisé une analyse multivariée en incluant les paramètres significatifs en analyse univariée (p < 0,2) ou cliniquement pertinents, afin d'étudier chaque paramètre de manière indépendante. Le Tableau XVII décrit cette analyse

multivariée.

Tableau XVII. Analyse multivariée des paramètres immunohistochimiques associés avec l'amplification d'HER2

Paramètre	Odds-Ratio	Intervalle de confiance à 95%	de P-valeur
RE- (H-score < 10)	0.33	0.06 – 1.51	0.165
RP- (H-score < 10)	1.15	0.33 – 3.95	0.818
Grade SBR III	3.12	0.96 – 10.7	0.060
Ki67 \geq 30%	0.96	0.27 – 3.15	0.957
STARD3 granulaire	12.3	2.29 – 84.9	0.005
Intensité de STARD3	2.12	0.68 – 7.33	0.206
Pourcentage de cellules STARD3+	1.06	0.97 – 1.23	0.330

On note que, après ajustement sur l'expression des récepteurs hormonaux, le grade SBR et le Ki67, la distribution granulaire de STARD3 était fortement associée à une amplification d'HER2 à la SISH (Odds Ratio = 12,4, IC95% 2,3 - 84,9, p = 0,005). En revanche, l'intensité, la localisation intracytoplasmique et la proportion de cellules tumorales STARD3+ n'étaient pas associées de manière indépendante à l'amplification d'HER2 en SISH.

Au total, parmi les différentes variables histologiques et immunohistochimiques réalisées sur microbiopsies, seul le signal granulaire de STARD3 est fortement associé à l'amplification d'HER2 diagnostiquée à la SISH. A partir de ces observations, nous avons souhaité étudier quelles étaient les performances du score immunohistochimique de STARD3 dans la prédiction de l'amplification d'HER2 à la SISH.

3.5.5. Corrélation entre le signal granulaire de STARD3 et le nombre de copies d'HER2

Nous avons ensuite analysé le lien entre le nombre de copies d'HER2 comptées à la SISH et l'expression de STARD3. La Figure 23 résume la distribution du nombre de copies d'HER2 selon le statut STARD3 (défini par la présence d'un signal granulaire en immunohistochimie). A partir de 6 copies, la SISH est considérée comme amplifiée. Le nombre moyen de copies d'HER2 était plus important en cas de signal granulaire (5,749 versus 3,944, $p < 0,001$), et ceci de manière statistiquement significative.

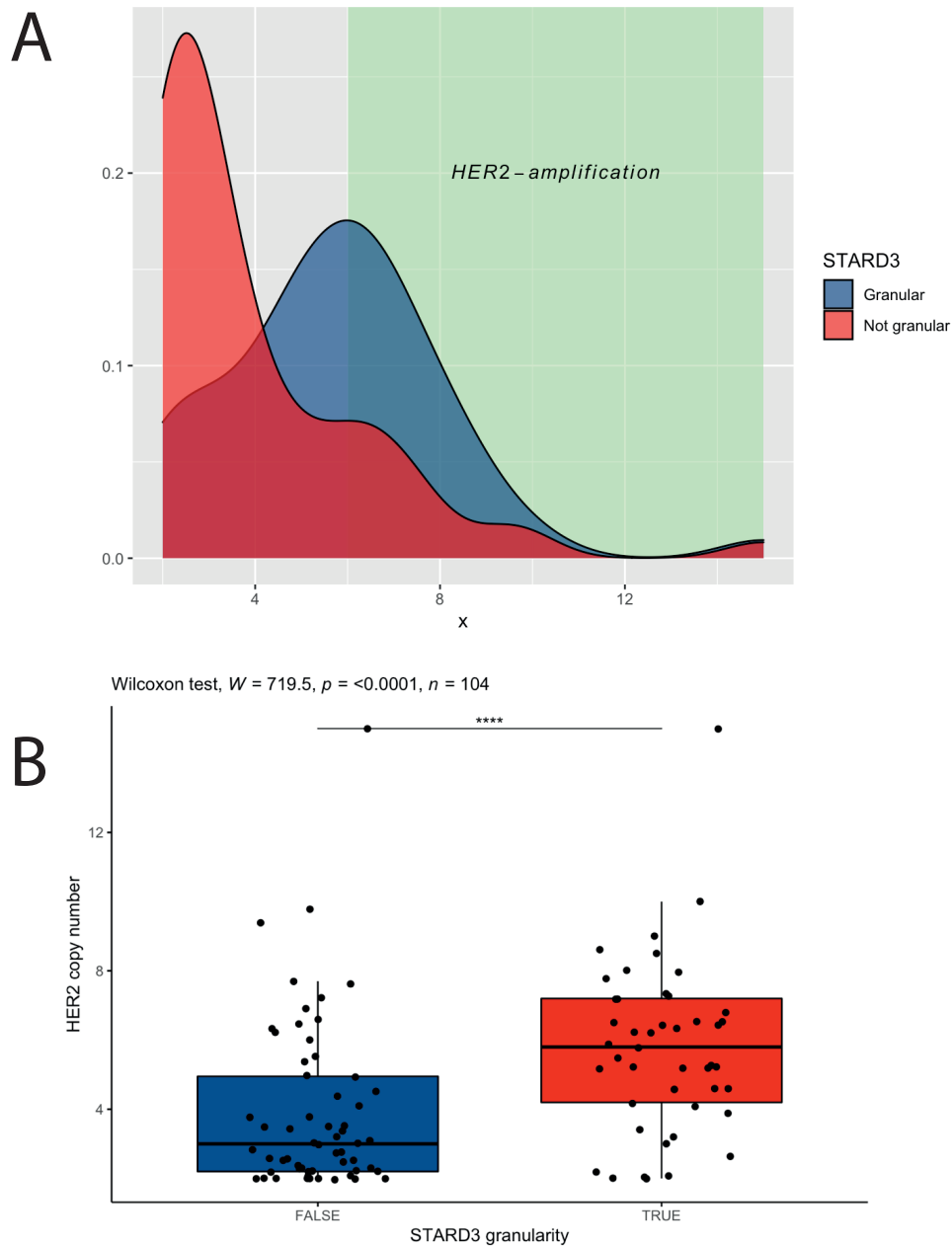


Figure 23. Distribution du nombre de copies d'HER2 selon la présence d'un signal granulaire STARD3 en cas de HER2 score 2+

Ensuite, nous avons analysé les cas avec un nombre de copies entre 4 et 6, situation où le rapport HER2/CYP17 est nécessaire pour déterminer l'amplification d'HER2. Si le rapport est supérieur à 2, HER2 est considéré comme amplifié. Au total, 21 patientes sur les 104 initiales avaient un nombre de copies entre 4 et 6 (Tableau

XVIII). Il n'y avait pas de différence statistiquement significative selon la présence d'un signal granulaire de STARD3 concernant le nombre de copies d'HER2 ($p = 0,402$) et le ratio HER2/CYP17 ($p = 0,14$).

Tableau XVIII. Résultats des paramètres de la SISH selon la granularité du signal de STARD3 en cas de HER2 score 2+ et nombre de copies d'HER2 entre 4 et 6

	Signal STARD3 non granulaire (N=7)	Signal STARD3 granulaire (N=14)	Total (N=21)	P-valeur
Copies d'HER2				
Moyenne (ET)	4.829 (0.522)	5.043 (0.547)	4.971 (0.536)	0.402
Intervalle	4.100 - 5.500	4.100 - 5.900	4.100 - 5.900	
Rapport HER2/CYP17				
Moyenne (ET)	1.943 (0.503)	2.393 (0.658)	2.243 (0.636)	0.129
Intervalle	1.500 - 2.800	1.200 - 3.200	1.200 - 3.200	

Au total, l'expression granulaire de STARD3 en immunohistochimie semble être associée à l'amplification d'HER2 en SISH dans les cas HER2 score 2+, et ceci de manière indépendante des autres caractéristiques histologiques et immunohistochimiques disponibles au diagnostic. En effet, une tumeur HER2 score 2+ STARD3+ (définie comme ayant un signal granulaire) a 12 fois plus de probabilités d'être amplifiée en SISH qu'une tumeur HER2 score 2+ STARD3-. Cette association semble être due au fait que le signal STARD3 granulaire est associé à un nombre plus important de copies d'HER2, toutefois il n'y a pas de différences dans les cas intermédiaires (4 à 6 copies) où le rapport HER2/CYP17 est nécessaire pour affirmer ou infirmer l'amplification d'HER2.

3.5.6. Performances diagnostiques de STARD3

En cas de score immunohistochimique HER2 2+, la présence d'un signal granulaire de STARD3 suggère une probabilité nettement plus importante que la SISH soit amplifiée. Afin d'évaluer la possibilité d'utiliser le marquage immunohistochimique de STARD3 en tant que marqueur diagnostique de l'amplification d'HER2, nous avons réalisé une analyse des performances de ce test en le comparant au gold standard : la recherche d'amplification à la SISH.

Le Tableau XIX détaille les résultats de STARD3 en tant que marqueur diagnostique dans cette population, et le Tableau XX les performances diagnostiques.

Tableau XIX. Table de contingence de la valeur diagnostique du signal granulaire de STARD3 en cas d'HER2 score 2+

	Amplification à la SISH (Condition +)	Absence d'amplification à la SISH(Condition -)	Total
Signal STARD3 granulaire (Test +)	31	14	45
Signal STARD3 non granulaire (Test -)	14	45	59
Total	45	59	104

Tableau XX. Performances du signal granulaire de STARD3 en cas d'HER2 score 2+

Paramètre	Estimation	Intervalle de confiance à 95%
Sensibilité	69%	53% – 82%
Spécificité	76%	63% – 86%
Valeur prédictive positive	69%	53% – 82%
Valeur prédictive négative	76%	63% – 86%
Rapport de vraisemblance positif	2,90	1,76 – 4,78
Rapport de vraisemblance négatif	0,41	0,26 – 0,64
Proportion de classifications correctes	73%	63% – 81%

Les résultats sur cette cohorte rétrospective ont montré une sensibilité correcte (69%), qui traduit la capacité du score STARD3 à détecter les cas amplifiés à la SISH.

De même, la spécificité est bonne (76%), ce qui traduit un taux faible de faux positifs (signal granulaire mais absence d'amplification d'HER2). La valeur prédictive négative est élevée (76%), c'est-à-dire que la probabilité d'une non-amplification est élevée en cas d'absence de signal granulaire. La valeur prédictive positive est à 69%, ce qui traduit la probabilité d'avoir une amplification en cas de signal STARD3 granulaire. Ces données sont à mettre en rapport avec la prévalence d'amplifications d'HER2 à la SISH à 43% dans cette cohorte, par conséquent la valeur prédictive négative est d'autant plus intéressante en pratique clinique.

En conclusion, le signal granulaire de STARD3 seul a des performances intéressantes en pratique clinique, toutefois pas assez importantes pour pouvoir remplacer la SISH en cas de score 2+ à ce jour.

3.5.7. Développement d'un score multi-paramétrique de prédiction de l'amplification d'HER2 en cas de score immunohistochimique 2+

Afin d'explorer les liens entre les paramètres immunohistochimiques classiques, STARD3 et l'amplification d'HER2 à la SISH, nous avons réalisé analyse supervisée par machine learning. L'objectif était de rechercher si dans un sous-groupe des tumeurs HER2 score 2+ STARD3 avait une meilleure performance de prédiction. Parmi les patientes de cette cohorte, nous avons entraîné un algorithme « RPRT » (Recursive Partitioning and Regression Trees) en lui fournissant les données précédemment décrites. La variable cible était l'amplification d'HER2 à la SISH (variable binaire), et l'algorithme était libre de choisir parmi les différentes variables explicatives

précédemment décrites afin de trouver la « meilleure » solution au problème de classification. Les résultats ont été présentés sous forme d'arbre décisionnel afin d'obtenir une meilleure compréhension (Figure 24). Les variables situées le plus en haut (le plus vers les « racines » de l'arbre) ont un poids décisionnel plus important. A partir de cet arbre on peut observer qu'en cas d'HER2 score 2+ :

- Les tumeurs STARD3- ET Ki67 < 11% : 100% sont non amplifiées
- Les tumeurs STARD3- ; Ki67 > 10% ET RP H-Score ≥ 200 : 80% sont non amplifiées
- Les tumeurs STARD3- ; Ki67 > 10% ; RP H-Score ≥ 200 ET RE H-Score < 240 : 83% sont non amplifiées

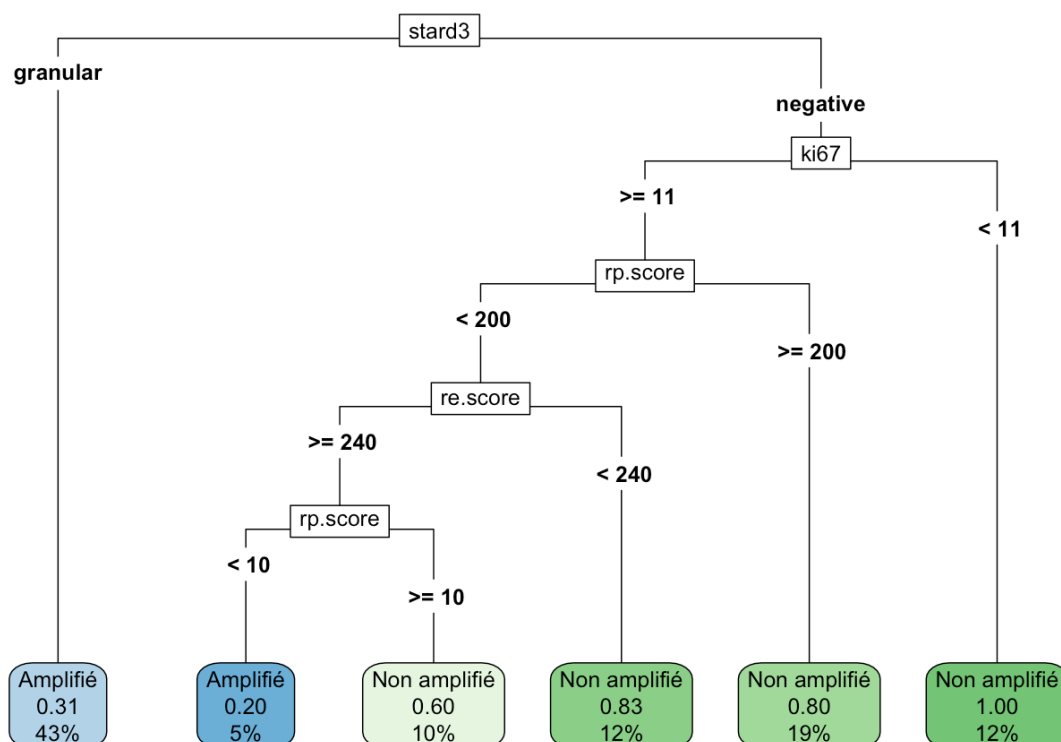


Figure 24. Arbre décisionnel obtenu à partir de l'algorithme pour la classification des tumeurs amplifiées ou non en cas de score HER2 2+

En conclusion, bien que les performances du signal granulaire de STARD3 pris de manière isolée soient insuffisantes en comparaison à la SISH, il pourrait y avoir un intérêt dans certains sous-groupes spécifiques : notamment en cas de Ki67 faible. En effet, dans cette cohorte rétrospective, en cas de Ki67 faible, s'il n'y avait pas de signal granulaire de STARD3, il n'y avait pas d'amplification d'HER2. Des études supplémentaires sont nécessaires dans ce contexte.

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans cette thèse, nous avons pu évaluer l'impact clinique de l'expression de STARD3 dans le cancer du sein HER2+ chez la femme sous différentes formes : son intérêt prédictif de la réponse au traitement systémique néoadjuvant, sa valeur pronostique, ainsi que sa valeur diagnostique. Nous avons pu également étudier la vulnérabilité de HER2 à STARD3 dans des modèles précliniques, l'impact du traitement systémique néoadjuvant sur l'expression de STARD3 ainsi que les conséquences sur le pronostic.

4.1. La prédiction de la réponse thérapeutique avec STARD3

Les tumeurs HER2 sont hétérogènes et les taux de pCR sont plus élevés que ceux des autres sous-types moléculaires, ce qui explique la diversité clinique de ces tumeurs (254, 255). Les taux de pCR trouvés dans cette thèse sont cohérents avec les études publiées employant des traitements similaires aux nôtres à base d'anthracycline et de trastuzumab (256, 257, 258). Nos résultats indiquent que l'expression de STARD3 est corrélée à la pCR, et donc que STARD3 pourrait être impliqué dans la sensibilité aux traitements anti-HER2 et à la chimiosensibilité.

4.1.1. Modifications du protocole du traitement systémique néoadjuvant

Même s'il a été démontré que les thérapies anti-HER2 augmentent la chimiosensibilité et même si l'association de la chimiothérapie et de la thérapie anti-HER2 a largement amélioré le pronostic du cancer du sein HER2-positif, il existe des

résistances à ces traitements. Les résistances *de novo* et acquises sont fréquentes (155, 203, 259). La pCR étant un facteur pronostique important, l'expression de STARD3 dans la prise en charge initiale du cancer du sein HER2-positif pourrait permettre d'individualiser certains cas avec une forte probabilité de résistance au traitement *de novo*, et donc fournir une justification pour s'écarter du protocole médical standard afin d'augmenter la probabilité de pCR, et finalement améliorer le pronostic de la patiente. Par ailleurs, les thérapies ciblées anti-HER2 ont également des effets indésirables importants, par conséquent de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la réponse thérapeutique seraient utiles pour limiter également l'utilisation de certaines thérapies à plus haut risque d'effets indésirables.

Néanmoins, pour l'instant on ne dispose pas de données sur l'impact de l'expression de STARD3 sur la réponse thérapeutique à d'autres protocoles que celui présenté dans cette thèse (anthracyclines-taxanes-trastuzumab). Il est maintenant nécessaire d'évaluer la valeur prédictive de STARD3 avec l'utilisation d'autres protocoles thérapeutiques en situation néoadjuvante, notamment ceux sans anthracyclines et ceux avec un double blocage anti-HER2 (pertuzumab).

Il serait également intéressant d'évaluer la valeur prédictive de STARD3 chez les patientes en situation métastatique, où l'on dispose généralement d'une microbiopsie initiale sur laquelle STARD3 pourrait être évalué, et chez qui les traitements comprennent également des anticorps conjugués anti-HER2 (trastuzumab-emtansine et trastuzumab-deruxtecan). Ceci pourrait nous donner l'information de la réponse thérapeutique selon l'expression de STARD3 avec ces traitements.

Ces nouvelles données semblent être nécessaires avant la mise en place d'une évaluation prospective et une éventuelle utilisation en pratique clinique.

4.1.2. Modifications de la séquence thérapeutique initiale

Hors situation métastatique, l'intérêt prédictif de STARD3 demeure limité pour choisir la séquence thérapeutique initiale (traitement systémique néoadjuvant *versus* chirurgie première). En effet, un des intérêts du TSN est de réduire la taille tumorale afin de permettre d'une part une chirurgie moins lourde. Toutefois, l'absence de pCR n'équivaut pas à une absence de réponse thérapeutique, puisque dans cette étude dans la majorité des tumeurs STARD3- on notait une diminution de la taille tumorale après TSN. Cette diminution de taille, même modeste, rend la prise en charge chirurgicale plus aisée au niveau de l'aire mammaire. Au niveau du creux axillaire, l'intérêt d'avoir un marqueur prédictif de la réponse en cas d'atteinte ganglionnaire prouvée serait de discuter d'une désescalade de la prise en charge chirurgicale du creux axillaire, qui pour l'instant est en cours d'investigation et n'est pas applicable en pratique courante.

4.1.3. Les autres moyens de prédiction de la réponse thérapeutique

Différentes méthodes de prédiction de la pCR ont été développées et étudiées ces dernières années. La partie « 1.3.3.4 Prédiction : méthodes actuellement disponibles » en page 104 résume les données de la littérature sur ce sujet. Ces approches sont d'une part basées sur l'analyse des données d'imagerie par intelligence artificielle et d'autre part sur l'analyse de certains biomarqueurs prédictifs. L'avantage de cette deuxième

approche est la possibilité de pouvoir réaliser la prédiction du risque de non réponse a priori, avant l'administration de tout traitement. A l'inverse, l'analyse des données d'imagerie permet de corréler la réponse radiologique complète à la réponse histologique complète.

Comme nous l'avons vu dans les résultats de cette thèse, la valeur de STARD3 dans ce domaine est majeure, et pourrait constituer à elle seule une approche future pour la prédiction de la pCR. Toutefois, l'utilisation de scores combinés pourrait être d'autant plus performante, puisque les résultats des scores prédictifs étaient meilleurs en cas d'utilisation de STARD3 avec les paramètres cliniques et histologiques initiaux. On peut donc supposer que l'utilisation de STARD3 avec des biomarqueurs plus performants que les caractéristiques initiales cliniques et histologiques « standard » (tels que les TILs) pourrait être complémentaire et mérite la réalisation de nouvelles études prospectives.

4.2. STARD3 est-il un marqueur de mauvais pronostic ?

À ce jour, cinq études cliniques évaluant l'expression de STARD3 dans le cancer ont étudié le pronostic (237, 260, 261, 262, 263). Lamy *et al.* (261) ont mené une étude sur 86 patientes atteintes d'un cancer du sein HER2-positif (confirmé par hybridation *in situ*) avec un suivi médian de 55 mois. Ils n'ont trouvé aucune association entre l'amplification du gène STARD3 (quantifiée par PCR) et la survie globale et la survie sans rechute.

À l'inverse, Vinatzer *et al.* (237) ont constitué une cohorte de 85 patientes

atteintes d'un cancer du sein (HER2-négatif et positif) avec un suivi médian de 10,95 ans. Ils ont constaté une plus mauvaise survie globale et sans récurrence en cas de forte expression de STARD3 (quantifiée par PCR sur l'ARN), ainsi que chez les patientes présentant une forte expression de HER2 et de STARD3, suggérant ainsi que STARD3 est un marqueur de mauvais pronostic. Cependant, les auteurs n'ont pas pu déterminer si les résultats plus défavorables dans les cas HER2+/STARD3+ étaient dus à l'expression de HER2 ou de STARD3, étant donné que ces deux gènes sont fortement corrélés.

Vassilev *et al.* ont publié une étude portant sur 1193 patientes, dont 218 avaient un cancer du sein HER2+ (263). Ils ont étudié l'expression de STARD3 par immunohistochimie et ont divisé leur cohorte en trois groupes en fonction de l'expression de STARD3 : négatif (n = 538), faible (n = 538) et élevé (n = 117). Parmi les cancers du sein HER2-positifs (n = 213), 16% étaient STARD3 négatifs, une proportion similaire à celle de cette étude. Les auteurs ont constaté qu'une forte expression de STARD3 était significativement associée à une survie spécifique plus faible, mais aucun ajustement n'a été effectué sur la positivité de HER2.

Fararjeh *et al.* (260) ont mené une étude sur une base de données en ligne (GEPIA, gene expression profile integrative analysis) et ont constaté que des niveaux élevés d'ARNm STARD3 étaient significativement associés à des survies globales et sans maladie plus faibles. En outre, ils ont trouvé une association significative entre les niveaux d'ARNm STARD3 et une moins bonne survie globale dans les cancers du sein HER2-positifs. Cependant, aucune donnée n'a été montrée sur les survies sans maladie

et les survies spécifiques dans ce sous-groupe.

Enfin, Li *et al.* ont publié une étude portant sur 1641 cas de cancers du sein primaires (262). L'expression de STARD3 a été évaluée par immunohistochimie. Ils ont trouvé 16,6% de tumeurs STARD3-positives, et l'expression de STARD3 était fortement corrélée à l'expression de HER2. Cette équipe a également constaté que les patientes atteintes d'un cancer du sein STARD3+ avaient une survie globale significativement plus faible, mais aucun ajustement n'a été effectué sur la positivité de HER2.

Dans cette thèse, nous avons constaté qu'au contraire, les patientes HER2+/STARD3+ atteintes d'un NST avaient une meilleure survie globale que les patientes HER2+/STARD3-. Cette divergence peut tout d'abord s'expliquer par le fait que les populations incluses étaient différentes entre les différentes études : tant sur les caractéristiques tumorales (notamment la positivité d'HER2) que sur les caractéristiques thérapeutiques (séquence thérapeutique et protocoles de chimiothérapie + anti-HER2 différents). De plus, STARD3 a été mesuré différemment (expression de la protéine ou amplification/expression du gène). Enfin, les données présentées dans cette thèse portent sur la valeur pronostique de STARD3 *indépendamment* de HER2 et d'autres caractéristiques cliniques et pathologiques importantes, ce qui n'est pas toujours décrit dans les autres études. Lors de l'analyse du pronostic à partir de la base de données Gene Expression Omnibus (GEO), à partir de laquelle les données pronostiques ont été étudiées dans d'autres articles précédemment cités dans cette partie, nous avons pu montrer que le pronostic moins

favorable des tumeurs STARD3+ était dû à la présence d'HER2, et qu'après stratification sur l'expression d'HER2, l'expression de STARD3 n'avait pas d'impact statistiquement significatif sur le pronostic.

4.3. Utilisation du score immunohistochimique de STARD3 au moment du diagnostic

Le développement et l'étude du score STARD3 nous a permis de confirmer les observations *in vitro* sur la localisation endosomale (signal granulaire) de STARD3 dans les cancers du sein HER2-positifs. En effet, comme la fonction de STARD3 sur le cholestérol repose sur sa localisation dans les endosomes (234), nous avons estimé que seul le motif de coloration granulaire devait refléter la présence d'une protéine active et devait être pris en compte pour établir un score immunohistochimique. Il est intéressant de noter que ce raisonnement est cohérent avec un rapport antérieur sur l'expression de la protéine STARD3 dans une cohorte de patientes finlandaises atteintes d'un cancer du sein. Les auteurs ont suggéré que le motif de coloration granulaire (ou en forme de point) de STARD3 devait être considéré comme positif (263). Dans cette étude, l'intensité de la coloration de STARD3 a été classée comme négative, faible ou élevée. Les échantillons présentant une forte expression de STARD3 avaient un motif de coloration granulaire et étaient associés à la positivité de HER2 et à une survie réduite. Les tumeurs à faible expression ne différaient pas des tumeurs négatives (263).

Par ailleurs, le signal granulaire de la protéine STARD3 est fortement associé à l'amplification d'HER2 en SISH chez les tumeurs ayant un score HER2 2+. Toutefois,

les performances du score STARD3 seul ne permettent pas d'utiliser cet examen en pratique clinique. Néanmoins, nous avons vu que dans certains sous-groupes ce score est nettement plus performant (en cas de Ki67 faible notamment), et par conséquent il pourrait être évalué pour éviter de réaliser une hybridation *in situ*, puisque cette technique immunohistochimique est moins onéreuse, plus rapide et plus facilement accessible. De plus, avec la nouvelle notion « HER2-low », ce score STARD3 pourrait présenter un intérêt supplémentaire pour les différencier des cas négatifs. Dans ces contextes, des nouvelles études sont nécessaires.

4.4. STARD3 en tant que cible thérapeutique dans le cancer du sein HER2+

Compte tenu de la dépendance *in vitro* des cellules HER2-positives à STARD3 et des résultats de cette thèse, STARD3 pourrait être une cible thérapeutique possible dans le cancer du sein HER2-positif. En effet, dans les cancers HER2-amplifiés, où STARD3 est surexprimé à des niveaux élevés, des études fonctionnelles ont montré que l'inhibition de STARD3 est associée à une réduction de la croissance cellulaire (235, 249, 250). Toutes ces études sont cohérentes et démontrent que les cellules cancéreuses amplifiées par HER2 ont une dépendance spécifique à l'égard de l'expression de STARD3. Il semble que, contrairement à d'autres lignées cellulaires, dans les cellules cancéreuses HER2-positives la fonction de STARD3 ne peut pas être restaurée, ce qui indique un rôle spécifique de STARD3 dans ces cellules. La raison pour laquelle les cellules cancéreuses HER2+ dépendent d'une forte expression de STARD3 n'est pas

claire, mais étant donné son rôle dans le trafic du cholestérol, il est supposé que STARD3 agit sur la biologie des cellules cancéreuses HER2 en modulant l'homéostasie du cholestérol.

4.4.1. Les inhibiteurs de STARD3 publiés dans la littérature

A ce jour, deux études préliminaires de criblage sur les inhibiteurs de STARD3 ont été publiées. Les inhibiteurs identifiés *in silico* ont été testés *in vitro*, mais pour l'instant il n'y a pas encore d'études *in vivo* ou cliniques.

Un inhibiteur de STARD3 a été développé et testé par Lapillo et al. (264) sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, y compris celles du sein et du colon. Dans le contexte de l'hétérogénéité des cancers du sein HER2-positifs et des fréquents mécanismes de résistance développés contre les thérapies ciblées anti-HER2, une nouvelle cible thérapeutique telle que STARD3 pourrait devenir une bonne alternative.

D'autre part, Chitralla *et al.* (265) ont publié en 2014 les résultats d'un criblage virtuel basé sur les ligands pour identifier un inhibiteur (code PDB : 1EM2) domaine START de STARD3. Seules trois molécules se sont avérées avoir une forte affinité *in vitro* en tant qu'inhibiteurs puissants de STARD3.

Malgré l'enthousiasme des auteurs de ces publications, la qualité d'inhibiteurs spécifiques de STARD3 des molécules identifiées est peu crédible et ils n'ont été confirmés par aucune étude additionnelle.

4.4.2. Perspective : le développement d'un nouvel inhibiteur de STARD3

Le projet de recherche sur STARD3 dans lequel s'inscrit cette thèse se poursuit par le développement d'un nouvel inhibiteur de STARD3. En effet, le domaine START de STARD3 est un domaine protéique liant le cholestérol afin de permettre son transport. Pour bloquer cette fonction de la protéine, nous allons rechercher des molécules empêchant la fixation du cholestérol par ce domaine. Pour étudier la liaison du domaine START de STARD3 avec le cholestérol, nous allons utiliser un cholestérol modifié couplé à un groupement fluorescent. Nous disposons au laboratoire de protéine recombinante correspondant au domaine START de STARD3 isolé, que nous produisons dans la bactérie. Nous avons montré que ce domaine isolé est capable de lier et de transporter le cholestérol *in vitro*. Nous devons adapter ce test de liaison *in vitro* avec du cholestérol fusionné avec le groupement Bodipy (TopFluor Cholesterol, Sigma) et valider l'interaction avec des mutants de STARD3 et transposer le test en format compatible avec un criblage. Le criblage se fera en collaboration avec la plateforme PCBiS. Les molécules retenues seront testées fonctionnellement au laboratoire. *In vitro* :

- i) Pour leur capacité à inhiber le transport de cholestérol dû à STARD3 grâce à des marquages *in situ* du cholestérol
- ii) Pour leur capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses HER2+.

In vivo, pour leur capacité à inhiber la formation de tumeurs après xénogreffes de cellules cancéreuses HER2+ chez la souris immunodéficiente.

L'identification de premières molécules ayant une activité inhibitrice de la fonction de STARD3 sera cruciale car ceci montrera qu'il est possible d'inhiber cette

protéine avec des molécules chimiques, ce qui est la première étape du développement d'un candidat médicament. Au laboratoire, nous disposons d'une batterie de tests cellulaires et *in vitro* permettant de suivre l'activité de STARD3 sur le transport de cholestérol et la croissance cellulaire. Nous pourrions étudier l'effet du candidat médicament dans ces différents systèmes, puis, à plus long terme valider l'inhibition de croissance tumorale induite par ce candidat médicament dans un modèle préclinique de xéno greffe chez la souris. *In fine*, le candidat médicament développé pourra servir de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les cellules tumorales HER2+.

4.4.3. Les applications potentielles des inhibiteurs de STARD3 en cancérologie mammaire

STARD3 est exprimé dans la plupart des tissus à des niveaux faibles et dans l'ensemble du règne animal (1). Des études fonctionnelles sur des cellules ont montré que STARD3 pilote le flux de cholestérol intracellulaire du réticulum endoplasmique vers les endosomes/lysosomes (234). Comme les souris knock-out STARD3 ne présentent pas de phénotype dommageable (228), il est probable que dans les tissus normaux, la fonction de STARD3 est équilibrée par d'autres mécanismes homéostatiques régulant la distribution du cholestérol. Conformément à cette idée, l'inhibition de STARD3 par des siRNA dans les cellules HeLa (une lignée de cellules cancéreuses HER2-négatives de l'endomètre) n'a pas d'impact sur la viabilité et la croissance cellulaire (250). Cependant, on ne dispose pas encore des données sur l'effet de l'inhibition de STARD3 dans les tissus sains, et des effets secondaires peuvent

constituer un frein à l'exploitation de cette vulnérabilité des cancers HER2-positifs. Afin d'outrepasser ces éventuels effets secondaires liés à un effet « off target », on pourrait imaginer le développement d'un nouvel anticorps conjugué comprenant d'une part un anticorps anti-HER2, et d'autre part l'inhibiteur de STARD3 (la charge utile ou *payload*). Cette approche innovante est en plein essor actuellement dans le cancer du sein HER2-positif, comme décrit dans la partie « 1.2.3.2 Anticorps conjugués » en page 83.

4.4.4. Les autres applications possibles des inhibiteurs de STARD3

Tout d'abord, STARD3 pourrait également être impliqué dans d'autres cancers HER2-positifs, tels que les cancers ovariens, gastriques, pulmonaires, vésicaux et prostatiques.

Par ailleurs, STARD3 présente un intérêt potentiel dans d'autres pathologies non tumorales, telles que l'hépatite C et l'athérosclérose. Les knockdowns par interférence ARN ont identifié STARD3 comme étant nécessaire à la réplication du virus de l'hépatite C car il dépend de l'homéostasie du cholestérol dans l'endosome (266). En outre, il a été démontré que la surexpression de la protéine STARD3 dans les macrophages dysrégulés rétablit une homéostasie du cholestérol altérée et induit un phénotype lipidique macrophagique anti-athérogène, ce qui constitue une stratégie thérapeutique potentielle (267).

5. CONCLUSION

Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé cette thèse a identifié STARD3 comme étant surexprimé dans les cancers HER2-positifs il y a plus de vingt ans. Depuis, l'équipe a caractérisé sa fonction de transporteur du cholestérol et a montré que les cellules cancéreuses HER2-positives sont dépendantes de STARD3.

Les résultats et des données de la littérature présentés dans cette thèse suggèrent que l'utilisation de STARD3 comme biomarqueur tissulaire serait une valeur ajoutée pour la prise en charge des patientes ayant un cancer du sein HER2-positif. En effet, l'expression de la protéine STARD3 a permis d'identifier un sous-groupe présentant un risque élevé d'absence de réponse histologique complète. Ceci justifie dans un premier temps l'étude d'autres protocoles de traitements systémiques néoadjuvants distincts dans ce sous-groupe. Ensuite, des études sur des cohortes indépendantes dans un cadre prospectif seront nécessaires.

En plus de sa valeur prédictive, STARD3 demeure une vulnérabilité du cancer du sein HER2-positif et par conséquent une cible thérapeutique intéressante. Le développement de candidats médicaments anti-STARD3 au sein du projet de recherche du laboratoire est en cours et pourra constituer un jour une nouvelle approche thérapeutique.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Voilquin L, Lodi M, Di Mattia T, Chenard M-P, Mathelin C, Alpy F, et al. STARD3: A Swiss Army Knife for Intracellular Cholesterol Transport. *Contact*. 2019;2:251525641985673-.
2. Lodi M, Voilquin L, Alpy F, Molière S, Reix N, Mathelin C, et al. STARD3: A New Biomarker in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15(2).
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
4. Defossez G., Le Guyader - Peyrou S., Uhry Z., Grosclaude P., Colonna M., Dantony E., et al. Estimations nationales de l' incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Saint-Maurice: Santé Publique France.; 2019.
5. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016;59(4):651-72.
6. Ferlay J, Laversanne M, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>. 2020.
7. Economopoulou P, Dimitriadis G, Psyrris A. Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(1):1-8.
8. Institut national du cancer (INCa). © Oncogénétique en 2019 /consultations & laboratoires, collection Appui à la décision. Juin 2019.
9. Moretta J, Berthet P, Bonadona V, Caron O, Cohen-Haguenauer O, Colas C, et al. [The French Genetic and Cancer Consortium guidelines for multigene panel analysis in hereditary breast and ovarian cancer predisposition]. *Bull Cancer*. 2018;105(10):907-17.
10. INCa. Femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 ou BRCA2 / Détection précoce du cancer du sein et des annexes et stratégies de réduction du risque. 2017.
11. Coughlin SS. Epidemiology of Breast Cancer in Women. *Adv Exp Med Biol*.

2019;1152:9-29.

12. Zhou Y, Chen J, Li Q, Huang W, Lan H, Jiang H. Association between breastfeeding and breast cancer risk: evidence from a meta-analysis. *Breastfeed Med.* 2015;10(3):175-82.

13. Boyle P, Boniol M, Koechlin A, Robertson C, Valentini F, Coppens K, et al. Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2012;107(9):1608-17.

14. Cordel E, Reix N, Moliere S, Mathelin C. [Hyperthyroidism and breast cancer: Is there a link?]. *Gynecol Obstet Fertil Senol.* 2018;46(4):403-13.

15. IARC. Les cancers attribuables au mode de vie et à l'environnement en France métropolitaine. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2018.

16. Cutuli B, Kanoun S, Tunon De Lara C, Baron M, Livi L, Levy C, et al. Breast cancer occurred after Hodgkin's disease: clinico-pathological features, treatments and outcome: analysis of 214 cases. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;81(1):29-37.

17. Fenichel P, Brucker-Davis F. [Environmental endocrine disruptors and breast cancer: new risk factors?]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2008;36(10):969-77.

18. GBD 2019 Cancer Risk Factors Collaborators. The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010-19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet.* 2022;400(10352):563-91.

19. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel).* 2021;13(17).

20. Lavoue V, Fritel X, Antoine M, Beltjens F, Bendifallah S, Boisserie-Lacroix M, et al. Clinical practice guidelines from the French College of Gynecologists and Obstetricians (CNGOF): benign breast tumors - short text. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;200:16-23.

21. Thomas PS. Diagnosis and Management of High-Risk Breast Lesions. *J Natl Compr Canc Netw.* 2018;16(11):1391-6.

22. Hartmann LC, Degnim AC, Santen RJ, Dupont WD, Ghosh K. Atypical hyperplasia of the breast--risk assessment and management options. *N Engl J Med.*

2015;372(1):78-89.

23. Simpson JF. Update on atypical epithelial hyperplasia and ductal carcinoma in situ. *Pathology*. 2009;41(1):36-9.

24. Wong SM, Stout NK, Punglia RS, Prakash I, Sagara Y, Golshan M. Breast cancer prevention strategies in lobular carcinoma in situ: A decision analysis. *Cancer*. 2017;123(14):2609-17.

25. Hartmann LC, Radisky DC, Frost MH, Santen RJ, Vierkant RA, Benetti LL, et al. Understanding the premalignant potential of atypical hyperplasia through its natural history: a longitudinal cohort study. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014;7(2):211-7.

26. King TA, Pilewskie M, Muhsen S, Patil S, Mautner SK, Park A, et al. Lobular Carcinoma in Situ: A 29-Year Longitudinal Experience Evaluating Clinicopathologic Features and Breast Cancer Risk. *J Clin Oncol*. 2015;33(33):3945-52.

27. Bodian CA, Perzin KH, Lattes R. Lobular neoplasia. Long term risk of breast cancer and relation to other factors. *Cancer*. 1996;78(5):1024-34.

28. Mathelin C, Barranger E, Boisserie-Lacroix M, Boutet G, Brousse S, Chabbert-Buffet N, et al. [Non-genetic indications for risk reducing mastectomies: Guidelines of the National College of French Gynecologists and Obstetricians (CNGOF)]. *Gynecol Obstet Fertil Senol*. 2022;50(2):107-20.

29. Kamina P. Anatomie clinique Tome 3 : Thorax Abdomen. Maloine, editor2014.

30. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.

31. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

32. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46.

33. Yates LR, Knappskog S, Wedge D, Farmery JHR, Gonzalez S, Martincorena I, et al. Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse. *Cancer Cell*. 2017;32(2):169-84 e7.

34. Jones PA, Issa JP, Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat*

Rev Genet. 2016;17(10):630-41.

35. Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science*. 2017;357(6348).

36. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(9).

37. Darwiche N. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. *Am J Cancer Res*. 2020;10(7):1954-78.

38. Feng Y, Liu X, Pauklin S. 3D chromatin architecture and epigenetic regulation in cancer stem cells. *Protein Cell*. 2021;12(6):440-54.

39. Nam AS, Chaligne R, Landau DA. Integrating genetic and non-genetic determinants of cancer evolution by single-cell multi-omics. *Nat Rev Genet*. 2021;22(1):3-18.

40. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*. 2020;34(23-24):1565-76.

41. Faget DV, Ren Q, Stewart SA. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(8):439-53.

42. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 2019;179(4):813-27.

43. De Blander H, Morel AP, Senaratne AP, Ouzounova M, Puisieux A. Cellular Plasticity: A Route to Senescence Exit and Tumorigenesis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(18).

44. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):66.

45. Kelley LC, Lohmer LL, Hagedorn EJ, Sherwood DR. Traversing the basement membrane in vivo: a diversity of strategies. *J Cell Biol*. 2014;204(3):291-302.

46. Jayadev R, Sherwood DR. Basement membranes. *Curr Biol*. 2017;27(6):R207-R11.

47. Sherwood DR. Cell invasion through basement membranes: an anchor of understanding. *Trends Cell Biol*. 2006;16(5):250-6.

48. World Health Organization (WHO). Breast Tumours: WHO Classification of Tumours. 5th Edition ed2019.
49. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol.* 2015;8:23-31.
50. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast. Fourth Edition. Organization WH, editor2012.
51. Tan PH, Tse GM, Bay BH. Mucinous breast lesions: diagnostic challenges. *Journal of clinical pathology.* 2008;61(1):11-9.
52. Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities. *Oncologist.* 192014. p. 805-13.
53. Di Saverio S, Gutierrez J, Avisar E. A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;111(3):541-7.
54. Lavoué V, Fritel X, Antoine M, Beltjens F, Bendifallah S, Boisserie-Lacroix M, et al. [Benign breast tumors: Recommendations of Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français (CNGOF)--Short text]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2015;44(10):1049-64.
55. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957;11(3):359-77.
56. Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, et al. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol.* 1995;26(8):873-9.
57. Simpson JF, Gray R, Dressler LG, Cobau CD, Falkson CI, Gilchrist KW, et al. Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol.* 2000;18(10):2059-69.
58. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS,

et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(20):2105-22.

59. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2015;29(4):557--68.

60. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO journal*. 1990;9(5):1603--14.

61. Hagan CR, Lange CA. Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer. *BMC medicine*. 2014;12:32.

62. McCarty KS, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1985;109(8):716--21.

63. Hammond ME, 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*. 2010;28(16):2784-95.

64. Cuylen S, Blaukopf C, Politi AZ, Müller-Reichert T, Neumann B, Poser I, et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*. 2016;535(7611):308--12.

65. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, et al. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry*. 1991;12(1):42-9.

66. Luporsi E, Andre F, Spyrtatos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat*.

2012;132(3):895-915.

67. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.

68. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.

69. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.

70. Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. *Breast Care (Basel)*. 2013;8(2):102-9.

71. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:96.

72. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10393-8.

73. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1684-91.

74. AJCC (American Joint Committee on Cancer). *Cancer Staging Manual*; 8th edition, 3rd printing, Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al (Eds), Springer, Chicago.; 2018.

75. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch*. 2018;472(5):697-703.

76. Halsted WS. I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg*. 1894;20(5):497-555.

77. Patey DH, Dyson WH. The prognosis of carcinoma of the breast in relation to the type of operation performed. *Br J Cancer*. 1948;2(1):7-13.

78. Madden JL, Kandalaf S, Bourque RA. Modified radical mastectomy. *Ann Surg*.

1972;175(5):624-34.

79. Fisher B, Bauer M, Margolese R, Poisson R, Pilch Y, Redmond C, et al. Five-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with or without radiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med.* 1985;312(11):665-73.

80. Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, Banfi A, Clemente C, De Lena M, et al. Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. *N Engl J Med.* 1981;305(1):6-11.

81. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg.* 1994;220(3):391-8; discussion 8-401.

82. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Ashikaga T, et al. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial. *Lancet Oncol.* 2007;8(10):881-8.

83. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(16):1227-32.

84. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, et al. 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.* 2011;378(9804):1707-16.

85. Galimberti V, Vicini E, Corso G, Morigi C, Fontana S, Sacchini V, et al. Nipple-sparing and skin-sparing mastectomy: Review of aims, oncological safety and contraindications. *Breast.* 2017;34 Suppl 1:S82-S4.

86. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol.* 2008;26(5):778-85.

87. Francis PA, Pagani O, Fleming GF, Walley BA, Colleoni M, Láng I, et al. Tailoring Adjuvant Endocrine Therapy for Premenopausal Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(2):122-37.
88. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet*. 2015;386(10001):1341-52.
89. Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3797-803.
90. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(20):1929-40.
91. Chung WP, Huang WL, Lee CH, Hsu HP, Huang WL, Liu YY, et al. PI3K inhibitors in trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer cells with PI3K pathway alterations. *Am J Cancer Res*. 2022;12(7):3067-82.
92. Tutt ANJ, Garber JE, Kaufman B, Viale G, Fumagalli D, Rastogi P, et al. Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2021;384(25):2394-405.
93. Tung NM, Zakalik D, Somerfield MR. Adjuvant PARP Inhibitors in Patients With High-Risk Early-Stage HER2-Negative Breast Cancer and Germline BRCA Mutations: ASCO Hereditary Breast Cancer Guideline Rapid Recommendation Update. *J Clin Oncol*. 2021;39(26):2959-61.
94. Keenan TE, Tolaney SM. Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020;18(4):479-89.
95. Debien V, De Caluwé A, Wang X, Piccart-Gebhart M, Tuohy VK, Romano E, et al. Immunotherapy in breast cancer: an overview of current strategies and perspectives. *NPJ Breast Cancer*. 2023;9(1):7.
96. 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.

97. Goel S, Wang Q, Watt AC, Tolaney SM, Dillon DA, Li W, et al. Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4/6 Inhibitors. *Cancer Cell*. 2016;29(3):255-69.
98. Domchek SM, Postel-Vinay S, Im SA, Park YH, Delord JP, Italiano A, et al. Olaparib and durvalumab in patients with germline BRCA-mutated metastatic breast cancer (MEDIOLA): an open-label, multicentre, phase 1/2, basket study. *Lancet Oncol*. 2020;21(9):1155-64.
99. Nanda R, Liu MC, Yau C, Shatsky R, Pusztai L, Wallace A, et al. Effect of Pembrolizumab Plus Neoadjuvant Chemotherapy on Pathologic Complete Response in Women With Early-Stage Breast Cancer: An Analysis of the Ongoing Phase 2 Adaptively Randomized I-SPY2 Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(5):676-84.
100. Gillette EL, Gillette SM. Principles of radiation therapy. *J Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1995;10(3):129--34.
101. Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines *Cancer*. 2005;104(6):1129--37.
102. Huguet F, Haberer-Guillerm S, Monnier L. Radiothérapie. EMC - AKOS (Traité de Médecine). 2014;9(2):1-6.
103. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, et al. 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*. 2011;378(9804):1707-16.
104. Ebcctg. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *The Lancet*. 2014;383(9935):2127-35.
105. Jatoi I, Benson JR, Kunkler I. Hypothesis: can the abscopal effect explain the impact of adjuvant radiotherapy on breast cancer mortality? *npj Breast Cancer*. 2018;4(1):8.
106. Bartelink H, Maingon P, Poortmans P, Weltens C, Fourquet A, Jager J, et al.

Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):47-56.

107. Poortmans P. Postmastectomy radiation in breast cancer with one to three involved lymph nodes: ending the debate. *Lancet.* 2014;383(9935):2104-6.

108. Poortmans PM, Collette S, Kirkove C, Van Limbergen E, Budach V, Struikmans H, et al. Internal Mammary and Medial Supraclavicular Irradiation in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(4):317-27.

109. Thorsen LB, Offersen BV, Danø H, Berg M, Jensen I, Pedersen AN, et al. DBCG-IMN: A Population-Based Cohort Study on the Effect of Internal Mammary Node Irradiation in Early Node-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(4):314-20.

110. Whelan TJ, Olivetto IA, Parulekar WR, Ackerman I, Chua BH, Nabid A, et al. Regional Nodal Irradiation in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(4):307-16.

111. Dodwell D, Taylor C, McGale P, Coles C, Duane F, Gray R, et al. Abstract GS4-02: Regional lymph node irradiation in early stage breast cancer: An EBCTCG meta-analysis of 13,000 women in 14 trials. *Cancer Research.* 2019;79(4_Supplement):GS4-02-GS4-.

112. Ouattara D, Mathelin C, Özmen T, Lodi M. Molecular Signatures in Ductal Carcinoma In Situ (DCIS): A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med.* 2023;12(5).

113. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989;244(4905):707-12.

114. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(11):1364-82.

115. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr*

Opin Cell Biol. 2009;21(2):177-84.

116. Swain SM, Shastry M, Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat Rev Drug Discov.* 2023;22(2):101-26.

117. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem.* 1962;237:1555-62.

118. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature.* 1984;312(5994):513-6.

119. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 1985;230(4730):1132-9.

120. Drebin JA, Stern DF, Link VC, Weinberg RA, Greene MI. Monoclonal antibodies identify a cell-surface antigen associated with an activated cellular oncogene. *Nature.* 1984;312(5994):545-8.

121. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science.* 1987;237(4811):178-82.

122. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987;235(4785):177-82.

123. Fendly BM, Winget M, Hudziak RM, Lipari MT, Napier MA, Ullrich A. Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product. *Cancer Res.* 1990;50(5):1550-8.

124. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344(11):783-92.

125. Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(3):1311-5.

126. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res.* 2003;284(1):2-13.
127. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(5):341-54.
128. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene.* 1990;5(7):953-62.
129. Negro A, Brar BK, Lee KF. Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:1-12.
130. Gordon LI, Burke MA, Singh AT, Prachand S, Lieberman ED, Sun L, et al. Blockade of the erbB2 receptor induces cardiomyocyte death through mitochondrial and reactive oxygen species-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2009;284(4):2080-7.
131. Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature.* 1995;378(6555):394-8.
132. Jackson-Fisher AJ, Bellinger G, Ramabhadran R, Morris JK, Lee KF, Stern DF. ErbB2 is required for ductal morphogenesis of the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(49):17138-43.
133. Kovacs E, Zorn JA, Huang Y, Barros T, Kuriyan J. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:739-64.
134. Lemmon MA. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res.* 2009;315(4):638-48.
135. Wang N, Cao Y, Si C, Shao P, Su G, Wang K, et al. Emerging Role of ERBB2 in Targeted Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: Signaling Pathways to Therapeutic Strategies. *Cancers (Basel).* 2022;14(20).
136. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002;296(5573):1655-7.
137. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006;7(8):606-19.

138. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*. 1997;275(5300):665-8.
139. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):127-37.
140. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res*. 1990;50(14):4332-7.
141. Luoh SW, Ramsey B, Hanlon Newell A, Troxell M, Hu Z, Chin K, et al. HER-2 gene amplification in human breast cancer without concurrent HER-2 over-expression. *Springerplus*. 2013;2:386.
142. Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, 3rd, Hynes NE. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(15):8933-8.
143. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-87.
144. Fritzsche FR, Kristiansen G, Boesl A, Burkhardt M, Pahl S, Dankof A, et al. Tissue pretreatment with formic acid might lower HercepTest scores in breast cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2006;15(4):237-42.
145. Siddiqui S, Rimm DL. Pre-analytic variables and phospho-specific antibodies: the Achilles heel of immunohistochemistry. *Breast Cancer Res*. 2010;12(6):113.
146. Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res*. 2005;11(18):6598-607.
147. Choritz H, Büsche G, Kreipe H. Quality assessment of HER2 testing by monitoring of positivity rates. *Virchows Arch*. 2011;459(3):283-9.
148. Tse CH, Hwang HC, Goldstein LC, Kandalaft PL, Wiley JC, Kussick SJ, et al. Determining true HER2 gene status in breast cancers with polysomy by using

alternative chromosome 17 reference genes: implications for anti-HER2 targeted therapy. *J Clin Oncol*. 2011;29(31):4168-74.

149. Ballinger TJ, Sanders ME, Abramson VG. Current HER2 Testing Recommendations and Clinical Relevance as a Predictor of Response to Targeted Therapy. *Clin Breast Cancer*. 2015;15(3):171-80.

150. Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, MacGrogan G, Roger P, Treilleux I, Valent A, et al. [2014 update of the GEFPICS' recommendations for HER2 status determination in breast cancers in France]. *Ann Pathol*. 2014;34(5):352-65.

151. Zhang H, Katerji H, Turner BM, Hicks DG. HER2-Low Breast Cancers. *Am J Clin Pathol*. 2022;157(3):328-36.

152. Baselga J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 7:vii36-40.

153. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 1998;58(13):2825-31.

154. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1659-72.

155. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1673-84.

156. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2011;365(14):1273-83.

157. Nahta R, Esteva FJ. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett*. 2006;232(2):123-38.

158. Ishii K, Morii N, Yamashiro H. Pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: an evidence-based review of its safety, efficacy, and place in therapy.

Core Evid. 2019;14:51-70.

159. Nahta R, Hung MC, Esteva FJ. The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64(7):2343-6.

160. Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(8):724-34.

161. von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, Zardavas D, Benyunes M, Viale G, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(2):122-31.

162. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, 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.* 2012;13(1):25-32.

163. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Harvey V, Eniu A, Waldron-Lynch M, et al. Long-term efficacy analysis of the randomised, phase II TRYPHAENA cardiac safety study: Evaluating pertuzumab and trastuzumab plus standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer. *Eur J Cancer.* 2018;89:27-35.

164. Liu L, Yang Y, Burns R, Li J, Li H, Gorlatov S, et al. Abstract 1538: Margetuximab mediates greater Fc-dependent anti-tumor activities than trastuzumab or pertuzumab in vitro. *Cancer Research.* 2019;79(13_Supplement):1538-.

165. Rugo HS, Im SA, Cardoso F, Cortés J, Curigliano G, Musolino A, et al. Efficacy of Margetuximab vs Trastuzumab in Patients With Pretreated ERBB2-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2021;7(4):573-84.

166. Beck A, Goetsch L, Dumontet C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(5):315-37.

167. Staudacher AH, Brown MP. Antibody drug conjugates and bystander killing: is

- antigen-dependent internalisation required? *Br J Cancer*. 2017;117(12):1736-42.
168. Junttila TT, Li G, Parsons K, Phillips GL, Sliwkowski MX. Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;128(2):347-56.
169. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;367(19):1783-91.
170. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(7):617-28.
171. Montemurro F, Delalogue S, Barrios CH, Wuerstlein R, Anton A, Brain E, et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and brain metastases: exploratory final analysis of cohort 1 from KAMILLA, a single-arm phase IIIb clinical trial(☆). *Ann Oncol*. 2020;31(10):1350-8.
172. Yver A, Agatsuma T, Soria JC. The art of innovation: clinical development of trastuzumab deruxtecan and redefining how antibody-drug conjugates target HER2-positive cancers. *Ann Oncol*. 2020;31(3):430-4.
173. Modi S, Saura C, Yamashita T, Park YH, Kim SB, Tamura K, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2020;382(7):610-21.
174. Cortes J, Kim SB, Chung WP, Im SA, Park YH, Hegg R, et al. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(12):1143-54.
175. Tamura K, Tsurutani J, Takahashi S, Iwata H, Krop IE, Redfern C, et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) in patients with advanced HER2-positive breast cancer previously treated with trastuzumab emtansine: a dose-expansion, phase 1 study. *Lancet Oncol*. 2019;20(6):816-26.
176. Jerusalem GHM, Park YH, Yamashita T, Hurvitz SA, Modi S, Andre F, et al.

Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) in patients with HER2+ metastatic breast cancer with brain metastases: A subgroup analysis of the DESTINY-Breast01 trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(15_suppl):526-.

177. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2022;387(1):9-20.

178. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006;66(3):1630-9.

179. Nahta R, Yuan LX, Du Y, Esteva FJ. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(2):667-74.

180. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(8):628-38.

181. Schlam I, Swain SM. HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now. *NPJ Breast Cancer*. 2021;7(1):56.

182. Cameron D, Casey M, Press M, Lindquist D, Pienkowski T, Romieu CG, et al. A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;112(3):533-43.

183. Johnston S, Pippin J, Jr., Pivot X, Lichinitser M, Sadeghi S, Dieras V, et al. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(33):5538-46.

184. Clayton AJ, Danson S, Jolly S, Ryder WD, Burt PA, Stewart AL, et al. Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab for metastatic breast

cancer. *Br J Cancer*. 2004;91(4):639-43.

185. Steeg PS. The blood-tumour barrier in cancer biology and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(11):696-714.

186. Collins DM, Conlon NT, Kannan S, Verma CS, Eli LD, Lalani AS, et al. Preclinical Characteristics of the Irreversible Pan-HER Kinase Inhibitor Neratinib Compared with Lapatinib: Implications for the Treatment of HER2-Positive and HER2-Mutated Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6).

187. Canonici A, Gijssen M, Mullooly M, Bennett R, Bouguern N, Pedersen K, et al. Neratinib overcomes trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancer. *Oncotarget*. 2013;4(10):1592-605.

188. Cocco E, Javier Carmona F, Razavi P, Won HH, Cai Y, Rossi V, et al. Neratinib is effective in breast tumors bearing both amplification and mutation of ERBB2 (HER2). *Sci Signal*. 2018;11(551).

189. Saura C, Oliveira M, Feng YH, Dai MS, Chen SW, Hurvitz SA, et al. Neratinib Plus Capecitabine Versus Lapatinib Plus Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated With ≥ 2 HER2-Directed Regimens: Phase III NALA Trial. *J Clin Oncol*. 2020;38(27):3138-49.

190. Xu B, Yan M, Ma F, Hu X, Feng J, Ouyang Q, et al. Pyrotinib plus capecitabine versus lapatinib plus capecitabine for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer (PHOEBE): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021;22(3):351-60.

191. Kulukian A, Lee P, Taylor J, Rosler R, de Vries P, Watson D, et al. Preclinical Activity of HER2-Selective Tyrosine Kinase Inhibitor Tucatinib as a Single Agent or in Combination with Trastuzumab or Docetaxel in Solid Tumor Models. *Mol Cancer Ther*. 2020;19(4):976-87.

192. O'Brien N, Conklin D, McDermott M, Luo T, Ayala R, Issakhanian S, et al. Abstract P6-17-11: The small molecule inhibitor of HER2, tucatinib, has potent and highly selective activity in preclinical modes of HER2-driven cancer. *Cancer Research*. 2019;79(4_Supplement):P6-17-1-P6--1.

193. Murthy RK, Loi S, Okines A, Paplomata E, Hamilton E, Hurvitz SA, et al. Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2020;382(7):597-609.
194. Kancha RK, von Bubnoff N, Bartosch N, Peschel C, Engh RA, Duyster J. Differential sensitivity of ERBB2 kinase domain mutations towards lapatinib. *PLoS One.* 2011;6(10):e26760.
195. Hanker AB, Brown BP, Meiler J, Marín A, Jayanthan HS, Ye D, et al. Co-occurring gain-of-function mutations in HER2 and HER3 modulate HER2/HER3 activation, oncogenesis, and HER2 inhibitor sensitivity. *Cancer Cell.* 2021;39(8):1099-114.e8.
196. Derakhshani A, Rezaei Z, Safarpour H, Sabri M, Mir A, Sanati MA, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy. *J Cell Physiol.* 2020;235(4):3142-56.
197. Miranda F, Prazeres H, Mendes F, Martins D, Schmitt F. Resistance to endocrine therapy in HR + and/or HER2 + breast cancer: the most promising predictive biomarkers. *Mol Biol Rep.* 2022;49(1):717-33.
198. Loibl S, Majewski I, Guarneri V, Nekljudova V, Holmes E, Bria E, et al. PIK3CA mutations are associated with reduced pathological complete response rates in primary HER2-positive breast cancer: pooled analysis of 967 patients from five prospective trials investigating lapatinib and trastuzumab. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1519-25.
199. Vernieri C, Milano M, Brambilla M, Mennitto A, Maggi C, Cona MS, et al. Resistance mechanisms to anti-HER2 therapies in HER2-positive breast cancer: Current knowledge, new research directions and therapeutic perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019;139:53-66.
200. Smith AE, Ferraro E, Safonov A, Morales CB, Lahuerta EJA, Li Q, et al. HER2 + breast cancers evade anti-HER2 therapy via a switch in driver pathway. *Nat Commun.* 2021;12(1):6667.
201. Filho OM, Viale G, Stein S, Trippa L, Yardley DA, Mayer IA, et al. Impact of HER2 Heterogeneity on Treatment Response of Early-Stage HER2-Positive Breast

Cancer: Phase II Neoadjuvant Clinical Trial of T-DM1 Combined with Pertuzumab. *Cancer Discov.* 2021;11(10):2474-87.

202. 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.* 2014;384(9938):164-72.

203. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S, et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet.* 2010;375(9712):377-84.

204. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M, et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol.* 2014;15(6):640-7.

205. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Harvey V, Eniu A, Hegg R, et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol.* 2013;24(9):2278-84.

206. Tolaney SM, Barry WT, Dang CT, Yardley DA, Moy B, Marcom PK, et al. Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for node-negative, HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(2):134-41.

207. 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.

208. Kurozumi S, Inoue K, Takei H, Matsumoto H, Kurosumi M, Horiguchi J, et al. ER, PgR, Ki67, p27(Kip1), and histological grade as predictors of pathological complete response in patients with HER2-positive breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy using taxanes followed by fluorouracil, epirubicin, and

- cyclophosphamide concomitant with trastuzumab. *BMC Cancer*. 2015;15:622.
209. Samiei S, Simons JM, Engelen SME, Beets-Tan RGH, Classe JM, Smidt ML. Axillary Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Systemic Therapy by Breast Cancer Subtype in Patients With Initially Clinically Node-Positive Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Surg*. 2021;156(6):e210891.
210. Schettini F, Pascual T, Conte B, Chic N, Brasó-Maristany F, Galván P, et al. HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2020;84:101965.
211. Baron P, Beitsch P, Boselli D, Symanowski J, Pellicane JV, Beatty J, et al. Impact of Tumor Size on Probability of Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(5):1522-9.
212. Sasanpour P, Sandoughdaran S, Mosavi-Jarrahi A, Malekzadeh M. Predictors of Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Iranian Breast Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(9):2423-7.
213. Yau C, Osdoit M, van der Noordaa M, Shad S, Wei J, de Croze D, et al. Residual cancer burden after neoadjuvant chemotherapy and long-term survival outcomes in breast cancer: a multicentre pooled analysis of 5161 patients. *Lancet Oncol*. 2022;23(1):149-60.
214. Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, et al. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol*. 1997;15(7):2483-93.
215. Jiang M, Li CL, Luo XM, Chuan ZR, Lv WZ, Li X, et al. Ultrasound-based deep learning radiomics in the assessment of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Eur J Cancer*. 2021;147:95-105.
216. Pesapane F, Agazzi GM, Rotili A, Ferrari F, Cardillo A, Penco S, et al. Prediction of the Pathological Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients With MRI-Radiomics: A Systematic Review and Meta-analysis. *Curr Probl Cancer*. 2022;46(5):100883.

217. Tahmassebi A, Wengert GJ, Helbich TH, Bago-Horvath Z, Alaei S, Bartsch R, et al. Impact of Machine Learning With Multiparametric Magnetic Resonance Imaging of the Breast for Early Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy and Survival Outcomes in Breast Cancer Patients. *Invest Radiol*. 2019;54(2):110-7.
218. Liu Y, Wang Y, Wang Y, Xie Y, Cui Y, Feng S, et al. Early prediction of treatment response to neoadjuvant chemotherapy based on longitudinal ultrasound images of HER2-positive breast cancer patients by Siamese multi-task network: A multicentre, retrospective cohort study. *EClinicalMedicine*. 2022;52:101562.
219. Lambin P, Leijenaar RTH, Deist TM, Peerlings J, de Jong EEC, van Timmeren J, et al. Radiomics: the bridge between medical imaging and personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(12):749-62.
220. Li Q, Xiao Q, Li J, Wang Z, Wang H, Gu Y. Value of Machine Learning with Multiphases CE-MRI Radiomics for Early Prediction of Pathological Complete Response to Neoadjuvant Therapy in HER2-Positive Invasive Breast Cancer. *Cancer Manag Res*. 2021;13:5053-62.
221. Mazo C, Barron S, Mooney C, Gallagher WM. Multi-Gene Prognostic Signatures and Prediction of Pathological Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in ER-positive, HER2-negative Breast Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5).
222. Xiao Y, Ding J, Ma D, Chen S, Li X, Yu K. Predicting Pathological Complete Response in Neoadjuvant Dual Blockade With Trastuzumab and Pertuzumab in HER2 Gene Amplified Breast Cancer. *Front Immunol*. 2022;13:877825.
223. Hwang HW, Jung H, Hyeon J, Park YH, Ahn JS, Im YH, et al. A nomogram to predict pathologic complete response (pCR) and the value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;173(2):255-66.
224. 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.

225. Salgado R, Denkert C, Campbell C, Savas P, Nuciforo P, Aura C, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA Oncol.* 2015;1(4):448-54.
226. Tomasetto C, Regnier C, Moog-Lutz C, Mattei MG, Chenard MP, Lidereau R, et al. Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics.* 1995;28(3):367-76.
227. Moog-Lutz C, Tomasetto C, Régnier CH, Wendling C, Lutz Y, Muller D, et al. MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas. *Int J Cancer.* 1997;71(2):183-91.
228. Kishida T, Kostetskii I, Zhang Z, Martinez F, Liu P, Walkley SU, et al. Targeted mutation of the MLN64 START domain causes only modest alterations in cellular sterol metabolism. *J Biol Chem.* 2004;279(18):19276-85.
229. Bieche I, Tomasetto C, Regnier CH, Moog-Lutz C, Rio MC, Lidereau R. Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Res.* 1996;56(17):3886-90.
230. Alpy F, Tomasetto C. STARD3: A Lipid Transfer Protein in Breast Cancer and Cholesterol Trafficking. In *Cholesterol Transporters of the START Domain Protein Family*. In: Clark B.J. & Stocco D.M., editor. Health and Disease: Springer New York; 2014. p. 119–38.
231. Alpy F, Stoeckel ME, Dierich A, Escola JM, Wendling C, Chenard MP, et al. The steroidogenic acute regulatory protein homolog MLN64, a late endosomal cholesterol-binding protein. *J Biol Chem.* 2001;276(6):4261-9.
232. Jacot W, Fiche M, Zaman K, Wolfer A, Lamy PJ. The HER2 amplicon in breast cancer: Topoisomerase IIA and beyond. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1836(1):146-57.
233. Holtta-Vuori M, Alpy F, Tanhuanpaa K, Jokitalo E, Mutka AL, Ikonen E. MLN64 is involved in actin-mediated dynamics of late endocytic organelles. *Mol Biol*

Cell. 2005;16(8):3873-86.

234. Wilhelm LP, Wendling C, Vedio B, Kobayashi T, Chenard MP, Tomasetto C, et al. STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites. *EMBO J.* 2017;36(10):1412-33.

235. Sahlberg KK, Hongisto V, Edgren H, Makela R, Hellstrom K, Due EU, et al. The HER2 amplicon includes several genes required for the growth and survival of HER2 positive breast cancer cells. *Mol Oncol.* 2013;7(3):392-401.

236. Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(3):725-31.

237. Vinatzer U, Dampier B, Streubel B, Pacher M, Seewald MJ, Stratowa C, et al. Expression of HER2 and the coamplified genes GRB7 and MLN64 in human breast cancer: quantitative real-time reverse transcription-PCR as a diagnostic alternative to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res.* 2005;11(23):8348-57.

238. Cai W, Ye L, Sun J, Mansel RE, Jiang WG. Expression of MLN64 influences cellular matrix adhesion of breast cancer cells, the role for focal adhesion kinase. *Int J Mol Med.* 2010;25(4):573-80.

239. Stigliano A, Gandini O, Cerquetti L, Gazzaniga P, Misiti S, Monti S, et al. Increased metastatic lymph node 64 and CYP17 expression are associated with high stage prostate cancer. *J Endocrinol.* 2007;194(1):55-61.

240. Alpy F, Tomasetto C. Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 13):2791-801.

241. Alpy F, Tomasetto C. START ships lipids across interorganelle space. *Biochimie.* 2014;96:85-95.

242. Alpy F, Tomasetto C. MLN64 and MENTHO, two mediators of endosomal cholesterol transport. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 3):343-5.

243. Alpy F, Latchumanan VK, Kedinger V, Janoshazi A, Thiele C, Wendling C, et

- al. Functional characterization of the MENTAL domain. *J Biol Chem.* 2005;280(18):17945-52.
244. Alpy F, Rousseau A, Schwab Y, Legueux F, Stoll I, Wendling C, et al. STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 23):5500-12.
245. Wilhelm LP, Tomasetto C, Alpy F. Touche! STARD3 and STARD3NL tether the ER to endosomes. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(2):493-8.
246. Di Mattia T, Wilhelm LP, Ikhlef S, Wendling C, Spehner D, Nomine Y, et al. Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Rep.* 2018.
247. Nagy P, Vereb G, Sebestyén Z, Horváth G, Lockett SJ, Damjanovich S, et al. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 22):4251-62.
248. Bollig-Fischer A, Dziubinski M, Boyer A, Haddad R, Giroux CN, Ethier SP. HER-2 signaling, acquisition of growth factor independence, and regulation of biological networks associated with cell transformation. *Cancer Res.* 2010;70(20):7862-73.
249. Kao J, Pollack JR. RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45(8):761-9.
250. Alpy F, Tomasetto CL. STARD3: A lipid transfer protein in breast cancer and cholesterol trafficking. *Cholesterol Transporters of the START Domain Protein Family in Health and Disease: START Proteins-Structure and Function.* 2014;9781493911127:119-38.
251. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol.* 2008;61(4):344-9.
252. Latta EK, Tjan S, Parkes RK, O'Malley FP. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive

- carcinoma of the breast. *Mod Pathol.* 2002;15(12):1318-25.
253. Vincent-Salomon A, Lucchesi C, Gruel N, Raynal V, Pierron G, Goudefroye R, et al. Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res.* 2008;14(7):1956-65.
254. Garrett JT, Arteaga CL. Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(9):793-800.
255. Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(24):7479-91.
256. Buzdar AU, Suman VJ, Meric-Bernstam F, Leitch AM, Ellis MJ, Boughey JC, et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC-75) followed by paclitaxel plus trastuzumab versus paclitaxel plus trastuzumab followed by FEC-75 plus trastuzumab as neoadjuvant treatment for patients with HER2-positive breast cancer (Z1041): a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2013;14(13):1317-25.
257. Robidoux A, Tang G, Rastogi P, Geyer CE, Azar CA, Atkins JN, et al. Lapatinib as a component of neoadjuvant therapy for HER2-positive operable breast cancer (NSABP protocol B-41): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2013;14(12):1183-92.
258. Untch M, Loibl S, Bischoff J, Eidtmann H, Kaufmann M, Blohmer JU, et al. Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(2):135-44.
259. van Ramshorst MS, van der Voort A, van Werkhoven ED, Mandjes IA, Kemper I, Dezentjé VO, et al. Neoadjuvant chemotherapy with or without anthracyclines in the presence of dual HER2 blockade for HER2-positive breast cancer (TRAIN-2): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2018;19(12):1630-40.
260. Fararjeh AFS, Al Khader A, Kaddumi E, Obeidat M, Al-Fawares Ol. Differential

Expression and Prognostic Significance of STARD3 Gene in Breast Carcinoma. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* 2021.

261. Lamy PJ, Fina F, Bascoul-Mollevis C, Laberenne AC, Martin PM, Ouafik L, et al. Quantification and clinical relevance of gene amplification at chromosome 17q12-q21 in human epidermal growth factor receptor 2-amplified breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2011;13(1):R15.

262. Li P, Zhang Z, Lv H, Sun P. Inhibiting the expression of STARD3 induced apoptosis via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway on ER(+) breast cancer. *Tissue Cell.* 2022;79:101971.

263. Vassilev B, Sihto H, Li S, Holtta-Vuori M, Ilola J, Lundin J, et al. Elevated levels of StAR-related lipid transfer protein 3 alter cholesterol balance and adhesiveness of breast cancer cells: potential mechanisms contributing to progression of HER2-positive breast cancers. *Am J Pathol.* 2015;185(4):987-1000.

264. Lapillo M, Salis B, Palazzolo S, Poli G, Granchi C, Minutolo F, et al. First-of-its-kind STARD3 Inhibitor: In Silico Identification and Biological Evaluation as Anticancer Agent. *ACS Med Chem Lett.* 2019;10(4):475-80.

265. Chitralla KN, Yeguvapalli S. Ligand-based virtual screening to predict inhibitors against metastatic lymph node 64. *J Recept Signal Transduct Res.* 2014;34(2):92-6.

266. Stoeck IK, Lee JY, Tabata K, Romero-Brey I, Paul D, Schult P, et al. Hepatitis C Virus Replication Depends on Endosomal Cholesterol Homeostasis. *J Virol.* 2018;92(1).

267. Borthwick F, Allen AM, Taylor JM, Graham A. Overexpression of STARD3 in human monocyte/macrophages induces an anti-atherogenic lipid phenotype. *Clin Sci (Lond).* 2010;119(7):265-72.

ANNEXES

Systematic Review

Molecular Signatures in Ductal Carcinoma In Situ (DCIS): A Systematic Review and Meta-Analysis

Drissa Ouattara ¹, Carole Mathelin ^{2,3,4} , Tolga Özmen ⁵  and Massimo Lodi ^{2,3,4,*} 

¹ Surgery Department, Point G University Hospitals, Bamako P.O. Box 251, Mali

² Strasbourg University Hospital, 1 Avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

³ Surgical Oncology Department, ICANS Institute of Oncology Strasbourg Europe, 17 Avenue Albert Calmette, CEDEX, 67200 Strasbourg, France

⁴ IGBMC Institute of Genetics, Molecular and Cellular Biology, CNRS, UMR7104 INSERM U964, Strasbourg University, 1 Rue Laurent Fries, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

⁵ Division of Gastrointestinal and Oncologic Surgery, Department of Surgery, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, 55 Fruit St, Boston, MA 02114, USA

* Correspondence: massimo.lodi@chru-strasbourg.fr

Abstract: Context: Adjuvant radiotherapy (RT) after breast-conserving surgery (BCS) for ductal carcinoma in situ (DCIS) is debated as benefits are inconstant. Molecular signatures for DCIS have been developed to stratify the risk of local recurrence (LR) and therefore guide the decision of RT. Objective: To evaluate, in women with DCIS treated by BCS, the impact of adjuvant RT on LR according to the molecular signature risk stratification. Methodology: We conducted a systematic review and meta-analysis of five articles including women with DCIS treated by BCS and with a molecular assay performed to stratify the risk, comparing the effect of BCS and RT versus BCS alone on LR including ipsilateral invasive (InvBE) and total breast events (TotBE). Results: The meta-analysis included 3478 women and evaluated two molecular signatures: Oncotype Dx DCIS (prognostic of LR), and DCISionRT (prognostic of LR and predictive of RT benefit). For DCISionRT, in the high-risk group, the pooled hazard ratio of BCS + RT versus BCS was 0.39 (95%CI 0.20–0.77) for InvBE and 0.34 (95%CI 0.22–0.52) for TotBE. In the low-risk group, the pooled hazard ratio of BCS + RT versus BCS was significant for TotBE at 0.62 (95%CI 0.39–0.99); however, it was not significant for InvBE (HR = 0.58 (95%CI 0.25–1.32)), Discussion: Molecular signatures are able to discriminate high- and low-risk women, high-risk ones having a significant benefit of RT in the reduction of invasive and in situ local recurrences, while in low-risk ones RT did not have a benefit for preventing invasive breast recurrence. The risk prediction of molecular signatures is independent of other risk stratification tools developed in DCIS, and have a tendency toward RT de-escalation. Further studies are needed to assess the impact on mortality.

Keywords: ductal carcinoma in situ; molecular assay; radiotherapy; local recurrence; de-escalation; precision medicine



Citation: Ouattara, D.; Mathelin, C.; Özmen, T.; Lodi, M. Molecular Signatures in Ductal Carcinoma In Situ (DCIS): A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 2036. <https://doi.org/10.3390/jcm12052036>

Academic Editor: Yanyuan Wu

Received: 27 January 2023

Revised: 22 February 2023

Accepted: 28 February 2023

Published: 3 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ductal carcinoma in situ (DCIS) accounts for approximately 15.2% of all breast cancers in the United States [1]. Moreover, its incidence has increased in the last decades, in part as a consequence of the generalization of breast cancer screening, but also due to population aging and increased risk factors such as obesity or family history [2,3]. Of interest, DCIS is a component of *BRCA* spectrum cancers, and *BRCA2* carriers have higher incidences in DCIS compared to *BRCA1* carriers [4], although DCIS is equally as prevalent in *BRCA* mutation carriers as in high familial-risk noncarrier women [4,5]. According to the World Health Organization (WHO), DCIS are a heterogeneous group of lesions characterized by a proliferation of ductal neoplastic cells confined within the breast duct. They are distinguished from invasive carcinomas by the absence of visualization of infiltration of



European Guidelines Concerning the Transplantation of Organs from Donors with a History of Breast Cancer

Carole Mathelin¹, Beatriz Domínguez-Gil², Vahit Özmen³, Massimo Lodi⁴

¹Department of Surgery, ICANS (Institut de Cancérologie Strasbourg Europe), Strasbourg, France

²National Transplant Organization (ONT), Calle Sinesio Delgado, Madrid, Spain

³Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Surgery, Istanbul, Turkey

⁴Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), Strasbourg Cedex, France

Cite this article as: Mathelin C, Domínguez-Gil B, Özmen V, Lodi M. European Guidelines Concerning the Transplantation of Organs from Donors with a History of Breast Cancer. *Eur J Breast Health* 2023; 19(1): 106-109

Dear Editor,

The Council of Europe (CoE), based in Strasbourg (France), is an international organization that promotes cooperation among European countries in the areas of human rights, democracy, rule of law, culture and public health. Founded in 1949 by the Treaty of London, the CoE is composed of 46 member states. The CoE is a separate body from the European Union (EU), with 27 state countries, that have conferred some national legislative and executive powers to the EU, with the aim of achieving a high level of integration. In contrast, member states of the CoE maintain their sovereignty, but cooperate on the basis of common values and political decisions, and commit themselves through conventions. The CoE and the EU have a close collaboration in the field of transplantation of human organs*, tissues** and cells***, jointly promoting fundamental ethical principles, as the non-commercialization of substances of human origin, and common quality and safety standards. Within the CoE, work in the transplantation field is coordinated by the European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), which recently published the 8th edition of the Guide to the quality and safety of organs for transplantation (1), providing professionals and authorities with guidance to ensure a high level of protection for organ donors and transplant recipients.

In Europe, organ transplantation activities have steadily increased during the last few decades, except during certain periods of the Coronavirus disease-2019 pandemic (2). This increase, however, has been insufficient to cope with the transplantation needs of the European population. In 2021, 36,548 solid organ transplants were performed in CoE member States, an activity that lagged behind the volume of the transplant waiting list, estimated to include more than 138,0000 patients per annum. Approximately 20 patients have died each day on the waiting list because no organ became available (3).

There are different reasons for organ shortage, as failure to identify and refer possible organ donors, opposition to posthumous donation, or medical unsuitability. One reason why possible organ donors are deemed ineligible is a past or present history of cancer, due to the risk of transmitting cancerous cells, the development of which may be facilitated by the immunosuppressive treatments required by transplant recipients. Given the increase in the number of indications for transplants and the shortage of organs, along with a decline in the incidence of brain death and the increasing evidence about the safety limits in the utilization of organs from donors diagnosed with a variety of diseases, the current trend is to expand criteria for donor eligibility, particularly regarding donors with a history of cancer. In the 8th edition of the EDQM Guide on the quality and safety of human organs for transplantation (1), the chapter concerning the risk of transmission of cancer has been entirely reviewed to provide current evidence for assessing the risk of transplanting organs from donors with a past or present history of cancer, and from donors with a genetic predisposition to develop cancer. Though not legally binding, this document supports professional decision-making according to the best available evidence.

A history of breast cancer (BC) has a prominent place in the debate concerning the transplantation of human organs. BC is the commonest cancer type among women in Europe, and its incidence continues to rise (with 531,086 new cases, 141,765 deaths and 2,138,117 five-years prevalence in 2020). The cumulative risk of BC (0–74 years) for a European woman is 6.28% in Central and Eastern Europe, 8.45% in Southern Europe, 9.35% in Northern Europe and 9.69% in Western Europe. Western Europe is placed third in the world in terms of prevalence of



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Recommandations pour la pratique clinique

Indications des mastectomies de réduction de risque en dehors du risque avéré de prédisposition héréditaire : recommandations du Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF)



Non-genetic indications for risk reducing mastectomies: Guidelines of the National College of French Gynecologists and Obstetricians (CNGOF)

Carole Mathelin^{a,*,b}, Emmanuel Barranger^c, Martine Boissierie-Lacroix^d, Gérard Boutet^e, Susie Brousse^f, Nathalie Chabbert-Bufferet^g, Charles Coutant^h, Emile Daraï^g, Yann Delpechⁱ, Martha Duraes^j, Marc Espié^k, Luc Fornecker^l, François Golfier^m, Pascale Grosclaudeⁿ, Anne Sophie Hamy^o, Edith Kermarrec^p, Vincent Lavoué^q, Massimo Lodi^a, Élisabeth Luporsi^r, Christine M. Maugard^s, Sébastien Molière^t, Jean-Yves Seror^u, Nicolas Taris^v, Catherine Uzan^w, Charlotte Vaysse^x, Xavier Fritel^y

^a CHRU, avenue Molière, 67200 Strasbourg, France^b ICANS, 17, rue Albert-Calmette, 67033 Strasbourg cedex, France^c Centre Antoine-Lacassagne, 6, avenue de Valombrose, 06189 Nice, France^d Institut Bergonié, 229, cours de l'Argonne, 33000 Bordeaux, France^e AGREGA, service de chirurgie gynécologique et médecine de la reproduction, centre Aliénor d'Aquitaine, centre hospitalier universitaire de Bordeaux, groupe hospitalier Pellegrin, place Amélie-Raba-Léon, 33000 Bordeaux, France^f CHU de Rennes, 2, rue Henri-le-Guilloux, 35033 Rennes cedex 9, France^g Hôpital Tenon, service de gynécologie-obstétrique, 4, rue de la Chine, 75020 Paris, France^h Département d'oncologie chirurgicale, centre Georges-François-Leclerc, 1, rue du Pr-Marion, 21079 Dijon cedex, Franceⁱ Centre Antoine-Lacassagne, 33, avenue de Valombrose, 06189 Nice, France^j CHU de Montpellier, 191, avenue du Doyen-Giraud, 34295 Montpellier cedex, France^k Hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude-Vellefaux, 75010 Paris, France^l Département d'onco-hématologie, ICANS, 17, rue Albert-Calmette, 67033 Strasbourg cedex, France^m Centre hospitalier Lyon Sud, bâtiment 3B, 165, chemin du Grand-Revoyet, 69495 Pierre-Bénite, Franceⁿ CERPOP, Inserm, université Toulouse III, 31059 Toulouse, France^o Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris, France^p Hôpital Tenon, service de radiologie, 4, rue de la Chine, 75020 Paris, France^q CHU, service de gynécologie, 16, boulevard de Bulgarie, 35200 Rennes, France^r Oncologie médicale et oncogénétique, CHR Metz-Thionville, hôpital de Mercy, 1, allée du Château, 57085 Metz, France^s Service de génétique oncologique clinique, unité de génétique oncologique moléculaire, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, avenue Molière, 67200 Strasbourg, France^t Imagerie du Sein, CHRU, avenue Molière, 67200 Strasbourg, France^u 9 ter, boulevard Montparnasse, 75006 Paris, France^v Oncogénétique, ICANS, 17, rue Albert-Calmette, 67033 Strasbourg, France^w Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France^x Service de chirurgie oncologique, CHU Toulouse, institut universitaire du cancer de Toulouse-Oncopole, 1, avenue Irène-Joliot-Curie, 31059 Toulouse, France^y Centre hospitalo-universitaire de Poitiers, 2, rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : c.mathelin@icans.eu (C. Mathelin), emmanuel.barranger@nice.unicancer.fr (E. Barranger), m.boissierie-lacroix@bordeaux.unicancer.fr (M. Boissierie-Lacroix), gboutetpourgof@yahoo.fr (G. Boutet), susie.brousse@gmail.com (S. Brousse), ncbpro@gmail.com (N. Chabbert-Bufferet), CCoutant@cgfl.fr (C. Coutant), emile.darai@aphp.fr (E. Daraï), yann.delpech@nice.unicancer.fr (Y. Delpech), m-duraes@chu-montpellier.fr (M. Duraes), marc.espie@sls.aphp.fr (M. Espié), L.fornecker@icans.eu (L. Fornecker), francois.golfier@chu-lyon.fr (F. Golfier), pascale.grosclaude@inserm.fr (P. Grosclaude), hamyannesophie@gmail.com (A.S. Hamy), edithlefrapper@yahoo.fr (E. Kermarrec), Vincent.LAVOUE@chu-rennes.fr (V. Lavoué), massimo.lodi@chru-strasbourg.fr (M. Lodi), e.luporsi@chr-metz-thionville.fr (É. Luporsi), christine.maugard@chru-strasbourg.fr (C.M. Maugard), sebastien.molier@chru-strasbourg.fr (S. Molière), seror.jeanyves@gmail.com (J.-Y. Seror), n.taris@icans.eu (N. Taris), catherine.uzan@aphp.fr (C. Uzan), vaysse.charlotte@iuct-oncopole.fr (C. Vaysse), xavier.fritel@univ-poitiers.fr (X. Fritel).

<https://doi.org/10.1016/j.gofs.2021.12.005>

2468-7189/© 2022 CNGOF. Publié par Elsevier Masson. Tous droits réservés.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Recommandations pour la pratique clinique

Modalités et morbidité des mastectomies de réduction de risque en dehors du risque avéré de prédisposition héréditaire : recommandations du Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF)

Techniques and complications of non-genetic risk reducing mastectomies: Guidelines of the National College of French Gynecologists and Obstetricians (CNGOF)

C. Mathelin^{a,*,b}, E. Barranger^c, M. Boisserie-Lacroix^d, G. Boutet^e, S. Brousse^f, N. Chabbert-Buffet^g, C. Coutant^h, E. Daraï^g, Y. Delpechⁱ, M. Duraes^j, M. Espié^k, F. Golfier^l, A.S. Hamy^m, E. Kermarrecⁿ, V. Lavoué^o, M. Lodi^p, É. Luporsi^q, C. Maugard^r, S. Molière^s, J.-Y. Seror^t, N. Taris^u, C. Uzan^v, C. Vaysse^w, X. Fritel^x

^a CHRU, avenue Molière, 67200 Strasbourg, France^b ICANS, 17, rue Albert-Calmette, 67033 Strasbourg cedex, France^c Centre Antoine-Lacassagne, 36, avenue de Valombrose, 06189 Nice, France^d Institut Bergonié, 229, cours de l'Argonne, 33000 Bordeaux, France^e AGREGA, service de chirurgie gynécologique et médecine de la reproduction, centre Aliénor d'Aquitaine, centre hospitalier universitaire de Bordeaux, groupe hospitalier Pellegrin, place Amélie-Raba-Léon, 33 000 Bordeaux, France^f CHU de Rennes, 2, rue Henri-le-Guilloux, 35033 Rennes cedex 9, France^g Hôpital Tenon, 4, rue de la Chine, 75020 Paris, France^h Département d'oncologie chirurgicale, centre Georges-François-Leclerc, 1, rue du Pr Marion, 21079 Dijon cedex, Franceⁱ Centre Antoine Lacassagne, 33, avenue de Valombrose, 06189 Nice, France^j CHU de Montpellier, 191, avenue du Doyen-Giraud, 34295 Montpellier cedex, France^k Hôpital St Louis, 1, avenue Claude-Vellefaux, 75010 Paris, France^l Centre hospitalier Lyon Sud, bâtiment 3B, 165, chemin du Grand-Revoynet, 69495 Pierre Benite, France^m Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris, Franceⁿ Service de radiologie, hôpital Tenon, 4, rue de la Chine, 75020 Paris, France^o Service de gynécologie, CHU, 16, boulevard de Bulgarie, 35200 Rennes, France^p CHU, avenue Molière, 67200 Strasbourg, France^q Oncologie médicale et oncogénétique, hôpital de Mercy, CHR Metz-Thionville, 1, allée du Château, 57085 Metz, France^r Service de génétique oncologique clinique et unité de génétique oncologique moléculaire, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 1, avenue Molière, 67200 Strasbourg^s Imagerie du sein, CHRU, avenue Molière 67200 Strasbourg, France^t Cabinet privé, 9 ter boulevard Montparnasse, 75006 Paris, France^u Oncogénétique, ICANS, 17, rue Albert Calmette, 67033 Strasbourg, France^v Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France^w Service de chirurgie oncologique, CHU de Toulouse, institut universitaire du cancer de Toulouse-Oncopole, 1, avenue Irène-Joliot-Curie, 31059 Toulouse, France^x Centre hospitalo-universitaire de Poitiers, 2, rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : c.mathelin@icans.eu (C. Mathelin).



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Mise au point

Cancer du sein et greffe d'organes : revue systématique et méta-analyse



Breast cancer and organ transplantation: Systematic review and meta-analysis

M. Lapointe^a, F. Kerbaul^b, F. Meckert^b, N. Cognard^a, C. Mathelin^{a,c,*}, M. Lodi^{a,c,d}

^a CHRU, 1, avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

^b Direction prélèvement et greffe organes et tissus, direction générale médicale et scientifique, agence de la biomédecine, 93212 La Plaine cedex, France

^c Institut de cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), 17, avenue Albert-Calmette, 67200 Strasbourg cedex, France

^d Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), CNRS, UMR7104 Inserm U964, université de Strasbourg, 1, rue Laurent-Fries, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 3 août 2022

Accepté le 4 novembre 2022

Disponible sur Internet le 11 novembre 2022

Mots clés :

Transplantation

Cancer transmis par le donneur

Cancer du sein

Cancer épithélial

Bilan pré-don

R É S U M É

Objectifs. – Notre objectif principal a été d'établir un état des lieux des cas de cancers épithéliaux de toutes origines transmis par les donneurs en comparaison avec les cancers mammaires, avec analyse de l'évolution carcinologique des receveurs. Notre objectif secondaire a été de définir le bilan pré-don à réaliser avant tout prélèvement d'organe chez un donneur ayant un antécédent de cancer du sein.

Méthodologie. – Nous avons réalisé une revue systématique de la littérature jusqu'au 01/06/2022 en incluant tous les articles originaux (y compris les cas cliniques) rapportant des cas de cancer épithélial transmis du donneur au receveur, suivie d'une méta-analyse des données épidémiologiques et de survie.

Résultats. – Au total, nous avons inclus 51 articles (31 cas cliniques et 20 études de cohorte), représentant 91 388 donneurs, 236 142 receveurs et 2591 cas de cancer transmis. Le risque de cancer transmis était significativement plus élevé en cas d'antécédent de cancer du sein par rapport à l'antécédent de cancer quel que soit le type histologique (RR = 9,48 $p = 0,0025$). Dans les cas cliniques, le bilan pré-don n'était précisé que dans 33,3 % des publications. Le délai entre la greffe et la survenue d'un cancer était plus long en cas de transmission de cancer du sein par rapport aux autres cancers épithéliaux : 1435,8 jours contre 297,6 ($p < 0,001$).

Conclusion. – Prélever un organe chez une personne antérieurement traitée pour un cancer du sein ou ayant un risque d'être atteinte d'une forme occulte semble possible dans certaines situations mais nécessite un bilan pré-don adapté, le respect de référentiels de bonnes pratiques et un avis d'expert dans des situations complexes.

© 2022 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

A B S T R A C T

Objectives. – Our main objective was to investigate donor-transmitted epithelial cancers of all origins in comparison with breast cancers, with analysis of the carcinological outcome of recipients. Our secondary objective was to define medical check-up to be performed before any organ procurement from a donor with a history of breast cancer.

Methodology. – We performed a systematic review of the literature up to June 1st 2022 by including all original articles (including clinical cases) reporting cases of epithelial cancer transmitted from donor to recipient, followed by a meta-analysis of epidemiological and survival data.

Results. – In total, we included 52 articles (31 clinical cases and 21 cohort studies), representing 91,388 donors, 236,142 recipients, and 2591 cases of transmitted cancer. The risk of transmitted cancer was significantly higher with a history of breast cancer compared with a history of other cancer (RR = 9.48 $P = 0.0025$). In clinical cases, the pre-donation check-up was specified in only 33.3% of publications. The

Keywords:

Transplantation

Donor-transmitted cancer

Breast cancer

Epithelial cancer

Pre-donation assessment

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : c.mathelin@icans.eu (C. Mathelin).

Journal Pre-proof

Détection du cancer du sein à l'aide de soutiens-gorge connectés en 2021 : analyses et perspectives

Zeina Al Masry Nourredine Zerhouni Catherine Gay Safa Meraghni
Massimo Lodi Carole Mathelin Christine Devalland



PII: S2468-7189(21)00156-2

DOI: <https://doi.org/doi:10.1016/j.gofs.2021.05.008>

Reference: GOFS 3489

To appear in: *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*

Received Date: 4 March 2021

Please cite this article as: Masry ZA, Zerhouni N, Gay C, Meraghni S, Lodi M, Mathelin C, Devalland C, Détection du cancer du sein à l'aide de soutiens-gorge connectés en 2021 : analyses et perspectives, *Gynécologie Obstétrique Fertilité and Sénologie* (2021), doi: <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2021.05.008>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier.



Lipid Intake and Breast Cancer Risk: Is There a Link? A New Focus and Meta-Analysis

Massimo Lodi^{1,2,3}, Amélie Kiehl², Fei Lin Qu⁴, Victor Gabriele², Catherine Tomasetto³, Carole Mathelin^{1,3}

¹Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), Strasbourg Cedex, France

²Department of Gynecology and Obstetrics, Strasbourg University Hospital, Strasbourg Cedex, France

³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS UMR7104 INSERM U964, Illkirch-Graffenstaden, France

⁴Breast Cancer Unit, Ruijin Hospital, Shanghai, China

ABSTRACT

Objective: To determine if there is an association between total lipid intake, saturated fatty acid (SFA), Poly- and Mono-Unsaturated Fatty Acid (PUFA and MUFA) and cholesterol intake and breast cancer risk.

Materials and Methods: We conducted a systematic review of the literature and a meta-analysis following Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines. We included all cohort and case-control studies published up to December 2020 with subgroup analysis according to menopausal status.

Results: We included 44 articles for analysis. There was no association between total fat, SFA, MUFA, PUFA and cholesterol intake and breast cancer risk in the general population and in pre-menopausal women. In postmenopausal women, high SFA consumption was associated with increased breast cancer risk in case-control studies [relative risk (RR): 1.12; confidence interval (CI) 95%: 1.03–1.21; $p = 0.006$ but not in cohort studies (RR: 1.01; CI 95%: 0.85–1.19; $p = 0.93$).

Conclusion: There was a weak association between high SFA consumption and breast cancer risk in post-menopausal women, however there was high heterogeneity for this analysis. As lipids can have different actions in the same family, studies should rather focus on specific lipid consumption.

Keywords: Breast cancer risk; cholesterol; dietary fat intake; mono-unsaturated fatty acid; saturated fatty acid

Cite this article as: Lodi M, Kiehl A, Qu FL, Gabriele V, Tomasetto C, Mathelin C. Lipid Intake and Breast Cancer Risk: Is There a Link? A New Focus and Meta-Analysis. Eur J Breast Health 2022; 18(2): 108-126

Key Points

- There was no association between total fat, saturated fatty-acids, mono and poly-unsaturated fatty acids and cholesterol intake and breast cancer incidence in the general population and in pre-menopausal women.
- There was a weak association between high saturated fatty acids consumption and breast cancer risk in post-menopausal women, but the results were heterogeneous.

Introduction

Among women, breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and the leading cause of cancer-related mortality worldwide. It was estimated that in 2020 it represented over 2.2 million new cases (24.5% of all cancers) and caused over 680,000 deaths (15.5% of cancer-related deaths) (1). To date, different risk factors have been identified, some of which are potentially modifiable. Breast cancer is more commonly associated with age, environmental, hormonal and lifestyle factors than genetic factors ones (2). As it represents a major public health issue and both incidence and mortality will increase in the next decades (1), prevention focuses on acting on modifiable risk factors. Among lifestyle-related breast cancer risk factors, some are commonly accepted, including lack of physical activity (3) and overweight and obesity (4), while others are still controversial. Of interest, diet is known to play a role in the development of various cancers, such as colon cancer (5). Yet, in breast cancer the role of diet remains uncertain (2). Assessing the role of diet on breast cancer risk is complex, as diet varies between individuals, cultures and territories. Moreover, different evaluation methods exist, such as consumption of a particular food, a particular nutrient, or a particular pattern. For instance, the Mediterranean diet, dairy product consumption and fruit and vegetables intake seem to have a positive impact on reducing

Corresponding Authors:

Carole Mathelin; c.mathelin@icans.eu

Massimo Lodi; massimo.lodi@chru-strasbourg.fr

Received: 12.11.2021

Accepted: 30.11.2021

Available Online Date: 01.04.2022

Efficacy of Cabozantinib in Metastatic MiT Family Translocation Renal Cell Carcinomas

Jonathan Thouvenin^{1,2,6,*}, Omar Alhalabi^{3,†}, Maria Carlo⁴, Lucia Carril-Ajuria⁵, Laure Hirsch⁶, Nieves Martinez-Chanza⁷, Sylvie Négrier⁸, Luca Campedel⁹, Dylan Martini¹⁰, Delphine Borchellini¹¹, Jad Chahoud¹², Massimo Lodi¹, Philippe Barthélémy¹, Elshad Hasanov³, Andrew W. Hahn³, Thierry Gil⁷, Srinivas R. Viswanathan⁶, Ziad Bakouny⁶, Pavlos Msaouel³, Mehmet Asim Bilen¹⁰, Toni K. Choueiri⁶, Laurence Albiges⁵, Nizar M. Tannir^{3,§}, Gabriel G. Malouf^{1,§,*}

¹Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS/HUS), Strasbourg, France

²Institut de Cancérologie des Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

³MD Anderson Cancer Center (MDACC), Houston, TX, USA

⁴Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

⁵Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

⁶Dana-Farber Cancer Institute (DFCI), Boston, MA, USA

⁷Institut Jules Bordet, Bruxelles, Belgium

⁸Université Claude Bernard, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁹AP-HP, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

¹⁰Winship Cancer Institute of Emory University, Atlanta, GA, USA

¹¹Antoine Lacassagne Cancer Center, Nice, France

¹²Department of Genitourinary Oncology, Moffitt Cancer Center, Tampa, FL, USA

*Corresponding author: Gabriel G. Malouf, MD, PhD, Institut de Cancérologie Strasbourg, 17 rue Albert Calmette, 67200 Strasbourg, France. Tel: +33 0368766767; Email: g.malouf@icans.eu

[†]Contributed equally as co-first authors.

[§]Contributed equally as co-senior authors.

Abstract

Background: MiT family translocation renal cell carcinoma (TRCC) is a rare and aggressive subgroup of renal cell carcinoma harboring high expression of c-MET. While TRCC response rates to VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and immune checkpoint inhibitors are limited, efficacy of cabozantinib (a VEGFR, MET, and AXL inhibitor) in this subgroup is unclear.

Methods: We performed a multicenter, retrospective, international cohort study of patients with TRCC treated with cabozantinib. The main objectives were to estimate response rate according to RECIST 1.1 and to analyze progression-free survival (PFS) and overall survival (OS).

Results: Fifty-two patients with metastatic TRCC treated in the participating centers and evaluable for response were included. Median age at metastatic diagnosis was 40 years (IQR 28.5–53). Patients' IMDC risk groups at diagnosis were favorable (9/52), intermediate (35/52), and poor (8/52). Eleven (21.2%) patients received cabozantinib as frontline therapy, 15 (28.8%) at second line, and 26 (50%) at third line and beyond. The proportion of patients who achieved an objective response was 17.3%, including 2 complete responses and 7 partial responses. For 26 (50%) patients, stable disease was the best response. With a median follow-up of 25.1 months (IQR 12.6–39), median PFS was 6.8 months (95%CI 4.6–16.3) and median OS was 18.3 months (95%CI 17.0–30.6). No difference of response was identified according to fusion transcript features.

Conclusion: This real-world study provides evidence of the activity of cabozantinib in TRCC, with more durable responses than those observed historically with other VEGFR-TKIs or ICIs.

Key words: MiT family translocation renal cell carcinoma; cabozantinib; non-clear cell renal cell carcinoma.

Implications for Practice

MiT family translocation renal cell carcinoma (TRCC) is an aggressive renal cell carcinoma subtype, harboring high expression of c-MET. Validated treatment options in the metastatic setting are lacking. The activity of cabozantinib, a MET targeted agent in the treatment of metastatic TRCC patients is unknown. In this multicentric international retrospective study including 52 adults metastatic TRCC patients, 17.3% patients achieved an objective response and 26 (50%) patients had stable disease as best response. Median progression-free survival was of 6.8 months. Cabozantinib demonstrates clinical activity in the treatment of advanced TRCC and could be preferentially used in this setting.

Received: 5 February 2022; Accepted: 24 June 2022.

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press.

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 reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



The Senologic International Society Survey on Ductal Carcinoma *In Situ*: Present and Future

Carole Mathelin^{1,2,3}, Massimo Lodi^{1,2,3}, Khalid Alghamdi^{1,4}, Bolivar Arboleda-Osorio⁵, Eli Avisar⁶,
 Stanley Anyanwu⁷, Mohcen Boubnider⁸, Mauricio Maghales Costa⁹, Elisabeth Elder¹⁰, Tony Elongé¹¹,
 Luiz Gebrim¹², Xishan Hao¹³, Shigeru Imoto¹⁴, Esther Meka¹⁵, Michel Mouelle^{1,16}, Alexander Munding¹⁷,
 Valerijus Ostapenko¹⁸, Serdar Özbaş¹⁹, Tolga Özmen^{6,20}, Vahit Özmen²¹, Tadeusz Pienkowski²², Gustavo Sarria²³,
 Ashraf Selim²⁴, Vladimir Semiglazov²⁵, Schlomo Schneebaum²⁶

¹Institut de cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), 17 rue Albert Calmette, 67033 Cedex, Strasbourg, France

²Strasbourg University Hospitals, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France

³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1 rue Laurent Fries, 67404 Cedex, Illkirch, France

⁴King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia

⁵HIMA San Pablo Hospital, Porto Rico

⁶Miller Scholl of Medicine, University of Miami, Florida, United States

⁷Nnamdi Azikiwe University Teaching Hospital, Nnewi, Nigeria

⁸Centre Pierre et Marie Curie, Algiers, Algeria

⁹Americas Centro de Oncologia Integrada, Rio de Janeiro, Brazil

¹⁰Westmead Breast Cancer Institute, Westmead, Australia

¹¹Otema Hospital, Lodja, Congo Democratic Republic

¹²Perola Byington Hospital, São Paulo, Brazil

¹³Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital, Tianjin, China

¹⁴Kyorin University Hospital, Tokyo, Japan

¹⁵Yaoundé University, Yaoundé, Cameroon

¹⁶Cheikh Anta Diop University, Dakar, Senegal

¹⁷Franziskus Hospital; Niels-Stensen-Kliniken, Georgsmarienhütte, Germany

¹⁸National Cancer Institute, Vilnius, Lithuania

¹⁹Turkish Federation of Breast Disease Societies, Turkey

²⁰Jackson Memorial Hospital, Miami, Florida, United States

²¹Istanbul Florence Nightingale Breast Center, Istanbul, Turkey

²²Postgraduate Medical Education Center, Warsaw, Poland

²³Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, Lima, Peru

²⁴Faculty of Medicine, Cairo University, Cairo, Egypt

²⁵N. N. Petrov Cancer Research Centre, St. Petersburg, Russia

²⁶Sourasky Medical Center, Tel Aviv, Israel

ABSTRACT

Objective: Therapeutic management of ductal carcinoma *in situ* (DCIS) is heterogeneous among countries worldwide, and some treatment indications are still controversial. To investigate DCIS management in different countries; identify both consensual practices and controversial topics; and survey opinions about the future management of DCIS.

Materials and Methods: The Senologic International Society network members participated to an online survey using a questionnaire, between November 2021 and February 2022.

Results: Twenty-two responses from 20 different countries showed that organized breast cancer screening programs were present for 87% participants, and DCIS cases represented 13.7% of all breast cancers. Most participants used the grade classification (100%), the morphological classification (78%) and performed immunohistochemistry assays (73%). In case of conservative treatment, the mean re-excision rate was 10.3% and clear margins of mean 2.5 mm were considered healthy. Radical mastectomy rate was 35.5% with a breast reconstruction rate of 53%. Tumor bed boost indications were heterogeneous, and 73% of participants indicated hormone therapy for hormone-positive DCIS. Surgery and radiotherapy omission for some low-risk DCIS were considered by 73% of participants. Multigene assays were used by 43% of participants. Concerning future changes in DCIS management, participants mostly answered surgical de-escalation (48%), radiotherapy de-escalation (35) and/or active surveillance for some cases (22%).

Conclusion: This survey provided an overview of the current practices of DCIS management worldwide. It showed that some areas are rather consensual: incidence increases over time, treatment in young women, pathological classifications, definition of healthy margins, the skin-sparing mastectomy and



Narrative review of sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a technique in constant evolution with still numerous unresolved questions

Carole Mathelin^{1,2}, Massimo Lodi^{1,2}

¹Service de chirurgie, Institut de cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), Strasbourg Cedex, France; ²Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), UMR 7104 CNRS, U596 INSERM, ULP, BP 10142, Illkirch Cedex, France

Contributions: (I) Conception and design: C Mathelin; (II) Administrative support: C Mathelin; (III) Provision of study materials or patients: All authors; (IV) Collection and assembly of data: All authors; (V) Data analysis and interpretation: All authors; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

Correspondence to: Carole Mathelin, MD, PhD. Past President of the International Society of Senology (SIS), Service de chirurgie, Institut de cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), Strasbourg Cedex, France. Email: C.Mathelin@icans.eu.

Abstract: The aim of this narrative review was to provide an update on the use of sentinel lymph node biopsy (SLNB) for breast carcinoma (BC). Relevant studies published between 01/01/1994 and 15/08/2020 assessing the accuracy and the usefulness of SLNB were reviewed. SLNB was first used in 1977 for penile cancers. However, it took 17 years to enter in clinical practice for BC. The first procedures were based on two methods of non-specific marking of LN macrophages using a radioisotope (^{99m}Tc) and a blue dye (BD, Isosulfan, Patent or Methylene). To overcome side effects of radioisotopes (radiation exposure) and BD (allergic reactions), innovative tracers such as indocyanine green (ICG), superparamagnetic iron oxide (SPIO), and microbubbles have been explored. The SLN intraoperative examination is no longer performed, due to its low impact on the rate of reoperation and high time and cost of surgery. Likewise, immunohistochemistry, which can lead to an unnecessary ALND in some cases of occult metastases, is no more recommended. Except cases with metastasized LN, all contraindications aim to avoid situations where the risk of false negative would be too high (notably T3-T4 or multicentric tumors). The current indications for invasive BC are T0-T1-T2 N0 or N1 (after an accurate LN evaluation with ultrasound and/or cytology or core biopsy) and for DCIS treated by mastectomy or presenting as a palpable mass. After SLNB, axillary recurrence rates are generally below 2% after a follow up of 8–10 years, comparable to those observed after ALN. Likewise, when the SLN contains less than 2 metastases, axillary recurrence rates remain low even when ALN is omitted. In case of more than 2 metastatic SLN or capsular effraction, ALND is still indicated. For most teams, SLNB can be performed in clinically node-negative patients receiving neoadjuvant systemic therapy. The results of the literature consistently show that SLNB is extremely reliable in selected BC, as long as it is performed with a rigorous technique by teams having undergone multidisciplinary training and having gained the necessary experience.

Keywords: Breast cancer (BC); invasive breast carcinoma (invasive BC); ductal carcinoma *in situ* (DCIS); sentinel lymph node (SLN); lymphoscintigraphy

Submitted Aug 21, 2020. Accepted for publication Nov 23, 2020.

doi: 10.21037/cco-20-207

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/cco-20-207>



Breast Cancer Management During the COVID-19 Pandemic: The Senologic International Society Survey

Carole Mathelin^{1,2}, Shanti Ame¹, Stanley Anyanwu³, Eli Avisar⁴, Wahib Mohcen Boubnider⁵, Katrin Breiting⁶,
 Hannah Ayettey Anie⁷, José Carlos Conceição⁸, Veronique Dupont⁹, Elisabeth Elder¹⁰, Constanze Elfgen¹¹,
 Tony Elongé¹², Edelmiro Iglesias¹³, Shigeru Imoto¹⁴, Lydia Ioannidou-Mouzaka¹⁵, Elisabeth A Kappos¹⁶,
 Martin Kaufmann¹⁷, Michael Knauer¹⁸, Franck Luzuy¹⁹, Marko Margaritoni²⁰, Mamadou Mbodj²¹,
 Alexander Mundinger²², Ruben Orda²³, Valerijus Ostapenko²⁴, Serdar Özbaş²⁵, Vahit Özmen²⁶,
 Olivia Pagani²⁷, Tadeusz Pieńkowski²⁸, Schlomo Schneebaum²⁹, Ekaterina Shmalts³⁰, Ashraf Selim³¹, Zotov Pavel³²,
 Massimo Lodi¹, Maurício Maghales-Costa³³

¹Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), Strasbourg Cedex, France

²Immediate the Senology International Society (SIS) Past President, France

³The Senology International Society Vice-President for Africa, Nigeria

⁴Miller School of Medicine, University of Miami, USA

⁵Department of Breast Surgery, Centre Pierre-et-Marie-Curie, Alger, Algeria

⁶Breast Center, Schaffhausen Hospital, Switzerland

⁷Radiotherapy Oncology and Nuclear Medicine Centre, Ghana

⁸Brazilian National Cancer Institute, Rio de Janeiro Federal University, Brazil

⁹Department of Breast Surgery, St Gallen, Switzerland

¹⁰Westmead Breast Cancer Institute, University of Sydney, Australia

¹¹Breast Cancer Center, Zurich, Switzerland

¹²Hôpital Otema, Congo Democratic Republic

¹³The Senology International Society (SIS) Vice-President for Europe, Spain

¹⁴Kyorin University Hospital, Japan

¹⁵President of the upcoming Senology International Society (SIS) Congress, Greece

¹⁶Breast Center and Department of Plastic, Reconstructive, Aesthetic and Handsurgery, University Hospital Basel, Switzerland

¹⁷Breast Center, Bülach Hospital, Switzerland

¹⁸Breast Center Eastern Switzerland, St. Gallen, Switzerland

¹⁹Department of Breast Surgery, Hirslanden Clinic, Geneva, Switzerland

²⁰Department of Plastic surgery, Dubrovnik General Hospital, Croatia

²¹Department of Nuclear Medicine, General Hospital Idrissa POUYE, Dakar, Senegal

²²The Senology International Society (SIS) auditor, Germany

²³The Senology International Society (SIS) International School of Senology, Israel

²⁴National Cancer Institute Vilnius, Lithuania

²⁵Surgical Private Practice, Ankara, Turkey

²⁶The Senology International Society (SIS) Standing Committee, Turkey

²⁷Department of Oncology, Breast Unit and Institute of Oncology of Southern Switzerland

²⁸The Senology International Society (SIS) auditor, Poland

²⁹The Senology International Society (SIS) President Elect, Israel

³⁰Department of Oncology, Multi-field Clinical Medical Centre "Medical City", Tyumen, Russia

³¹Department of Radiology, Cairo University, Egypt

³²Department of Oncology, Tyumen State Medical University, Russia

³³The Senology International Society (SIS) President, Brazil

Nathalie Reix*, Massimo Lodi, Stéphane Jankowski, Sébastien Molière, Elisabeth Luporsi, Suzanne Leblanc, Louise Scheer, Issam Ibnouhsein, Julie-Charlotte Benabu, Victor Gabriele, Alberto Guggiola, Jean-Marc Lessinger, Marie-Pierre Chenard, Fabien Alpy, Jean-Pierre Bellocq, Karl Neuberger, Catherine Tomasetto and Carole Mathelin

A novel machine learning-derived decision tree including uPA/PAI-1 for breast cancer care

<https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1065>

Received September 28, 2018; accepted November 6, 2018

Abstract

Background: uPA and PAI-1 are breast cancer biomarkers that evaluate the benefit of chemotherapy (CT) for HER2-negative, estrogen receptor-positive, low or intermediate grade patients. Our objectives were to observe clinical routine use of uPA/PAI-1 and to build a new therapeutic decision tree integrating uPA/PAI-1.

Methods: We observed the concordance between CT indications proposed by a canonical decision tree representative of French practices (not including uPA/PAI-1) and actual CT prescriptions decided by a medical board which included uPA/PAI-1. We used a method of machine learning for the analysis of concordant and non-concordant CT prescriptions to generate a novel scheme for CT indications.

Results: We observed a concordance rate of 71% between indications proposed by the canonical decision tree and

actual prescriptions. Discrepancies were due to CT contraindications, high tumor grade and uPA/PAI-1 level. Altogether, uPA/PAI-1 were a decisive factor for the final decision in 17% of cases by avoiding CT prescription in two-thirds of cases and inducing CT in other cases. Remarkably, we noted that in routine practice, elevated uPA/PAI-1 levels seem not to be considered as a sufficient indication for CT for $N \leq 3$, $Ki\ 67 \leq 30\%$ tumors, but are considered in association with at least one additional marker such as $Ki\ 67 > 14\%$, vascular invasion and ER-H score < 150 .

Conclusions: This study highlights that in the routine clinical practice uPA/PAI-1 are never used as the sole indication for CT. Combined with other routinely used biomarkers, uPA/PAI-1 present an added value to orientate the therapeutic choice.

Keywords: breast cancer; chemotherapy; machine learning; over- and under-treatment; survival; uPA/PAI-1.

*Corresponding author: **Nathalie Reix**, PhD, Clinical Biologist, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, Strasbourg, France; and ICube UMR 7357, Université de Strasbourg/CNRS, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), 4 rue Kirschleger, Strasbourg, France, Phone: 00 33 3 69 55 08 27; Fax: 00 33 3 69 55 18 85, E-mail: nathalie.reix@chru-strasbourg.fr

Massimo Lodi: Unité de Sénologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; and Department of Functional Genomics and Cancer, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France
Stéphane Jankowski, Issam Ibnouhsein, Alberto Guggiola and Karl Neuberger: Quantmetry, Paris, France

Sébastien Molière: Department of Imaging, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Elisabeth Luporsi: Service d'oncologie médicale, Centre Hospitalier Régional de Metz-Thionville, Hôpital de Mercy, Metz, France

Suzanne Leblanc: Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; and Service de Pathologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Louise Scheer, Julie-Charlotte Benabu and Victor Gabriele: Unité de Sénologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Jean-Marc Lessinger: Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Marie-Pierre Chenard: Service de Pathologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; and Department of Functional Genomics and Cancer, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France

Fabien Alpy and Catherine Tomasetto: Department of Functional Genomics and Cancer, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France

Jean-Pierre Bellocq: Service de Pathologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Carole Mathelin: Unité de Sénologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; and Department of Functional Genomics and Cancer, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France; and Centre Hospitalier de Sarrebourg, Sarrebourg, France



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Éditorial

Covid-19 et cancer du sein : les premières leçons d'une pandémie

Covid-19 and breast cancer: First lessons of a pandemic

INFO ARTICLE

Mots clés :

Cancer du sein
Covid-19
Pandémie
Pratiques cliniques
SARS-Cov-2

Keywords:

Breast cancer
Clinical practices
Covid-19
Pandemic
SARS-Cov-2

En 2020, la COVID-19 s'est propagée dans le monde entier, avec une mortalité nettement supérieure à celle de la grippe, dépassant actuellement 2,5 millions de décès. Les premières publications ont alerté sur une plus grande susceptibilité des patients âgés et/ou présentant des comorbidités, notamment le cancer, à développer des formes graves de COVID-19 [1]. Le cancer du sein étant le premier cancer chez les femmes dans le monde, avec plus de 2 millions de nouveaux cas et plus de 650 000 décès chaque année, la situation a été considérée comme particulièrement préoccupante pour les femmes concernées.

De nombreuses sociétés scientifiques dont le CNGOF ont alors publié une série de recommandations modifiant la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein afin de préserver en théorie la qualité des soins oncologiques, tout en évitant un risque croissant de contamination par le SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2) [2,3]. L'enquête de la Société Internationale de Sénologie (SIS) auprès de 25 pays (totalisant 1,505 milliard de personnes et 19,6 % de la population mondiale totale) a montré que beaucoup de pays ont adopté des mesures similaires [4]. En particulier, les programmes de dépistage ont été suspendus, les interventions chirurgicales oncologiques jugées « non urgentes » ont été reportées, les chirurgies réparatrices ont été annulées tandis que les traitements médicaux et la radiothérapie ont été adaptés avec des protocoles souvent hypofractionnés. Par ailleurs, la place de la télé-médecine a été particulièrement renforcée, afin d'éviter les lieux à risque de contamination.

Tous ces changements étaient basés sur les données épidémiologiques initiales alarmantes avec un risque de décès par COVID-19 cinq fois plus élevé pour les patients atteints de cancer

(OR 5,34, IC 95 % 1,80–16,18 ; $p = 0,0026$) [1]. Toutefois, la proportion de femmes atteintes d'un cancer du sein était particulièrement faible dans ces études initiales (3 dans la série chinoise [1], 27 dans l'étude new yorkaise [5], 40 dans l'étude brésilienne [6]). Les publications ultérieures, basées sur de plus grands effectifs, ont été beaucoup plus rassurantes. Par exemple, Miyashita et al. [7] ont montré, sur 5688 patients dont 344 atteints de cancers, que les patients cancéreux (tous sexes confondus) ne présentaient qu'un risque légèrement plus élevé de forme grave de COVID-19 (RR 1,89 ; IC 95 % : 1,37–2,61) sans augmentation des décès (RR 1,15 ; IC 95 % : 0,84–1,57). De plus, il est rapidement apparu dans la plupart des pays, sauf le Vietnam, la Belgique et le Canada, que les femmes avaient un risque plus faible de contracter une COVID-19 que les hommes, qu'elles étaient moins exposées à des formes graves et avaient une mortalité moindre [8]. Concernant plus spécifiquement le cancer du sein, il a été montré que l'impact du COVID-19 sur la mortalité était moins important en comparaison avec d'autres types de cancer. Ainsi, Lee et al. [9] ont montré, sur une cohorte britannique de 800 patients, que les femmes atteintes d'un cancer du sein avaient un risque particulièrement faible de mortalité par rapport aux autres cancers (OR 0,48 (0,28–0,84), $p = 0,009$). De même, dans une étude française portant sur 76 patientes atteintes d'un cancer du sein précoce ou métastatique avec une suspicion de COVID-19, Vuagnat et al. [10] ont montré que l'hypertension et l'âge avancé (> 70 ans) étaient les deux facteurs les plus associés à un risque de forme grave de COVID-19 et/ou de décès, et non le traitement oncologique en cours.

Quelques mois après le début de la pandémie, de nombreuses sociétés de sénologie de par le monde ont plaidé pour une analyse de l'impact oncologique des changements de prise en charge des cancers du sein pendant la pandémie [4]. En Italie, Vanni et al. [11] ont analysé une cohorte multicentrique de 432 patientes afin d'évaluer les répercussions de l'arrêt du dépistage et du délai chirurgical allongé sur la stadification du cancer du sein. Ils ont montré que le cancer était plus avancé au moment du diagnostic et que les ganglions lymphatiques étaient plus souvent métastatiques. En Angleterre, Maringe et al. [12] ont établi un modèle prédictif d'analyse de la mortalité par cancer du sein et ont estimé, pour les 5 années à venir, une augmentation de 7,9 à 9,6 % du nombre de décès dus au cancer du sein, liée aux modifications de la prise en charge oncologique pendant la pandémie. Aux États-Unis, Johnson et al. [13] ont réalisé une méta-analyse pour évaluer l'impact du retard chirurgical sur la survie des patients traités pour un cancer

<https://doi.org/10.1016/j.gofs.2021.02.003>

2468-7189/© 2021 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Video article



A step-by-step demonstration of laparoscopic sentinel lymph node mapping according to current guidelines

Lise Lecointre ^{1,2,3}, Massimo Lodi,^{4,5} Camille Martel,² Benoît Gallix,^{1,3,6} Denis Querleu ^{1,2,7}, Chérif Akladios²

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/ijgc-2022-003597>).

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Dr Lise Lecointre, IHU-Strasbourg (Institut Hospitalo-Universitaire), 67091 Strasbourg, France; lise.lecointre@chru-strasbourg.fr

Accepted 14 June 2022
Published Online First
29 June 2022

The loco-regional metastatic or non-metastatic status of related lymph nodes (LN), is critical to managing adjuvant therapy for most cancer patients. This is because the presence or absence of lymphatic metastases is essential for the accurate staging of the disease.¹ The introduction of sentinel lymph node (SLN) biopsy was an important evolution in oncologic surgery. In endometrial cancer (EC) staging, SLN is now approved by European and National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines, even in high-risk diseases.^{1,2} However, SLN procedures for EC have several limitations, including reliability, accuracy and potential procedure-related complications. The risk of SLN complications is always present, but is most commonly related to technical issues due to a lack of experience.³ Common mistakes, especially at the early stages of the learning curve, include inadequate injection sites, removal of second/third level nodes,

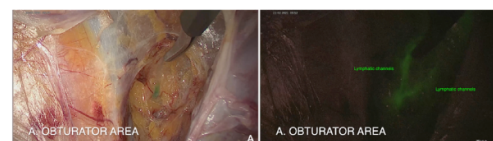


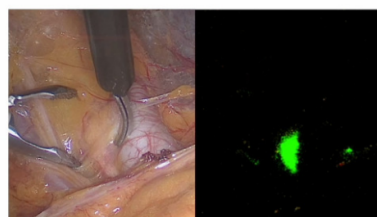
Figure 1 Lymphatics channels in obturator area, real image (A) and ICG image (B). The dissection technique consists of identifying the lymphatic channels in the lateral spaces and avoiding disturbing them in order to accurately target the sentinel lymph node.

and/or empty nodes.^{3,4} To overcome these difficulties, a surgical algorithm exists and is published in the NCCN.² However, adherence to this algorithm may vary and these variations of surgical techniques potentially impact diagnostic accuracy and oncological outcomes.

INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL CANCER

A step-by-step demonstration of laparoscopic sentinel lymph node mapping according to current guidelines

Lise Lecointre, MD ^{1,2,3}, Massimo Lodi, MD ^{1,4,5}, Camille Martel, MD ¹, Benoît Gallix ^{2,3,6}, Denis Querleu, MD PhD ^{1,2,7}, Chérif Akladios, MD PhD ¹



Affiliations

- 1 University of Strasbourg, Department of Gynecologic Surgery, Strasbourg, France
- 2 IHU-Strasbourg (Institut Hospitalo-Universitaire), Institute of Image-Guided Surgery, Strasbourg, France
- 3 Icube - Institut de Recherche en Informatique et de Robotique - Laboratoire des sciences de l'ingénieur, de l'informatique et de l'imagerie, CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France
- 4 Department of Oncologic Surgery, Institut de cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), Strasbourg, France
- 5 Functional Genomics and Cancer Departement, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U1258, CNRS UMR7104, Illkirch-Graffenstaden, France
- 6 Department of Diagnostic Radiology, McGill University, Montreal, Canada
- 7 Dipartimento Scienze della Salute della Donna e del Bambino, Fondazione Policlinico Universitario A Gemelli IRCCS, Rome, Italy



© IGCS and ESGO 2022. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Lecointre L, Lodi M, Martel C, et al. *Int J Gynecol Cancer* 2022;**32**:1212–1213.

@IJGOnline

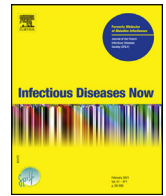
Copyright © 2022 BMJ Publishing Group Ltd, International Gynecological Cancer Society, & European Society of Gynaecological Oncology. All rights reserved.

Video 1 This video provides a step-by-step demonstration of laparoscopic sentinel lymph node mapping according to current guidelines. Sentinel lymph node dissection is widely used for staging endometrial cancer. However, variations of surgical techniques potentially impact diagnostic accuracy and oncological outcomes, thus creating barriers to comparing outcomes across institutions or clinical trial sites. This educational video's aim is to suggest a surgical guide for SLN dissection in endometrial cancer and to improve surgical practices.



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Original article

3D-printed simulator for nasopharyngeal swab collection for COVID-19



A. Koch^{a,*}, M. Vermeil^a, Y. Hansmann^b, M. Lodi^{a,c}, C. Mura^b, A. Sananes^a, S. Gallien^d,
 É. Wurtz^e, A. Bleibtreu^f, M. Martinot^g, J. Exinger^h, X. Lescureⁱ, S. Kerneis^j, K. Lacombe^k,
 J.Y. Mootien^l, C. Shawali^m, L. Lecointre^{a,n}, C. Debry^{o,p}, N. Lefebvre^b, N. Sananes^{a,o}

^a Obstetrics department, Strasbourg university hospital, Strasbourg, France

^b Infectious diseases department, Strasbourg university hospital, Strasbourg, France

^c CNRS UMR 7104, Inserm U964, Institute of genetics and molecular and cellular biology (IGBMC), Illkirch-Graffenstaden, France

^d Infectious diseases department, Crêteil hospital, Crêteil, France

^e Infectious diseases department, Saverne hospital, Saverne, France

^f Infectious diseases department, Pitié-Salpêtrière hospital, Paris, France

^g Infectious diseases department, Pasteur hospital, Colmar, France

^h Medical biology laboratory, Haguenau hospital, Haguenau, France

ⁱ Infectious diseases department, Bichat hospital, Paris, France

^j Infectious diseases department, Cochin hospital, Paris, France

^k Infectious diseases department, Saint-Antoine hospital, Paris, France

^l Medical Intensive Care Unit, Mulhouse and South Alsace Regional hospital Center, Mulhouse, France

^m Medical biology laboratory, Sélestat Hospital, Sélestat, France

ⁿ I-Cube UMR 7357, Engineering, Information Processing and Image Sciences Lab, Strasbourg university, Strasbourg, France

^o Inserm UMR-S 1121 'Biomaterials and Bioengineering', Strasbourg university, Strasbourg, France

^p ENT Department, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1st December 2021

Received in revised form 5 January 2022

Accepted 2 February 2022

Available online 8 February 2022

ABSTRACT

Objectives: Diagnosis of COVID-19 is essential to prevent the spread of SARS-CoV-2. Nasopharyngeal swabs (NPS) remain the gold standard in screening, although associated with false negative results (up to 30%). We developed a 3D simulator of the nasal and pharyngeal cavities for the learning and improvement of NPS collection.

Patients and methods: Simulator training sessions were carried out in 11 centers in France. A questionnaire assessing the simulator was administered at the end of the sessions. The study population included both healthcare workers (HCW) and volunteers from the general population.

Results: Out of 589 participants, overall satisfaction was scored 9.0 [8.9–9.1] on a scale of 0 to 10 with excellent results in the 16 evaluation items of each category (HCWs and general population, NPS novices and experienced). The simulator was considered very realistic (95%), easy to use (97%), useful to understand the anatomy (89%) and NPS sampling technique (93%). This educational tool was considered essential (93%). Participants felt their future NPS would be more reliable (72%), less painful (70%), easier to perform (88%) and that they would be carried out more serenely (90%). The mean number of NPS conducted on the simulator to feel at ease was two; technical fluency with the simulator can thus be acquired quickly.

Conclusion: Our simulator, whose 3D printing can be reproduced freely using a permanent open access link, is an essential educational tool to standardize the learning and improvement of NPS collection. It should enhance virus detection and thus contribute to better pandemic control.

1. Introduction

Testing is essential for controlling the COVID-19 pandemic since it enables better follow-up of epidemic markers, isolation of positive cases and where applicable contact tracing [1,2]. COVID-19 testing should be performed by obtaining a specimen from the upper respiratory tract [3]. Nasopharyngeal swab (NPS) collection

* Corresponding author. Obstetrics department, Strasbourg university hospital, rue Louis-Pasteur, 67300 Schiltigheim, France.

E-mail address: antoine.koch@chru-strasbourg.fr (A. Koch).



Review

Diagnostic Accuracy and Clinical Impact of Sentinel Lymph Node Sampling in Endometrial Cancer at High Risk of Recurrence: A Meta-Analysis

Lise Lecointre ^{1,2,3} , Massimo Lodi ^{1,4,*} , Émilie Faller ¹, Thomas Boisramé ¹ , Vincent Agnus ³, Jean-Jacques Baldauf ¹, Benoît Gallix ^{2,3,5} and Chérif Akladios ¹

¹ Department of Gynecologic Surgery, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67200 Strasbourg, France; lise.lecointre@chru-strasbourg.fr (L.L.); emilie.faller@chru-strasbourg.fr (É.F.); thomas.boisrame@chru-strasbourg.fr (T.B.); jean-jaques.baldauf@chru-strasbourg.fr (J.-J.B.); cherif.akladios@chru-strasbourg.fr (C.A.)

² I-Cube UMR 7357-Laboratoire des Sciences de L'ingénieur, de L'informatique et de L'imagerie, Université de Strasbourg, 67081 Strasbourg, France; benoit.gallix@ihu-strasbourg.fr

³ Institut hospitalo-universitaire (IHU), Institute for Minimally Invasive Hybrid Image-Guided Surgery, Université de Strasbourg, 67081 Strasbourg, France; vincent.agnus@ihu-strasbourg.fr

⁴ Functional Genomics and Cancer Departement, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U1258, CNRS UMR7104, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

⁵ Department of Diagnostic Radiology, McGill University, Montreal, QC H3A 2T5, Canada

* Correspondence: Massimo.lodi@chru-strasbourg.fr

Received: 9 October 2020; Accepted: 25 November 2020; Published: 28 November 2020



Abstract: Purpose. To assess the value of sentinel lymph node (SLN) sampling in high risk endometrial cancer according to the ESMO-ESGO-ESTRO classification. Methods. We performed a comprehensive search on PubMed for clinical trials evaluating SLN sampling in patients with high risk endometrial cancer: stage I endometrioid, grade 3, with at least 50% myometrial invasion, regardless of lymphovascular space invasion status; or stage II; or node-negative stage III endometrioid, no residual disease; or non-endometrioid (serous or clear cell or undifferentiated carcinoma, or carcinosarcoma). All patients underwent SLN sampling followed by pelvic with or without para-aortic lymphadenectomy. Results. We included 17 original studies concerning 1322 women. Mean detection rates were 89% for unilateral and 68% for bilateral. Pooled sensitivity was 88.5% (95%CI: 81.2–93.2%), negative predictive value was 96.0% (95%CI: 93.1–97.7%), and false negative rate was 11.5% (95%CI: 6.8; 18.8%). We noted heterogeneity in SLN techniques between studies, concerning the tracer and its detection, the injection site, the number of injections, and the surgical approach. Finally, we found a correlation between the number of patients included and the SLN sampling performances. Discussion. This meta-analysis estimated the SLN sampling performances in high risk endometrial cancer patients. Data from the literature show the feasibility, the safety, the limits, and the impact on surgical de-escalation of this technique. In conclusion, our study supports the hypothesis that SLN sampling could be a valuable technique to diagnose lymph node involvement for patients with high risk endometrial cancer in replacement of conventional lymphadenectomy. Consequently, randomized clinical trials are necessary to confirm this hypothesis.

Keywords: endometrial cancer; sentinel lymph node; high risk

1. Introduction

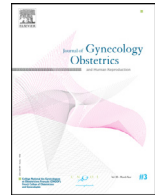
Endometrial cancer represents the sixth diagnosed cancer among women, representing 382,069 new cases and 89,929 deaths in 2018 worldwide [1]. This cancer usually affects women after menopause,



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction

journal homepage: www.elsevier.com

Original Article

Impact of surgery for colorectal endometriosis on postoperative fertility and pregnancy outcomes



Mathilde Lapointe^a, Mary Pontvianne^a, Emilie Faller^{a,*}, Massimo Lodi^a, Françoise Futcher^a,
Lise Lecointre^a, Arnaud Wattiez^{b,c}, Cherif Akladios^a

^a Gynecology Department, Hôpital de Hautepierre, Service de Gynécologie, 1 Avenue Molière, Strasbourg 67200, France

^b University of Strasbourg, Alsace, France

^c Latifa Hospital, Dubai, United Arab Emirates

ARTICLE INFO

Article History:

Received 15 March 2021

Revised 4 January 2022

Accepted 24 February 2022

Available online 26 February 2022

Keywords:

Colorectal endometriosis

Deep infiltrating endometriosis

Fertility

ABSTRACT

Introduction: Deep infiltrative endometriosis can lead to infertility with a spontaneous pregnancy rate between 8.7 and 13%. Surgical treatment of bowel endometriosis may improve spontaneous and ART fertility. The aim of this study was to evaluate post-operative fertility according to the surgical technic used (shaving vs. bowel resection).

Material and method: A retrospective, monocentric study was carried-out in the University Hospital of Strasbourg, France, from September 2009 to October 2016. All patients with a desire to become pregnant and treated for colorectal deep infiltrating endometriosis were included. Two groups were analyzed and compared: shaving treatment vs. digestive resection (discoid or segmental). The primary outcome was pregnancy rate after surgery. Secondary outcomes were: mode of pregnancy occurrence (spontaneous versus ART), time of onset, term at birth, occurrence of complications during pregnancy.

Results: 94 patients were included (39 had a bowel resection and 55 a shaving). Both groups had similar pre-operative characteristics. The pregnancy rate was 52.1% for the total population with no significant differences between the two groups ($p = 0.68$). However, we found a significantly higher spontaneous pregnancies rate among the resection group with 73.7% ($p = 0.0086$). Pregnancy complications occurred in 50% of pregnancies, regardless of the surgical technic used.

Conclusion: This study suggests that, for patients with colorectal DIE, surgical treatment improves overall fertility. Furthermore, resection surgery seems to significantly improve the occurrence of spontaneous pregnancies. However, this surgery is not without risks and multidisciplinary discussions and thorough information to the patient are a prerequisite.

© 2022 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Endometriosis is defined as the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity, inducing a chronic inflammatory reaction [1]. Its symptoms are varied and unspecific (dysmenorrhea, dyspareunia, dyschesia, functional urinary symptoms, infertility, chronic pelvic pain etc.) which leads to a delay in diagnosis, of 6 to 9 years [2–4]. It affects about 10 % of women [5] among which 20% suffer with deep infiltrating endometriosis (DIE) [6]. The European Society of Human Reproduction and Embryology

(ESHRE) defines DIE as infiltration of endometriotic tissue more than 5 mm below the peritoneum. Colorectal lesions including the recto-sigmoid junction and the rectum represent the most severe forms affecting 5.3 to 12% of patients with DIE. This pathology concerns a large population of women, most of them in childbearing age, for whom it becomes essential that our management improves both in term of painful symptoms and infertility. Indeed, endometriosis is found in 20 to 50 % of patients consulting for infertility [6,7] and the spontaneous pregnancy rate in patients with DIE is between 8.7 to 13%. Surgery appears to improve the fertility rate in DIE patients for both, spontaneous pregnancy and IVF [7–10]. However, several surgical techniques for DIE involving the bowel are described, shaving or resection, without proven superiority for any of them [3,11]. Removal of the entire disease area can be done by shaving. In fact, even in cases of bowel resection, endometriosis can be found in the margins and as multifocal disease. Philosophy is different from

Abbreviations: AFC, antral follicular count; AMH, anti-Mullerian hormone; ART, assisted reproductive techniques; DIE, deep infiltrating endometriosis; HAS, Haute Autorité de Santé (The French Health Authority); ICSI, intracytoplasmic sperm injection; IUGR, intrauterine growth retardation; IVF, *in vitro* fertilization; MFR, monthly fertility rate; MRI, magnetic resonance imaging; WG, weeks of gestation

* Corresponding author.

E-mail address: emilie.faller@chru-strasbourg.fr (F. Emilie).

<https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2022.102348>

2468-7847/© 2022 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

▶ VIDEO ARTICLE

Nerve Anatomy Around Lumbo-aortic Lymphadenectomy by Retroperitoneal Approach

Marine Osada, MD, Lise Lecointre, MD, Massimo Lodi, MD, Emilie Faller, MD, Thomas Boisrame, MD, Aline Host, MD, Victor Gabriele, MD, Olivier Garbin, MD, and Cherif Akladios, MD, PhD

From the Department of Obstetrics and Gynecology, Strasbourg University Hospital (all authors), I-Cube UMR 7357, Engineering, Information Processing and Image Sciences Lab, Strasbourg University (Dr. Lecointre), and IHU (University Hospital Institute), (Dr. Lecointre) Strasbourg, France

ABSTRACT **Study Objective:** To describe the anatomy of the nerves during a laparoscopic retroperitoneal para-aortic lymphadenectomy with prioritization of their preservation.

Design: Demonstration of a nerve-preserving para-aortic lymphadenectomy.

Setting: A 65-year-old woman with no significant medical history underwent diagnostic laparoscopy for evaluation of a right ovarian mass. In the absence of peritoneal carcinomatosis, bilateral adnexectomy was performed with pathology revealing a high-grade tubo-ovarian serous carcinoma. In accordance with French Guidelines for management of ovarian cancer, operative staging including pelvic and para-aortic lymphadenectomy was recommended [1]. Final pathology following staging surgery was consistent with stage IA high-grade serous ovarian cancer prompting administration of adjuvant chemotherapy postoperatively.

Interventions: We performed a lumbo-aortic lymphadenectomy with preservation of the following nerves: the superior hypogastric plexus, the lumbar splanchnic nerves and the sympathetic trunk.

Conclusion: Although there are conflicting data as to the benefit of staging lymphadenectomy in women with presumed early stage high-grade serous ovarian cancer, current French Guidelines recommend its performance. When doing so, effort should be made to avoid injury to adjacent normal structures, and in doing so, minimize potential morbidity. The neural structures preserved in this case are part of the sympathetic contingent and participate in the innervation of the abdomen and pelvic viscera. The sympathetic contingent is responsible for the vasomotricity but is also involved in the contraction of the internal genitalia during orgasm and in the inhibition of the peristaltic contractions of the rectum. As such, its preservation may avoid certain postoperative complaints. When possible to do so without compromising essential elements of a cancer surgery, preservation of nerves should be considered. *Journal of Minimally Invasive Gynecology* (2022) 00, 1–1. © 2022 AAGL. All rights reserved.

Keywords: Nerves structures; Sympathetic trunk; Superior hypogastric plexus; Lumbar splanchnic nerves

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2022.02.002>.

Reference

1. Lavoue V, Huchon C, Akladios C, et al. Management of epithelial cancer of the ovary, fallopian tube, and primary peritoneum. Long text of the Joint French Clinical Practice Guidelines issued by FRANCOGYN, CNGOF, SFOG, and GINECO-ARCAGY, and endorsed by INCa. Part 1: Diagnostic exploration and staging, surgery, perioperative care, and pathology. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2019;48:369–378.

The authors declare that they have no conflict of interest.
The patient has signed a no objection form for personal data
Corresponding author: Marine Osada, MD, Department of Obstetrics and Gynecology, Strasbourg University Hospital, 1 Ave Molière., Strasbourg 67200, France.
E-mail: osadamarine@gmail.com

Submitted October 14, 2021, Revised January 25, 2022, Accepted for publication February 2, 2022.
Available at www.sciencedirect.com and www.jmig.org



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Infection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinf

Letter to the Editor

Multicentric evaluation of a 3D-printed simulator for COVID-19 nasopharyngeal swab collection in testing centers

In 2021, reliable knowledge of the COVID status of individuals became a global public health issue, from an epidemiological point of view - to contain the pandemic - but also from an economical one, as repeated testings represent a significant financial burden. COVID-19 diagnosis relies on RT-qPCR from nasopharyngeal swab (NPS) sample, which is considered as the gold standard for testing both asymptomatic and symptomatic persons, especially as recent studies described up to 46% of false positivity of antigen tests.¹⁻³ If NPS were performed by medical staff at the beginning of the pandemic, they were rapidly passed on to other providers, sometime without any specific training or past experience. This enabled widescale upscaling with the retrieval of larger number of samples, but the absence of specific training for samplers raised the issue of sample quality and patients' acceptance and comfort during swabbing. Incorrectly performed, NPS can result in false negatives, therefore missing positive patients and detrimentally impacting on the pandemic.⁴ Furthermore, several oto-rhino-laryngological injuries have been reported, including osteo-meningeal breaches with cerebrospinal fluid leaks.⁵ Thus, poorly implemented swabbing and insufficient anatomical knowledge could have prejudicial consequences for patients and public health.⁶ Therefore, all studies and initiatives aimed at improving the efficiency of tests, making them more fluid and limiting the number of false negative/positive cases are more than welcome. For instance, Li et al. described a very interesting Integrated Mobile Container PCR Laboratory (IM-CPL), aimed at reducing unnecessary rapid antigen testing.⁷ Their IMPCL is a "standard PCR laboratory established inside a walk-in container and can be quickly set up at any convenient locations to carry out the large-scale diagnostic testing". Similarly, our own initiative in this field is a nasopharyngeal sample collection simulator (NP-SC), which we designed using a 3D printer, to optimize sample quality and decrease procedure-related discomfort. It was created to train professional samplers to safely perform NPS with the least discomfort for patients, aiming at an optimal swabbing of the area with the highest viral concentration. The aim of this study was to solicit opinions on our simulator from professional samplers from different testing centers, regarding the realism and utility of this simulator for learning and perfecting NPS.

This nasopharyngeal swab collection (NP-SC) simulator was designed by BONE 3D (Paris, France). A presentation video is freely available online: <https://landing.bone3d.com/np-swab-simulator>, as well as comprehensive 3D files and full instructions for manufacturing models.⁸ A swabbing target on the posterior wall of the nasopharynx colors the swab tip if correctly inserted. The simulators were distributed to different laboratories (one per center). Experts professional samplers from each laboratory, who had carried

out >50 NPS, tested the device and provided a written evaluation through a questionnaire, divided into three parts:

- Their swabbing experience and their opinion regarding the utility of the simulator.
- The simulator modeling, relevance and use.
- Experience acquired with the use of such simulator.

All data collected were processed anonymously. The questionnaire included a form in which participants confirmed that they had no objection to data collection. The study was registered with the French National Commission for Information Technology and Civil Liberties (CNIL No. 2221408).

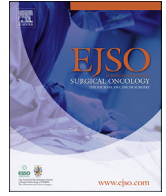
This multicentric study was performed from October to December 2020 in 40 certified COVID-19-sampling laboratories. The NP-SC simulator was widely appreciated by its users, with a good overall rating of 7.9/10: 95% of users (38/40) found it easy to use and 85% ($n = 34/40$) thought it was realistic. Testers considered that this simulator had genuine utility for educational purposes (87.5%, 35/40) and 73.7% (28/38) thought that use of this simulator could improve their sampling technique. Additionally, 95% (38/40) reported that the device made the nasopharyngeal ducts anatomy easier to understand and 82% (32/39) estimated that the simulator, providing an in-real time visualization of the swab progression through the nasal cavity fossa, enabled a better understanding of how it was possible to go "off track", therefore improving patients' safety during sampling. The coloring of the swab tip upon correct insertion provided users with in-real-time visual feedback regarding their sampling quality. Therefore, 52.5% (21/40) thought the simulator improved their sampling technique and that their samples would now be more reliable (Fig. 1). Despite having previous swabbing experience (> 50 NPS), nearly half of the testers (18/40) felt more confident after training with the simulator.

With increasing numbers of COVID-19 cases worldwide, NPS sampling has now become a routine procedure, with more than 1 million RT-qPCR tests carried out monthly in the US. Correct sampling is essential to limit false-negative cases, mostly related to poorly-performed NPS. In addition to being a financial burden, NPS are also not risk-free, especially for unexperienced samplers. Francesca et al.,⁹ highlighted the need for NPS-training on mannequins, resulting in improved swabbing technique and increased comfort for patients. Therefore, we developed a 3D-printed nasopharyngeal sample simulator, to train professional samplers perform NPS under the safest possible conditions, with the least discomfort for patients aiming at an optimal swabbing of the area with the highest viral concentration. The simulator, available free-of-charge online, is made of a single rigid material, which enables highly-realistic and easy printing at low costs by NPS-performers all around the world. Experts professional samplers, performing dozens of tests day, widely acclaimed the device, judging it easy-to use (95%), realistic (85%) and anatomically-accurate (95%). It also had genuine utility for educational purposes, making the anatomy



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Surgical Oncology

journal homepage: www.ejso.com

Artificial intelligence-based radiomics models in endometrial cancer: A systematic review

Lise Lecointre ^{a, b, c, *}, Jérémy Dana ^{c, d}, Massimo Lodi ^a, Chérif Akladios ^a, Benoît Gallix ^{b, c, e}

^a Department of Gynecologic Surgery, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^b I-Cube UMR 7357 - Laboratoire des Sciences de L'ingénieur, de L'informatique et de L'imagerie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^c Institut Hospitalo-universitaire (IHU), Institute for Minimally Invasive Hybrid Image-Guided Surgery, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

^d Inserm U1110, Institut de Recherche sur Les Maladies Virales et Hépatiques, Strasbourg, France

^e Department of Diagnostic Radiology, McGill University, Montreal, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 20 June 2021

Available online xxx

Keywords:

Endometrial carcinoma

Imaging

Radiomics

Machine learning

Deep learning

Artificial intelligence

ABSTRACT

Background: Radiological preoperative assessment of endometrial cancer (EC) is in some cases not precise enough and its performances improvement could lead to a clinical benefit. Radiomics is a recent field of application of artificial intelligence (AI) in radiology.

Aims: To investigate the contribution of radiomics on the radiological preoperative assessment of patients with EC; and to establish a simple and reproducible AI Quality Score applicable to Machine Learning and Deep Learning studies.

Methods: We conducted a systematic review of current literature including original articles that studied EC through imaging-based AI techniques. Then, we developed a novel Simplified and Reproducible AI Quality score (SRQS) based on 10 items which ranged to 0 to 20 points in total which focused on clinical relevance, data collection, model design and statistical analysis. SRQS cut-off was defined at 10/20.

Results: We included 17 articles which studied different radiological parameters such as deep myometrial invasion, lympho-vascular space invasion, lymph nodes involvement, etc. One article was prospective, and the others were retrospective. The predominant technique was magnetic resonance imaging. Two studies developed Deep Learning models, while the others machine learning ones. We evaluated each article with SRQS by 2 independent readers. Finally, we kept only 7 high-quality articles with clinical impact. SRQS was highly reproducible (Kappa = 0.95 IC 95% [0.907–0.988]).

Conclusion: There is currently insufficient evidence on the benefit of radiomics in EC. Nevertheless, this field is promising for future clinical practice. Quality should be a priority when developing these new technologies.

© 2021 Elsevier Ltd, BASO ~ The Association for Cancer Surgery, and the European Society of Surgical Oncology. All rights reserved.

Introduction

Endometrial cancer (EC) is the first diagnosed gynecological cancer in the United States, accounting approximately 61,880 new cases and 12,160 deaths in 2019 [1]. Incidence appears to be increasing due to the population aging and the rise in obesity rates, two main risk factors of EC [1]. The radiological preoperative assessment (pelvic magnetic resonance imaging and endometrial biopsy) aims to stage the disease and evaluate the risk of recurrence, and therefore to determine the appropriate therapeutic

management, in particular for lymph node staging during initial surgery.

However, this preoperative radiological assessment is not precise enough. Radiological staging may underestimate disease extension and provide inaccurate assessment of lymph node status. Moreover, most of the prognostic elements of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification can only be obtained after final histological examination of surgical specimens.

Therefore, surgery remains a key element in the management of endometrial cancer. Its two main objectives are on one hand to perform ablation of the primitive tumor, and on the other to precisely stage the disease and evaluate its prognosis factors. While the

* Corresponding author. 1 avenue Molière, 67200, Strasbourg, France.

E-mail address: lise.lecointre@chru-strasbourg.fr (L. Lecointre).



3D-printed simulator for nasopharyngeal swab collection for COVID-19

Nicolas Sananès^{1,2} · Massimo Lodi^{1,3} · Antoine Koch¹ · Lise Lecointre^{1,4} · Axel Sananès¹ · Nicolas Lefebvre⁵ · Christian Debry^{2,6}

Received: 7 October 2020 / Accepted: 21 October 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Introduction Testing for COVID-19 is a cornerstone of pandemic control. If conducted inappropriately, nasopharyngeal swab collection can be painful and preanalytical sample collection errors may lead to false negative results. Our objective was to develop a realistic and easily available synthetic simulator for nasopharyngeal swab collection.

Materials and methods The nasopharyngeal swab collection simulator was designed through different development steps: segmentation, computer-aided design (CAD), and 3D printing. The model was 3D printed using PolyJet technology, which allows multi-material printing using hard and soft materials.

Results The simulator splits in the parasagittal plane close to the septum to allow better visualization and understanding of nasal cavity landmarks. The model is able to simulate the softness and texture of different structural elements. The simulator allows the user to conduct realistic nasopharyngeal swab collection. A colored pad on the posterior wall of the nasopharynx provides real-time feedback to the user. The simulator also permits incorrect swab insertion, which is of obvious benefit from a training perspective. Comprehensive 3D files for printing and full instructions for manufacturing the simulator is freely available online via an open access link.

Conclusion In the context of the COVID-19 pandemic, we developed a nasopharyngeal swab collection simulator which can be produced by 3D printing via an open access link, which offers complete operating instructions.

Keywords Coronavirus · COVID-19 · Nasopharyngeal swab collection · Simulator · Training

Introduction

Testing for COVID-19 is a cornerstone of pandemic control all over the world, since it allows better follow-up of the outbreak, isolation of those who test positive, and contact tracing [1]. The number of SARS-CoV-2 tests performed daily in the United States has dramatically increased to 800,000–1,000,000 at the beginning of October, and a total of more than 100 million tests have been carried out since the epidemic began [2]. Dedicated clinical test sites have begun to spring up such as drive-through test centers. Finally, there is increased availability of testing, with expanding numbers and types of health care providers who conduct these tests.

For initial diagnostic testing for SARS-CoV-2, the recommendation of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), in their latest interim guidelines, is to collect and test an upper respiratory specimen. Nasopharyngeal swab collection (NP-SC) can be performed

✉ Nicolas Sananès
nicolas.sananès@chru-strasbourg.fr

¹ Obstetrics Department, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

² INSERM UMR-S 1121 'Biomaterials and Bioengineering', Strasbourg University, Strasbourg, France

³ CNRS UMR7104, INSERM U964, Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), Illkirch-Graffenstaden, France

⁴ I-Cube UMR 7357, laboratoire des Sciences de l'ingénieur, de l'informatique et de l'imagerie, Strasbourg University, Strasbourg, France

⁵ Infectious Diseases Department, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

⁶ ENT Department, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

Title: Impact of Neoadjuvant Chemotherapy Cycles on Survival of Patients with Advanced Ovarian Cancer: a French national multicenter study (FRANCOGYN)

Authors: Lecointre Lise¹, Velten Michel², Lodi Massimo¹, Saadeh Ralph¹, Lavoué Vincent³, Ouldamer Lobna⁴, Bendifallah Sofiane⁵, Koskas Martin⁶, Bolze Pierre Adrien⁷, Collinet Pierre⁸, Canlorbe Geoffroy⁹, Touboul Cyril¹⁰, Huchon Cyrille¹¹, Coutant Charles¹², Faller Emilie¹, Boisramé Thomas¹, Gantzer Justine¹³, Martin Demarchi¹⁴, Baldauf Jean Jacques¹, Akladios Chérif¹, Ballester Marcos¹⁵

Affiliations:

¹Department of Gynecologic Surgery, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

²Department of Public Health, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

³Department of Gynecologic Surgery, Hôpital Universitaire de Rennes, Rennes, France

⁴Department of Gynecology, Hôpital Universitaire de Tours, Tours, France, INSERM U1069 Université François-Rabelais, Tours, France

⁵Department of Gynaecology and Obstetrics, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France

⁶Department of Gynecology, Hôpital Bichat, AP-HP, Paris, France

⁷Gynecological Surgery Service, CHU Lyon-Sud, Pierre-Bénite, 69000 Lyon, France

⁸Department of Gynecological Surgery, Hôpital Jeanne De Flandre, CHRU Lille, France

⁹Department of Gynecologic and Breast Surgery and Oncology, Hôpital la Pitié Salpêtrière, AP-HP, Paris, France

¹⁰Department of Obstetrics and Gynaecology, Centre Hospitalier Intercommunal, Créteil, France

¹¹Department of Gynecology, Centre Hospitalier de Poissy, Poissy, France

¹²Department of Surgical Oncology, Georges-Francois Leclerc Cancer Center, Dijon, France

¹³Department of Medical Oncology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

¹⁴Medical Oncology Department, Centre Paul Strauss, Strasbourg, France.

¹⁵Department of Gynecologic and Breast Surgery, Groupe Hospitalier Diaconesses Croix Saint-Simon, Paris, France

Corresponding author: Massimo Lodi, M.D.

Work address: avenue Molière, 67200 Strasbourg

Email: massimo.lodi@chru-strasbourg.fr

Tel: +33 3 88 12 74 67

Cities in which the study was conducted : France : Paris and Parisian Region, Lille, Rennes, Tours and Strasbourg

Impact clinique de l'expression de STARD3 dans le cancer du sein HER2-positif chez la femme

Les cancers du sein HER2+ sont caractérisés par l'amplification et la surexpression d'HER2. Ce sous-groupe a un pronostic défavorable et nécessite un traitement spécifique ciblant HER2. Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse a identifié le gène STARD3 (StAR-related lipid transfer Domain protein 3), co-amplifié et co-exprimé avec HER2. Les données in vitro suggèrent que STARD3, une protéine impliquée dans le transport intracellulaire du cholestérol, joue un rôle unique dans la biologie des cellules cancéreuses HER2+. L'objectif de mon travail de thèse était d'examiner la valeur pronostique et prédictive de l'expression de la protéine STARD3 sur la réponse thérapeutique au traitement néoadjuvant dans le cancer du sein HER2-positif. Les résultats montrent que la détermination du statut de surexpression de STARD3 sur les biopsies initiales des tumeurs HER2+ permet de distinguer de manière performante un sous-groupe de patientes non sensibles à la thérapie néoadjuvante conventionnelle. Nous avons également observé que le pronostic n'est pas différent selon ce statut et qu'il dépend de l'expression d'HER2. Par ailleurs, nous avons observé que l'expression de STARD3 est corrélée à l'amplification d'HER2 dans les cas intermédiaires à l'immunohistochimie. L'identification des patientes non-répondeuses pourrait permettre de proposer un protocole alternatif, incluant par exemple des traitements anti HER2 de nouvelle génération. L'utilisation de STARD3 comme biomarqueur tissulaire serait une valeur ajoutée pour la prise en charge des patients HER2+. Enfin, STARD3 représente une vulnérabilité et donc une cible thérapeutique potentielle des cancers HER2+.

Mots-clés : cancer du sein, HER2, STARD3, biomarqueur prédictif, médecine personnalisée, traitement systémique néoadjuvant, réponse histologique complète

HER2+ breast cancers are characterized by HER2 amplification and overexpression. This subgroup has a poor prognosis and requires specific treatment targeting HER2. The laboratory where I did my thesis identified the STARD3 (StAR-related lipid transfer Domain protein 3) gene, co-amplified and co-expressed with HER2. In vitro data suggest that STARD3, a protein involved in intracellular cholesterol transport, plays a unique role in HER2+ cancer cell biology. The objective of my thesis work was to examine the prognostic and predictive value of STARD3 protein expression on therapeutic response to neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer. The results showed that determination of STARD3 overexpression status on initial biopsies of HER2+ tumors could efficiently distinguish a subgroup of patients not responsive to conventional neoadjuvant therapy. We also observed that prognosis is not different according to this status and is dependent on HER2 expression. Furthermore, we observed that STARD3 expression correlated with HER2 amplification in intermediate cases on immunohistochemistry. The identification of non-responders could allow us to propose an alternative protocol, including for example new generation anti HER2 treatments. The use of STARD3 as a tissue biomarker would be an added value for the management of HER2+ patients. Finally, STARD3 represents a vulnerability and therefore a potential therapeutic target for HER2+ cancers.

Keywords: breast cancer, HER2, STARD3, predictive biomarker, personalized medicine, neoadjuvant systemic therapy, histological complete response