



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**

UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**

Année : 2015

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**« Recherche de Single Nucleotide Polymorphism (SNP) prédictifs de la  
réponse à la chimiothérapie adjuvante dans le cancer du sein »**

Présentée et soutenue publiquement le 25 juin 2015 à 16h  
au Pôle Formation

**Par Agnès Ducoulombier**

---

**JURY**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Jacques Bonneterre**

**Assesseurs :**

**Monsieur le Professeur Jean Philippe Peyrat**

**Monsieur le Professeur Mohamed Hebbar**

**Monsieur le Professeur Pierre Collinet**

**Directeur de Thèse :**

**Monsieur le Professeur Jacques Bonneterre**

**En collaboration avec le Laboratoire d'Oncologie Moléculaire et  
Humaine du Centre Oscar Lambret de Lille (LOMH) et le Dr Aurélie  
Dumont**

---

## **Avertissement**

**La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

## Liste des abréviations

5FdUMP : 5-fluorodeoxyuridine  
5FdUTP : 5-fluorodeoxyuridine triphosphate  
ABC : transporteurs à ATP Binding Cassette  
AC : Adriamycine-Cyclophosphamide  
ADN : Acide Désoxyribonucléique  
AJCC : American Joint Committee on Cancer  
AOL : Adjuvant Online  
ARN : Acide Ribonucléique  
ASCO : American Society of Clinical Oncology  
ASP : Allele Specific Primer  
ATAC : Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination  
ATP : adénosine-5'-triphosphate  
AUC : Area Under Curve  
BCIRG : Breast Cancer International Research Group  
BER : Base Excision Repair  
c-KIT : tyrosine-protein kinase Kit  
CAT : Catalase  
CBR3 : Carbonyl réductase 3  
CCI : Carcinome Canalaire Infiltrant  
CDK : Cycline Dependent Kinase  
CES2 : Carboxylesterase 2  
CISH : Chromogenic in situ hybridization  
CK : Cytokeratine  
CLI : Carcinome Lobulaire Infiltrant  
CMF : Cyclophosphamide, Methotrexate, FU  
CPA : Cyclophosphamide  
CPP : Comité de Protection des Personnes  
CRF : Case Report Form  
CS : Cancer du Sein  
CT : Chimiothérapie

CTA : Chimiothérapie Adjuvante

CTI : Cellules Tumorales Isolées

CYP : Cytochrome

DFS : Disease Free Survival

DGS : Direction Générale de la Santé

DO : Densité Optique

DPD : Dihydropyrimidine Déshydrogénase

dTMP : Désoxythymidine Monophosphate

dTTP : Désoxythymidine Triphosphate

EBCTCG : Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EFS : Etablissement français du sang

EGFR : Epidermal Growth Factor

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EM : Extensive Metabolizer

EORTC : European Organisation for Research and Treatment of Cancer

ESMO : European Society Of Medical Oncology

Evt : Evènement

F-UPA : Fluoro-Uréido-Propionate

FAC : 5FU, Adriamycine, Cyclophosphamide

FBAL : Fluro-Béta-Alanine

FDA : US Food and Drug Administration

FEC : 5FU, epirubicine, cyclophosphamide

FEVG : Fraction d'éjection du Ventricule Gauche

FISH : Fluorescence in Situ Hybridization

FOXC1 : Forkhead box C1

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

FUH2 : Fluoro-Dihydro-Uracile

GAS : Ganglion Sentinelle

GCSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GPX1 : Glutathione Peroxidase 1

GST : Glutathione S transférase

HE : Hematéine-Eosine

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HR : Hazard Ratio

HT : Hormonothérapie

HW : Hardy Weinberg

IARC : International Agency for Research On Cancer

IC : Intervalle de Confiance

IHC : Immunohistochimie

INVS : Institut National de Veille Sanitaire

JCO : Journal of Clinical Oncology

KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog

LOE : Level Of Evidence

LOMH : Laboratoire d'Oncologie Moléculaire et Humaine

LSP : Locus Specific Primer

MFS : Metastatic Free Survival

MMR : DNA Mismatch Repair

MnSOD : Manganese Superoxide Dismutase 2

MPO : Myeloperoxidase

mRNA : Messenger Ribonucleic Acid

MTHFR : 5,10-MéthylèneTétraHydroFolate Réductase

N : Node (adénopathie)

N+ : atteinte ganglionnaire

N0 : Absence d'atteinte ganglionnaire

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NCCTG : National Coordinating Committee on Therapeutic Goods

NCI : National Cancer Institute

NER : Nucleotide Excision Repair

NHGRI : National Human Genome Research Institute

NIH : National Institutes of Health

NOS3 : Nitric Oxide Synthase 3

NPI : Nottingham Prognostic Index

NQO1 : NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1

NSABP : National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

NSCLC : Non-Small Cell Lung Cancer

NTC : No Template Control

OATP : Organic Anion-Transporting Polypeptide

OCT : Organic Cation Transport Proteins

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : Odd Ratio

OS : Overall Survival

Pb : paire de base

pCR : Pathological Complete Response

PCR : Polymerase Chain Reaction

PD : Pharmacodynamique

PFS : Progression Free Survival

PharmGKB : Pharmacogenomics Knowledgebase

PK : Pharmacocinétique

PM : Poor Metabolizer

q-PCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

RDI : Relative Dose Intensity

RE : Récepteur aux oestrogènes

RE+/RE- : Récepteur aux oestrogènes positif/négatif

RFS : Relapse Free Survival

RH : Récepteurs hormonaux

ROR : Risk-Of-Recurrence

ROS : Reactive Oxygen Species

RP : Récepteur à la progestérone

RP+/RP- : Récepteur à la progestérone positif/négatif

RR : risque relatif

RS : Recurrence score

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

SBR : Scarff Bloom Richardson

SE : Ecart type Standard

SEER : Surveillance, Epidemiology, and End Results Program

SNP : Single Nucleotid Polymorphism

STA : Specific Target Amplification

STAT1 : Signal Transducers and Activators of Transcription 1

SULTA1 : Sulfotransferase 1A1

SWOG : Southwest Oncology Group

TAC : Taxotere-Adriamycine-Cyclophosphamide

TC : Taxanes-Cyclophosphamide

TNM : Tumor, Node and Metastasis

TS : Thymidylate Synthase

TTP : Time to Progression

TTR : Time to Recurrence

UGT : UDP-Glucuronosyltransferase

UICC : Union for International Cancer Control

UIRC :Unité intégré de recherche clinique

UM : Ultra-Rapid Metabolizer

UPA/PAI-1 : Urokinase Plasminogen Activator / Plasminogen Activator Inhibitor-1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

XDH : Xanthine Dehydrogenase

XRCC1 : X-ray repair Cross-Complementing Protein 1

## Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>3</b>
I. La chimiothérapie adjuvante.....	5
A. Quel rationnel pour la chimiothérapie adjuvante ? .....	5
B. Protocoles de chimiothérapies de référence .....	16
II. Facteurs décisionnels pour l'indication de chimiothérapie adjuvante .....	17
A. Critères cliniques .....	19
B. Critères anatomopathologiques .....	19
1. Stadification tumorale : Classification TNM .....	20
2. Type histologique .....	21
3. Grade de prolifération .....	23
4. Marqueurs de prolifération : Ki67 .....	23
5. Embols Vasculaires et lymphatiques .....	24
6. Récepteurs hormonaux .....	24
7. Statut HER2 .....	28
8. Tumeurs triple négatives : RE- RP- HER2- .....	30
C. Procédure automatisée : Adjuvant OnLine (AOL) .....	30
D. Index Pronostique de Nottingham ou NPI.....	34
E. Sous types moléculaires : impact pronostique et décisionnel. ....	36
1. Classification moléculaire de Pérou .....	37
2. Impact pronostic, implications thérapeutiques adjuvantes et limites. ....	45
a) Impact pronostic .....	45
b) Impact prédictif : influence du statut moléculaire sur les décisions de traitement adjuvant.....	46
c) Limites de la classification et de son impact dans l'arbre décisionnel. ....	47
F. Signatures pronostiques et/ou prédictives .....	49
1. Mammaprint ou signature à 70 gènes .....	50
2. Oncotype DX.....	53
3. Marqueurs protéiques : UPA/PAI1 .....	57
4. Impact pronostiques/prédictifs décisionnels et limites des signatures....	58
a) Impact pronostique .....	58
b) Intérêt prédictif.....	59
III. Personnalisation du traitement adjuvant : de la tumeur à l'hôte .....	60
IV. Les Single Nucleotide Polymorphism ou SNP .....	61
A. Définition .....	61
B. Données générales de pharmacogénomiques.....	63
C. Données de pharmacologie des cytotoxiques utilisés en adjuvant: sources possibles de SNP.....	68
1. Protocole FEC.....	68
a) Les anthracyclines.....	69
b) Le cyclophosphamide (ENDOXAN).....	73
c) Le 5FU .....	76
2. Protocole à base de taxanes : Docetaxel (TAXOTERE) ou Paclitaxel (TAXOL).....	78



**Matériels et méthodes..... 81**

I. Objectif principal et caractéristiques de l'étude GENEOM.....	81
II. Critère d'évaluation.....	81
III. Critères d'inclusion et d'exclusion.....	82
IV. Protocoles de chimiothérapie adjuvant.....	83
V. Recueil des données cliniques, anatomopathologiques et de suivi (CRF) .....	85
VI. Sérothèque.....	87
VII. Formalités administratives-réglementaires : consentement des patientes ...	88
VIII. Sélection des SNP .....	89
IX. Génotypage.....	93
A. Extraction de l'ADN.....	93
B. Principe du Génotypage.....	93
1. Sonde Taqman (Principe du FRET).....	94
2. Sondes SNP type .....	95
C. Réaction de génotypage : Exemple pour les sondes SNPtype.....	97
1. Pré amplification spécifique de cibles ou Specific Target Amplification (STA).....	98
a) Préparation des Primers.....	98
b) Ajout de l'ADN génomique et du matériel nécessaire à la PCR .....	98
c) Insertion de la plaque dans le thermocycleur.....	98
2. Réaction de génotypage : Préparation de la puce en 2 étapes.....	99
a) Préparation des sondes SNP type.....	99
b) Préparation des échantillons .....	100
c) Génotypage .....	101
D. Analyse des données .....	104
1. Validation des sondes sur la population non malade de l'EFS et comparaison des fréquences alléliques avec la base de données dbSNP .	105
2. Testing des SNP sur la population GENEOM.....	107
X. Analyse statistique .....	109

**Résultats ..... 111**

I. Disposition des patientes : Population totale .....	111
A. Patientes incluses dans l'étude GENEOM adjuvant .....	111
B. Patientes évaluables : Flow Chart GENEOM adjuvant .....	113
II. Population traitée par FEC100-Docetaxel (population n°1).....	115
A. Caractéristiques démographiques et tumorales initiales.....	115
1. Caractéristiques démographiques des patientes .....	115
2. Caractéristiques tumorales initiales.....	116
a) Stade tumoral TNM initial. ....	116
b) Caractéristiques anatomopathologiques initiales sur biopsies.....	116
B. Caractéristiques de la chirurgie.....	118
C. Caractéristiques anatomopathologiques.....	119
D. Chimiothérapie adjuvante. ....	121
E. Données de suivi. ....	122
1. Progression et statut vital de la cohorte. ....	122
2. Survie sans progression (PFS), survie sans progression métastatique (MFS) et survie globale (OS). ....	125
a) Survie globale de la cohorte (OS).....	125
b) Survie sans progression (toutes progressions confondues : PFS) ...	126

c) Survie sans progressions métastatiques (MFS).....	127
F. Facteurs associées à la survie.....	128
1. Facteurs associées à la survie toutes progressions confondues (PFS)	129
2. Facteurs associés à la survie sans progression métastatique (MFS) ..	132
G. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) et délai de survie.....	134
1. Analyse des SNP.....	134
2. Relation entre SNP et délai de récurrence.....	135
a) Relation SNP et délai toutes récurrences (PFS).....	135
b) Relation SNP et délai à la récurrence métastatique (MFS).....	138
III. Population traitée par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab (HERCEPTIN) (Population n°2).....	143
A. Caractéristiques démographiques et tumorales initiales.....	143
1. Caractéristiques démographiques des patientes.....	143
2. Caractéristiques tumorales initiales.....	143
a) Stade tumoral TNM initial.....	143
b) Caractéristiques anatomopathologiques initiales sur biopsies.....	145
B. Caractéristique de la chirurgie.....	145
C. Caractéristiques anatomopathologiques.....	146
D. Chimiothérapie adjuvante.....	148
E. Données de suivi.....	149
1. Progression et statut vital de la cohorte.....	149
2. Survie sans progression (PFS), survie sans progression métastatique (MFS) et survie globale (OS).....	152
a) Survie globale de la cohorte.....	152
b) Survie sans progression (toutes progressions confondues : PFS) ...	153
c) Survie sans progressions métastatiques (MFS).....	154
F. Facteurs associées à la survie.....	155
1. Facteurs associées à la survie toutes progressions confondues (PFS)	155
2. Facteurs associés à la survie sans progression métastatique (MFS) ..	160
G. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) et délai de survie sans rechute (PFS).....	163
1. Analyse des SNP.....	163
2. Relation SNP et délai toutes récurrences (PFS).....	163
IV. SNP et équilibre de Hardy Weinberg.....	168

**Discussion ..... 170**

I. Caractéristiques de la population d'étude.....	170
A. Caractéristiques cliniques, chirurgicales et anatomo- pathologiques des populations.....	170
1. Population n°1.....	170
2. Population n°2.....	172
B. Données de survies des deux populations.....	174
C. Facteurs associés à la survie : PFS et MFS.....	177
1. Population n°1.....	178
2. Population n°2.....	180
II. Polymorphismes de nucléotides (SNP) associés à la survie.....	182
A. Population n°1 traitée par FEC100-Docetaxel.....	182
1. Sur la PFS.....	182
2. Sur la MFS.....	195
B. Population n°2 traitée par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab.....	220

III. Limites générales de l'étude GENEOM. ....	237
A. Sélection et choix des SNP étudiés. ....	237
B. Recul de l'étude et nombre d'évènements. ....	239
C. Design de l'étude et paramètres du recueil de données. ....	240
<b>Conclusion</b> .....	<b>242</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>245</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>267</b>
Annexe 1 : Classification TNM du cancer du sein, 7 <sup>ème</sup> édition 2010 .....	267
Annexe 2 : Stadification du cancer du sein selon l'UICC .....	268

## Table des Illustrations.

Figure 1. Mortalité par cancer du sein, récurrence et mortalité globale à 10 ans en cas de chimiothérapie adjuvante par anthracyclines vs CMF. ....	10
Figure 2. Mortalité par cancer du sein à 10 ans, récurrence, et mortalité globale entre une chimiothérapie adjuvante par anthracyclines+taxanes versus anthracycline seule.....	13
Figure 3. Formes anatomopathologiques de cancer du sein.....	22
Figure 4. Exemple d'estimation du taux de rechute attendu sans traitement à 10 ans en cas de tumeurs de stade pT1cpN0M0G2RE+ : 23,6% et du bénéfice attendu avec un traitement adjuvant, par HT ou CT seul ou association combinée des deux. ....	31
Figure 5. Exemple d'estimation du taux de rechute attendue à 10 ans sans traitement en cas de tumeurs de stade pT1cpN1-3M0G2RE+ : 34,9% et du bénéfice attendu avec un traitement adjuvant, par HT ou CT seule et association combinée des deux. ....	32
Figure 6. Exemple d'estimation du taux de survie attendue à 10 ans sans traitement en cas de tumeurs de stade pT1cpN1-3M0G2RE+ : 16% de décès par cancer et bénéfice attendu en survie avec un traitement adjuvant par HT ou CT seul, et association combinée des deux. ....	32
Figure 7. Evolution des facteurs pronostiques dans l'arbre décisionnel thérapeutique adjuvant : de la morphologie à la biologie moléculaire (107).....	36
Figure 8. Exemple de profiling moléculaire de 677 cancers du sein par clustering hiérarchisé effectué par <i>Benito et al</i> en 2004 sur 340 échantillons de l'UNC et 377 du Netherlands Cancer Institute : analyse clustérisée retrouvant les 5 sous types majeurs de cancers du sein (109).....	38
Figure 9. Corrélation aux données de survie globale pour 470 tumeurs en fonction des 5 sous types majeurs et le nouveau sous type défini ultérieurement Claudin Low (109). ....	39
Figure 10. Caractéristiques principales des sous types moléculaires du cancer du sein sur le plan du statut RE, HER2, du grade SBR, des cytokératines, du statut p53 et du sous type anatomopathologique (138). ....	43
Figure 11. Différents aspects histologiques de tumeurs classées sur le plan génomique en Luminal A.....	44
Figure 12. Différents aspects histologiques de tumeurs classées sur le plan génomique en Basal Like. ....	44
Figure 13. Courbes de survie sans récurrence (RFS) et globale (OS) en fonction du sous type moléculaire selon la base de données UNC 337. ....	46
Figure 14. Sous types moléculaires intrinsèques du cancer du sein et spectre théorique de sensibilité aux thérapeutiques adjuvantes (126).....	46
Figure 15. Discordance entre classification moléculaire et classification anatomopathologique.....	48
Figure 16. Design de l'étude MINDACT (156). ....	53
Figure 17. Etudes prospectives de validation d'Oncotype DX, chez les patientes N0 TAILORx (A) et les patientes N1, RxPONDER (B) (156).....	56
Figure 18. Représentation schématique d'un SNP. ....	61
Figure 19. Influence des SNP sur la toxicité et l'efficacité des traitements du cancer du sein (chimiothérapie, hormonothérapie et radiothérapie) (1).....	64
Figure 20. Mécanisme d'action des anthracyclines, ici de la doxorubicine.....	71

Figure 21. Métabolisme de la doxorubicine.....	72
Figure 22. Mécanisme d'action des agents alkylants. ....	74
Figure 23. Métabolisme du cyclophosphamide. ....	75
Figure 24. Mécanisme d'action du 5FU.....	76
Figure 25. Métabolisme du 5Fluorouracile. ....	77
Figure 26. Métabolisme et mécanisme d'action des taxanes utilisés dans le cancer du sein.....	78
Figure 27. Arbre décisionnel thérapeutique combinant les facteurs cliniques, les caractéristiques tumorales anatomopathologiques du cancer du sein, les données moléculaires et les données de pharmacogénétiques définissant le développement d'une médecine personnalisée oncologique (189).....	80
Figure 28. Schéma de l'étude GENEOM 0-708.....	83
Tableau 1. SNP testés dans la cadre de l'étude GENEOM. ....	92
Figure 29. Méthodes d'extraction de l'ADN génomique. ....	93
Figure 30. Principe général des sondes Taqman. ....	94
Figure 31. Principes des sondes Taqman pour le génotypage. ....	95
Figure 32. Principe des sondes SNP Type. ....	96
Figure 33. A gauche, photographie de l'appareil Biomark Fluidigm et à droite d'une puce ou micro-array: SNP Dynamic array 96X96.....	97
Figure 34. Etapes de pré amplification de cibles. ....	99
Figure 35. Préparation des sondes SNPTYPE. ....	100
Figure 36. Préparation des échantillons. ....	101
Figure 37. Représentation d'une puce et Appareil IFC Controller.....	101
Figure 38. Représentation de l'IFC Controller, de la puce et du thermocycleur Fluidigm permettant les réactions de PCR. ....	102
Figure 39. Call Map Viewer pour une puce de SNP 96x96. ....	103
Figure 40. Représentation schématique des différentes étapes du génotypage. ....	104
Figure 41. A gauche : Exemple de diagramme d'intensité de fluorescence pour une sonde SNP type donnée, la sonde n° 15 (rs3738573) testée sur un échantillon de non malades (EFS) et à droite comparaison des fréquences alléliques obtenues à la base de données dbSNP. ....	105
Figure 42. Score d'auto confiance et call rate pour le SNP testé n°15 ou rs3738573 dans la population EFS. ....	106
Figure 43. Score d'auto confiance et call rate dans la population de patientes malades de l'étude GENEOM. ....	107
Figure 44. A gauche : diagramme d'intensité de fluorescence pour la sonde SNP type donnée, la sonde n°15 (rs3738573) testée sur un échantillon de patientes de l'étude GENEOM et à droite comparaison des fréquences alléliques obtenues à la base de données dbSNP. ....	108
Figure 45 : Courbes d'inclusions des deux cohortes de patientes.....	111
Tableau 2. Répartition dans la population totale des protocoles de chimiothérapie adjuvante reçus.....	112
Figure 46 : Flow Chart de l'étude GENEOM.....	114
Tableau 3. Distribution des âges dans la population n°1. ....	115
Tableau 4. Caractéristiques des tumeurs initiales dans la population FEC100- ..... Docetaxel. ....	117
Tableau 5. Type de chirurgie réalisée dans la population n°1.....	118
Tableau 6. Variants histologiques (autres que CCI ou CLI) sur l'analyse de pièce de mastectomie.....	119
Tableau 7. Caractéristiques anatomopathologiques sur pièce opératoire des tumeurs de la population traitée par FEC100-Docetaxel.....	120

Tableau 8. Caractéristiques de la chimiothérapie adjuvante dans la population FEC100-Docetaxel.....	121
Tableau 9. Données de progression et de statut vital des patientes de la population FEC100-Docetaxel.....	124
Tableau 10. Taux de survie globale (OS) à 1, 2 et 5 ans de la population FEC100- Docetaxel.....	125
Figure 47. Courbe de survie globale (OS) de la cohorte de patientes traitées par .. FEC100-Docetaxel.....	126
Tableau 11. Taux de survie sans récurrence (PFS) à 1, 2 et 5 ans de la population FEC100-Docetaxel.....	126
Figure 48. Courbe de survie sans progression (PFS) de la cohorte de patientes ... traitées par FEC100-Docetaxel.....	127
Tableau 12. Taux de survie sans récurrence métastatique (MFS) à 1, 2 et 5 ans de la population FEC100- Docetaxel.....	127
Figure 49. Courbe de survie sans progression métastatique (MFS) de la cohorte de patientes traitées par FEC100-Docetaxel.....	128
Tableau 13. Survie sans récurrences (PFS) suivant différentes caractéristiques.....	130
Figure 50. Comparaison par test du Log Rank des courbes de survie sans progressions (PFS) en fonction du statut RH (a), triple négatif (b), et des embols (c).....	132
Tableau 14. Survie sans récurrences métastatique (MFS) suivant différentes caractéristiques.....	133
Tableau 15. SNP disponibles pour l'analyse avec le délai à la récurrence.....	134
Tableau 16. SNP associé à la survie sans récurrences (PFS).....	136
Tableau 17. Modèle multivarié sur la survie sans récurrence (PFS).....	137
Figure 51. Score pronostique sur la survie sans récurrence (PFS).....	138
Tableau 18. SNP associés à la survie sans récurrence métastatique (MFS).....	140
Tableau 19. SNP associés à la MFS en analyse multivariée.....	142
Figure 52. Score pronostique sur la survie sans récurrence métastatique (MFS) dans la population n°1.....	142
Tableau 20. Distribution des âges dans la population n°2.....	143
Tableau 21. Caractéristiques de la tumeur initiale dans la population FEC100-..... Docetaxel-Trastuzumab.....	144
Tableau 22. Type de chirurgie effectuée dans la population n°2 : mastectomie partielle, mastectomie totale, curage ganglionnaire axillaire, ganglion sentinelle (GAS).....	146
Tableau 23. Caractéristiques anatomopathologiques sur pièce opératoire des tumeurs de la population traitée par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab.....	147
Tableau 24. Variants histologiques (autres que CCI ou CLI ou mixtes) sur l'analyse de pièce de mastectomie.....	148
Tableau 25. Caractéristiques de la chimiothérapie adjuvante dans la population n°2 traitée par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab.....	149
Tableau 26. Données de progression et du statut vital des patientes de la population FEC100-Docetaxel.....	151
Tableau 27. Taux de survie globale (OS) à 1, 2 et 5 ans de la population n°2.....	152
Figure 53. Courbe de survie globale de la population n°2.....	152
Tableau 28. Taux de survie sans récurrence (PFS) à 1, 2 et 5 ans de la population FEC100- Docetaxel-Trastuzumab.....	153
Figure 54. Courbe de survie sans progression (PFS) de la population n°2.....	153
Tableau 29. Taux de survie sans récurrence métastatique (MFS) à 1, 2 et 5 ans de la population FEC100-Docetaxel-Trastuzumab.....	154

Figure 55. Courbe de survie sans progression métastatique (MFS) de la population n°2.....	154
Tableau 30. Survie sans récurrences (PFS) suivant différentes caractéristiques.....	157
Figure 56. Comparaison par test du Log Rank des courbes de survie sans progressions (PFS) en fonction de l'âge et du statut RH.....	158
Figure 57. Comparaison par test du Log Rank des courbes de survie sans progressions (PFS) en fonction du statut RE et des embols péritumoraux. ....	159
Figure 58. Comparaison par test du Log Rank des courbes de survie sans progressions (PFS) en fonction de la taille tumorale.....	160
Tableau 31. Survie sans récurrences métastatique (MFS) suivant différentes caractéristiques dans la population n°2.....	161
Figure 59. Comparaison par test du Log Rank des courbes de survie sans progressions métastatique (MFS) en fonction de la présence d'embols et de la classification UICC T. ....	162
Tableau 32. SNP associés à la survie sans récurrence (PFS) dans la population n°2.	165
Tableau 33. Variables associées à la PFS dans la population n°2 en multivariée. .	167
Figure 60. Score pronostique sur la survie sans récurrence (PFS) dans la population n°2.....	167
Tableau 34. Fréquences des génotypes et allèles des SNPs dans la population de l'EFS.....	169
versus celles de la base de données dbSNP.....	169
Figure 61. Rang global standardisé à l'âge du taux de survie globale à 5 ans du cancer du sein sur 228 registres de données (218). ....	175
Figure 62. Survie sans progression et survie globale par sous types tumoraux, en fonction du statut HER2 et RE/RP(220). ....	176
Tableau 35. Analyse multivariée estimant les contributions relatives des facteurs cliniques et génétiques à la toxicité induite par le Docetaxel sur une population de 92 patients traités par Docetaxel pour différents types de cancers, dans l'étude de <i>Choi et al</i> (221). ....	185
Tableau 36. Association entre la réponse au traitement par Docetaxel et les SNP dans la population des 92 patients de l'étude de <i>Choi et al</i> (221). ....	186
Figure 63. Temps jusqu' à la récurrence (TTR) en fonction du génotype du SNP de la cycline D1-rs 9344G>A (Modèle récessif) dans la population d'évaluation de patients atteints de cancer colique de stade II ou III et traité par chimiothérapie adjuvante par 5FU. Effet délétère du génotype AA (222). ....	189
Figure 64. TTR en fonction du génotype du SNP de la cycline D1 rs-9344G>A (Modèle dominant) dans la population de validation de patients atteints de cancer colique de stade II ou III et traité par chimiothérapie adjuvante par 5FU. Effet délétère du génotype AG ou AA (222).....	190
Tableau 37. Comparaison de l'effet des SNP sur la PFS à la partie néoadjuvante et aux données de la littérature dans la population n°1.....	194
Figure 65. Mécanisme d'action des anthracyclines, ici de la doxorubicine.....	196
Figure 66. Survie sans progression chez les patientes traitées par chimiothérapie adjuvante (CMF ou CAF) à droite et non traitées à gauche en fonction du génotype pour le SNP de NOS3-894 G>T (194). ....	197
Figure 67. Voies d'activation et d'inactivation du cyclophosphamide (229). ....	202
Figure 68. AUC du ratio 4-OH CPA/CPA en fonction du génotype du SNP du gène CYP2B6. Chaque point représente un patient de l'étude, chaque barre la valeur moyenne du ratio pour chaque groupe de génotype (229).....	203
Figure 69. Association entre les différents génotypes du gène CYP2B6 dans la population japonaise de patientes (229).....	204

Tableau 38. SNP associés à la pCR dans la population néoadjuvante. ....	205
Figure 70. Métabolisme simplifié du Tamoxifène (230).....	207
Figure 71. Correspondance entre les génotypes possibles du CYP2D6 et la traduction en terme d'activité enzymatique (230).....	208
Figure 72. Etudes ayant retrouvées une association positive ou négative de variants de CYP2D6, en particulier le variant *4, sur la survie sans récurrence de patientes atteintes de cancers du sein et traitées par hormonothérapie par Tamoxifène (230).....	211
Figure 73. Courbes de survie sans progression (PFS) à gauche et (OS) à droite dans la population de patients atteints de cancers gastriques avancés et traités par cisplatine et taxanes (210). ....	213
Figure 74. Courbes de survies globales des patients atteints de cancer du poumon (NSCLC) traité par chimiothérapie de 1 <sup>ère</sup> ligne par Paclitaxel et cisplatine en fonction du génotype du gène BRCA1 (240).....	214
Tableau 39. Comparaison de l'effet des SNP sur la MFS à la partie néoadjuvante et aux données de la littérature ds la population n°1.....	218
Figure 75. Courbes de survie sans progression (PFS) dans la cohorte d'évaluation des patients atteints de cancers colorectaux de stade II-III et traités par chimiothérapie adjuvante à base de 5FU et Oxaliplatine (243). ....	224
Figure 76. Courbes de survie sans progression (PFS) dans la cohorte d'évaluation en haut et de validation en bas des patients atteints de cancers colorectaux de stade II-III et traités par chimiothérapie adjuvante à base de 5FU et Oxaliplatine (243).....	225
Tableau 40. Comparaison de l'effet des SNP sur la MFS à la partie néoadjuvante et aux données de la littérature population n°2. ....	235



## RESUME

**Contexte:** La chimiothérapie adjuvante (CTA) par anthracyclines-taxanes est un standard de prise en charge du cancer du sein (CS). Des polymorphismes de nucléotides (SNP) de gènes impliqués dans le métabolisme, le transport des cytotoxiques peuvent affecter l'efficacité de la CTA. L'objectif de l'étude était d'identifier des SNPs associés à la réponse à la CTA.

**Méthodes:** 418 patientes (pts) avec un CS traitées par CTA, ont été incluses entre 01/2008 et 01/2012. 309 pts ont reçu du FEC100-Docetaxel (population 1), 109 du FEC100-Docetaxel-Trastuzumab (population 2). 46 SNPs ont été génotypés sur de l'ADN germlinal (prélèvement sanguin de 5 ml) par PCR, via 2 types de sondes, SNPType (Fluidigm) / Taqman (Life technologies) sur une plateforme BioMark (Fluidigm). L'équilibre de Hardy Weinberg (HW) a été vérifié sur une population saine de l'EFS par comparaison des fréquences alléliques/génotypiques à la dbSNP database (test de Chi2/Fisher). L'association entre les survies sans progression (PFS) et sans métastase (MFS) (Kaplan Meier) et les facteurs clinicopathologiques (FCP) a été évaluée par test du Log-Rank. Les PFS/MFS ont été corrélées aux FCP et aux génotypes, isolés et combinés (Modèle de Cox univarié/multivarié). Un score pronostique a été établi.

**Résultats:** Dans la population 1, 5SNPs sont associés en univarié à la MFS avec les génotypes, HR, IC et p value respectifs suivants: SLCO1B3-rs11045585 GG 7.73 (1.83-32.7)p=0.001, NOS3-rs1799983 GT 0.32(0.14-0.76)p=0.006, CYB2B6-rs2279345 TT 2.29(1.02-5.13)p=0.04, BRCA1-rs799917 CT 0.41(0.19-0.89)p=0.02, CYP2D6-rs3892097 AG 2.14(1.05-4.36)p=0.03. En multivarié, 4SNPs restent associés à la MFS: NOS3 GG-TT 3.11(1.33-7.27)p=0.009, CYB2B6-rs2279345 TT 2.38(1.05-5.41)p=0.038, BRCA1-rs799917 CC-TT 2.21(1.01-4.85)p=0.047, CYP2D6-rs3892097 AG 2.14(1.04-4.40)p=0.039. Le modèle pronostique dénote un risque métastatique de 10.25(1.29-81.31) si ces 4 génotypes coexistent. Dans la population 2, 4SNPs sont associés en univarié à la PFS, mais seul 2 vérifient l'équilibre de HW:

CYB2B6-rs2279345 CT 5.73(1.22-27)p=0.01, MTHFR-rs1801133 CT 4.61(0.98-21.7)p=0.03. En multivarié, CYP2B6 CT 9.67(1.82-51.28)p=0.008, MTHFR CT 10.78 (2.12-54.90)p=0.004, et la taille≥T2 10.78(2.12-54.90)p=0.004 sont associés à la PFS.

**Conclusion:** Des SNPs de gènes impliqués dans le stress oxydatif, le transport du Docetaxel, le métabolisme du cyclophosphamide et du 5FU, la réparation des lésions de l'ADN impactent sur la survie des pts traitées par CTA.

## INTRODUCTION

Le cancer du sein représente un enjeu majeur de santé publique, notamment en raison de l'augmentation de son incidence. Dans le monde, en 2012, sur les données de « l'International Agency for Research On Cancer » ou (IARC) dans le cadre du projet GLOBOCAN 2012, 1,7 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués et environ un demi million de décès relevés. Force est de constater, depuis les dernières estimations de 2008, la tendance à une augmentation, à la fois de l'incidence (+20%) et de la mortalité (+14%) par cancer du sein. Dans le monde, il représente ainsi actuellement le cancer le plus fréquemment diagnostiqué dans 140 pays (sur 184), soit 1 cancer sur 4 de la femme. En France, il se situe au 1<sup>er</sup> rang des cancers de la femme en terme d'incidence et de mortalité. Selon les données de l'institut National de Veille sanitaire (INVS), l'incidence était en 2012 de 48763 cas pour 11886 décès, soit 31,5% des cas de cancers chez la femme et 18,8% des décès liés aux cancers. Le cancer du sein reste la principale néoplasie maligne de la femme, avec un risque cumulé durant la vie de 8% (1).

Sur le plan étiopathogénique, il s'agit d'une maladie multifactorielle avec de nombreux facteurs de risque décrits, comme l'âge avancé, les facteurs hormonaux endogènes (précocité des ménarches, ménopause tardive, parité, allaitement maternel) ou exogènes (contraception oestroprogestative, traitement hormonal substitutif), ou encore certains facteurs environnementaux (radiations ionisantes, activité physique, obésité, tabac, alcool...) auquel peut se « greffer » une susceptibilité génétique (2). En effet, la majorité des cancers du sein sont sporadiques, survenant en dehors de tout contexte génétique héréditaire. Cependant, dans 5 à 10% des cas, il peut être lié à des gènes de prédisposition héréditaires, principalement les gènes BRCA1 et BRCA2.

Le pronostic du cancer du sein est bon, avec une survie globale tous stades confondus supérieure à 80% : 85% sur les données épidémiologiques françaises, 82,2% selon les données européennes, et 89,1% selon la base de données américaine SEER (*Rapport sur la survie attendue des patients atteints de cancers en France, Institut National du cancer, avril 2010*). Ces données de survie sont très satisfaisantes au regard d'autres cancers, et s'expliquent essentiellement par la généralisation du dépistage amenant au diagnostic de cancer du sein à un stade de plus en plus précoce, mais également par l'utilisation des traitements systémiques

adjuvants, de plus en plus efficaces et, en particulier dans des stades encore plus précoces (3).

Néanmoins, le cancer du sein est caractérisé par une grande hétérogénéité, à la fois clinique, biologique, anatomopathologique, puis plus récemment moléculaire, ceci rendant complexe l'estimation du pronostic et les choix de traitements complémentaires à la chirurgie d'exérèse, tel la chimiothérapie ou l'hormonothérapie adjuvante. Les progrès accomplis ces dix dernières années dans la biologie tumorale ont permis d'établir des « portraits moléculaires » (classification moléculaire de Péro), puis des « signatures pronostiques » tels Oncotype DX, Mammaprint ou encore UPA/PAI-1. Ces signatures apportent de nouveaux critères tumoraux, guidant les indications de traitements adjuvants, notamment pour ces stades précoces, de bon pronostic, ou le bénéfice des traitements adjuvants est moins formel. Cependant, elles présentent certaines limites inhérentes à leur coût, leur validation (niveau de preuve), la nécessité d'une quantité de matériel tumoral suffisante, sur des tumeurs de moins de 1cm (T1aT1b). Cependant, les classifications cliniques, histologiques, ou encore moléculaires ne permettent pas de prédire totalement l'évolution. La solution pourrait être apportée non par la tumeur, mais par la patiente elle même. En effet, l'efficacité et la toxicité des thérapies anticancéreuses varient parfois fortement d'un patient à un autre, et il apparaît de plus en plus évident que le profil génétique de l'individu joue également un rôle déterminant dans la stratégie décisionnelle.

Ainsi, des facteurs prédictifs de toxicité, mais aussi et surtout de réponse à la chimiothérapie adjuvante pourraient ainsi être retrouvés au sein de polymorphismes génétiques de l'individu. La forme la plus abondante de variations génétiques dans le génome humain est représentée par les SNP. Les SNP ou « Single Nucleotide Polymorphism » correspondent à la variation d'une seule paire de base nucléotidique entre individus d'une même espèce avec une fréquence allélique supérieure à 1% dans la population (1). Si le génome de deux individus ne diffère que de 0.1%, 90% de ces divergences sont représentées par des SNP. Ainsi, la majorité des SNP n'entraîne aucune conséquence biologique à l'état physiologique et confère la diversité entre populations ou individus. Cependant, en situation « pathologique » carcinologique avec exposition à des cytotoxiques, ils pourraient engendrer une différence de réponse aux traitements et expliquer, à pronostic équivalent des différences d'efficacité des thérapeutiques oncologiques adjuvantes.

## I. La chimiothérapie adjuvante.

### A. Quel rationnel pour la chimiothérapie adjuvante ?

Le cancer du sein de stade précoce va justifier d'une prise en charge dite « multimodale » comprenant la chirurgie totale ou conservatrice, la radiothérapie, et en fonction des caractéristiques tumorales, une hormonothérapie, une chimiothérapie adjuvante, une thérapie ciblée par Trastuzumab. La chirurgie est la première étape, permettant une éradication de la maladie macroscopique mammaire et/ou ganglionnaire. Elle permet aussi d'établir une stadification du cancer et une caractérisation anatomopathologique et moléculaire. Cette dernière est fondamentale car elle permet d'évaluer le risque de rechute à distance, et donc de guider les indications de chimiothérapie adjuvante. L'objectif de la chimiothérapie adjuvante est d'éradiquer une éventuelle maladie micro-métastatique résiduelle, donc de diminuer le risque de rechute à distance, et in fine d'améliorer la survie globale des patientes.

Le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante selon un protocole séquentiel combinant des anthracyclines et des taxanes n'est plus à démontrer, et fait suite à plusieurs essais randomisés réalisés depuis la fin des années 1970 jusqu'aux années 2000, colligés en une très large méta analyse l'EBCTCG de *Peto et al* regroupant plus de 100000 femmes issus de ces études. Celle-ci fait office de référence sur le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante, ainsi que sur le type de protocole à administrer. Les essais, portant initialement sur des patientes avec atteinte ganglionnaire N+, se sont étendus aux tumeurs sans atteinte ganglionnaire N0, puis aux tumeurs de plus petite taille, de moins de 2 cm notamment (T1). En plus de l'extension des indications de chimiothérapie, les protocoles se sont modifiés (CMF, puis introduction des anthracyclines avec le FEC ou FAC puis des taxanes avec le protocole séquentiel AC/TC ou FEC 100-Docetaxel ou concomitant de type TAC pour arriver au standard actuel qu'est l'association séquentielle adjuvante par anthracyclines et taxanes.

- **Protocole CMF**

*Bonadonna et al* a été le premier à démontrer en 1976 qu'un traitement par chimiothérapie adjuvante selon le protocole CMF (Cyclophosphamide-Méthotrexate-Fluorouracile) versus aucun traitement améliorait le pronostic des patientes avec cancers du sein N+ traités par mastectomie radicale, avec 24% « d'échec » du traitement dans le bras chirurgie seule versus 5,3% dans le bras CMF ( $p < 10^{-6}$ ) (4).

- **Protocole FAC ou FEC**

D'autres études comme celle de *Levine et al* ont secondairement objectivé que la substitution du méthotrexate pour une anthracycline, soit le protocole FEC versus CMF était plus efficace en terme de survie sans maladie (DFS) et de survie globale (OS) chez des patientes pré ménopausées avec atteinte ganglionnaire recevant une chimiothérapie adjuvante. Avec un recul de 10 ans, la dernière actualisation des données de survie de cette étude du *National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trial MA*, publiée dans le JCO en 2005, retrouve à 10 ans un taux de survie sans récurrence de 52% chez les patientes traitées par FEC versus 45% pour celles traitées par CMF (HR CMF vs FEC =1.31,  $p=0.007$ ). La survie globale est significativement améliorée par les anthracyclines avec une survie globale à 10 ans respective dans le bras FEC et CMF de 62% and 58% (HR CMF vs FEC =1.18,  $p = 0.085$ ) (5).

Au delà de cet essai et d'autre pris séparément, la méta analyse de *Peto et al* a confirmé de façon formelle l'avantage en survie d'une combinaison de chimiothérapie à base d'anthracyclines de type FEC ou FAC par rapport au CMF. En effet, la méta analyse rapporte que les études avec un protocole par CMF versus 4 AC donnent des résultats équivalents en terme de réduction de risque de mortalité par cancer du sein avec un RR : 0.98, écart standard SE 0.05,  $2p=0.67$ , mais un régime à base d'anthracyclines avec des doses cumulées d'anthracyclines supérieures au 4AC standard, soit un protocole FEC ou FAC était substantiellement supérieur par rapport au CMF : RR 0.78, SE 0.06,  $2p=0.0004$  (6).

- **Taxanes : Docetaxel ou Paclitaxel**

Concernant les taxanes, c'est *Henderson et al* qui a démontré que l'adjonction de 4 cycles de Paclitaxel à 175mg/m<sup>2</sup> chez les patientes N+ traitées par 4 AC améliorerait à 5 ans, à la fois la survie sans rechute DFS (HR : 0,83 réduction du risque relatif de récurrence de 17%) et la survie globale OS (HR : 0,82, réduction du risque relatif de décès de 18%), se traduisant en valeur absolue par une amélioration respective à 5 ans de la DFS de 5% (passant de 60 à 65%) et de l'OS de 3% (passant de 77 à 80%) (7). La principale critique de cette étude portant sur plus de 3000 patientes était la différence de durée de la chimiothérapie adjuvante, 12 semaines pour les 4AC seul versus 24 semaines pour l'adjonction des 4 Paclitaxel au 4 AC. Une autre étude, l'étude française **PACS01**, à quant à elle comparé 6 cycles de FEC versus 3 cycles de FEC suivi de 3 cycles de Taxotere toutes les 3 semaines sur 1999 patientes atteintes de cancer du sein N+, permettant cette fois ci de comparer des durées de traitements adjuvants équivalentes. Les taux de PFS et d'OS sont significativement en faveur de l'adjonction des taxanes et donc du protocole séquentiel par FEC100-TAXOTERE : DFS de 78,4% versus 73,2% (p=0,012) et OS de 90,7% vs 86,7%(p=0,017) pour le 3 FEC 100-3 TAXOTERE versus les 6 FEC 100. En terme de réduction de risque, l'analyse multivariée a permis de conclure que le schéma séquentiel versus le protocole à base d'anthracyclines seul (6 FEC 100) permettait une réduction relative du risque de rechute de 18% et de décès de 27% (8).

Concernant la thérapie concomitante, à savoir les taxanes administrés en concomitant et non pas de façon séquentielle, le protocole TAC a été expérimenté au sein de l'étude **BCIRG 001**, sur environ 1500 patientes de 18-70 ans opérées d'un cancer du sein avec atteinte ganglionnaire N+. Le protocole TAC (TAXOTERE 75mg/m<sup>2</sup>, Adriamycine 50mg/m<sup>2</sup> et Cyclophosphamide 600mg/m<sup>2</sup>), pour 6 cures administrées toutes les 3 semaines a été comparé à 6 cures du protocole FAC (équivalent au FEC, anthracycline différente : Adriamycine versus Epirubicine). Les données de suivies à long terme actualisées à 10 ans et publiées en 2013 dans le *Lancet Oncology* par *Mackey et al* confirment le bénéfice de l'adjonction des taxanes comparativement aux anthracyclines seules. La survie sans récurrence (DFS) est de 62% vs 55% dans le bras TAC vs FAC avec un HR à 0.80, IC95% 0,68-0,93, p=0,0043 et ceci indépendamment du statut ganglionnaire, hormonal ou du statut

HER2. Les données de survie globale à 10 ans sont en faveur du TAC avec une OS à 10 ans de 76% vs 69% avec un HR à 0,74, 0,61-0,90  $p=0,0020$ . Cependant, la principale limite du protocole combiné est la toxicité, à court terme notamment au niveau hématologique avec 10 fois plus de neutropénie dans le protocole TAC que FAC : 24,7% versus 2,5% ( $p<0.001$ ) sur les données initiales publiées par *Martin et al* (9). Ce taux de neutropénie fébrile a pu être réduit à 6,5% avec l'adjonction prophylactique de facteurs de croissance granulocytaires (amendement au protocole) (10).

Ce bénéfice de l'adjonction des taxanes est confirmé également pour les patientes sans atteinte ganglionnaire N0, mais avec des facteurs de risque de rechute élevée comme un grade élevé, des embols, une négativité des RH. Ceci a été démontré également par *Martin et al* sur une population de 1060 patientes N0, mais avec des facteurs de mauvais pronostic (selon la conférence de consensus de Saint Gallen de 1998 : taille tumorale >2cm, RH négatifs, grade 2-3 SBR, âge <35ans). Comme dans l'étude BCIRG001, 6 FAC vs 6 TAC ont été comparés, avec une amélioration significative de la DFS après 77 mois de suivi : 81,8% bras FAC versus 87,8% bras TAC avec un HR : 0.68 IC 95%0,49-0,93  $p=0.01$ , soit une réduction relative du risque de rechute de 32% (11). Ce bénéfice en survie sans récurrence est indépendant du statut hormonal tumoral, du statut ménopausique ou du nombre cumulé de facteurs de risque de récurrence. La différence en terme de taux de survie (TAC, 95.2%; FAC, 93.5%) n'est pas significative (HR, 0.76; 95% CI, 0.45 1.26), cependant le nombre d'évènements au moment de l'analyse en 2010 était trop faible (TAC : 26 FAC : 34) (11). L'efficacité si elle supérieure, est associée à une plus grande toxicité : grade 3-4 : TAC 28,2% versus 17% FAC ( $p<0,001$ ), toxicité diminuée avec l'adjonction systématique de facteurs de croissance granulocytaire.

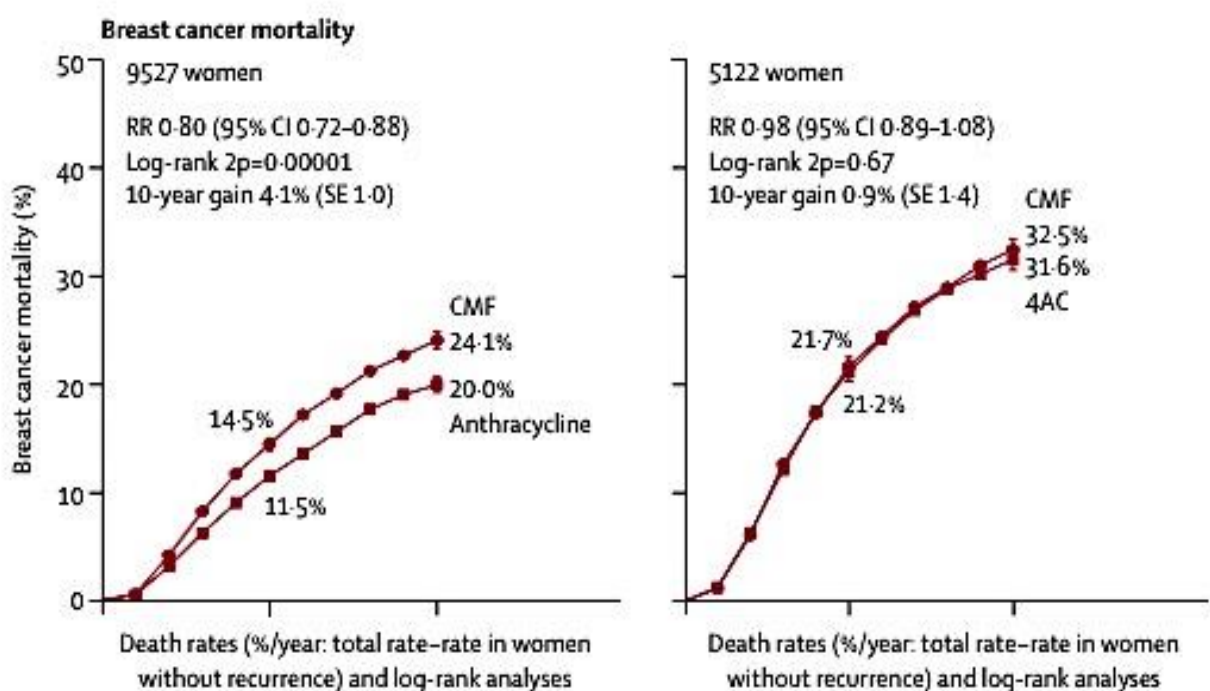
Une comparaison des essais avec du TAC en adjuvant démontre bien que le bénéfice de l'adjonction des taxanes est similaire chez les patientes N0 comme N+.

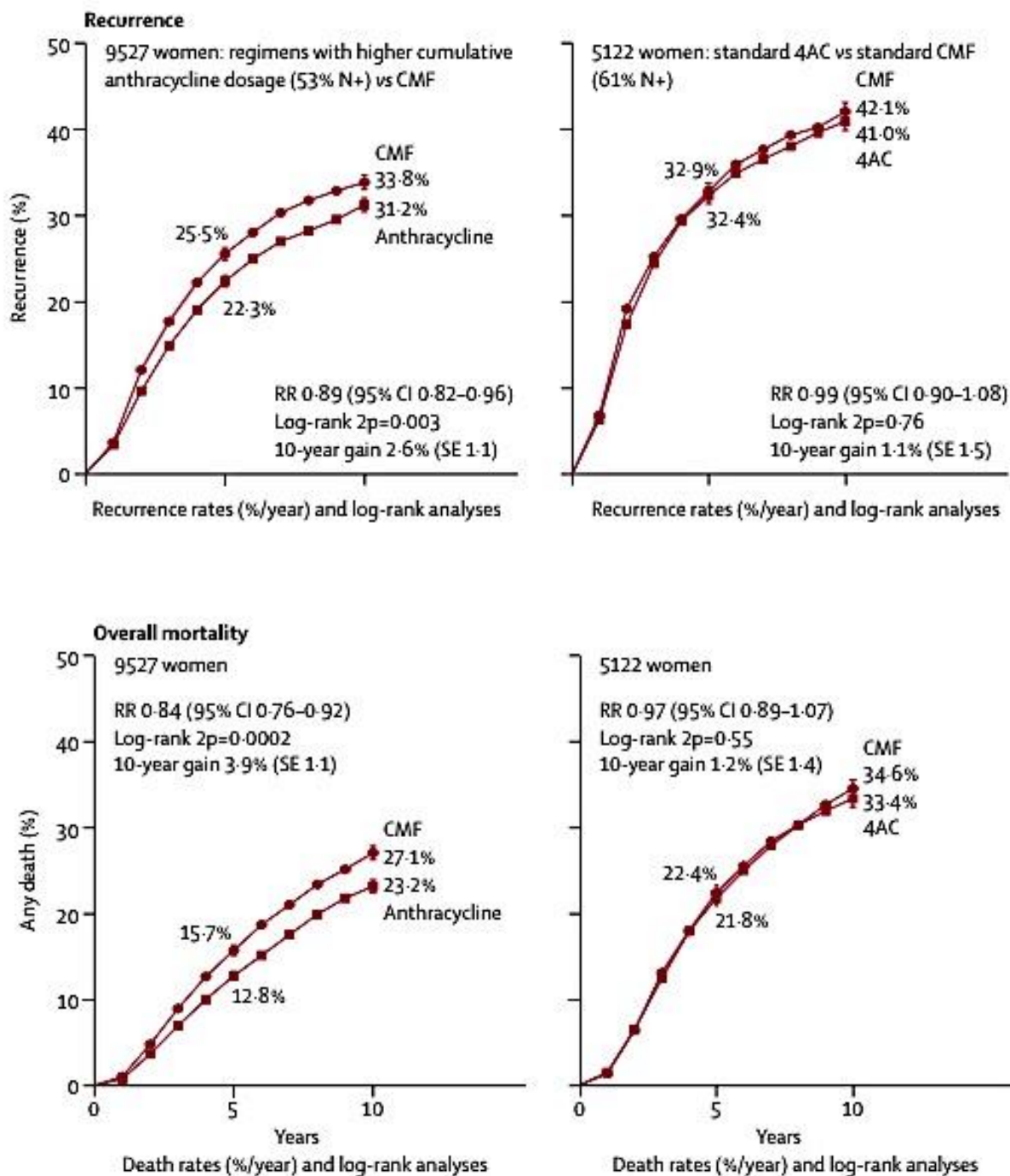


- **Données de la méta analyse de Peto et al**

La méta analyse objective que le protocole CMF est sensiblement équivalent à 4 AC, (dose cumulée de doxorubicine  $<240\text{mg/m}^2$ ), faisant mieux que l'abstention thérapeutique avec une réduction de la récurrence de 50% environ dans les 2 ans et de 30% environ dans les 8 ans suivants (6).

Concernant la mortalité, **le CMF et les 4 AC réduisent la mortalité par cancer du sein de 20-25%** par rapport à l'absence de chimiothérapie. Aucune différence entre les taux de récurrence, de mortalité par cancer du sein et de mortalité globale ne sont observés entre les 4AC et le CMF (**Figure 1. Partie droite**). En revanche, si la dose cumulée d'anthracycline augmente, avec de la doxorubicine à  $60\text{mg/m}^2$  ou l'épirubicine à  $90\text{mg/m}^2$  par cycle et une dose cumulée totale de doxorubicine et d'épirubicine  $>240$  et  $360\text{mg/m}^2$  respectivement, soit supérieure à 4 cycles d'AC (en pratique protocole type 6 FEC ou 6 FAC), il existe alors une différence significative par rapport au CMF en **terme de récurrence, de mortalité par cancer du sein et de mortalité globale en faveur des anthracyclines**, avec des HR, p value, gain en valeur absolu respectifs à 10 ans de : 0,89 2p=0,003 (+2,6%), 0,80 2p= 0,00001 (+4,1%) et 0,84 2p=0,002 (+3,9%) (**Figure 1. partie gauche**). Ainsi, un protocole de type **6 FEC 100** ou **6 FAC** permet une réduction supplémentaire de la mortalité de 15-20% environ par rapport au CMF ou 4 AC.





**Figure 1. Mortalité par cancer du sein, récurrence et mortalité globale à 10 ans en cas de chimiothérapie adjuvante par anthracyclines vs CMF.**

A gauche : en cas de dose cumulée d’anthracyclines (>240mg/m<sup>2</sup> pour la doxorubicine et >360mg/m<sup>2</sup> pour l’épirubicine soit un protocole type 6 FEC ou 6 FAC) versus le protocole CMF. A droite : En cas de 4 AC (doxorubicine <240mg/m<sup>2</sup>) vs CMF à droite (11).

Enfin, le 3<sup>ème</sup> élément fort de cette méta analyse concerne les taxanes, les analyses confirmant que les régimes à base de taxanes associés aux anthracyclines (A+T) vs les anthracyclines seuls (A) améliorent certes **légèrement** (notamment en valeur absolue) mais de façon **très statistiquement significative le taux de récurrence, la mortalité par cancer du sein, la mortalité globale toutes études confondues**. Ainsi pour 44000 malades, les HR de réductions de risque, p value sont : 0.87 (SE 0,03) pour les métastases à distance, 0.86 avec  $2p < 0.00001$  pour toutes récurrences, 0.87  $2p < 0.00001$  pour la mortalité par cancer du sein et 0.89  $2p < 0.00001$  pour la mortalité globale.

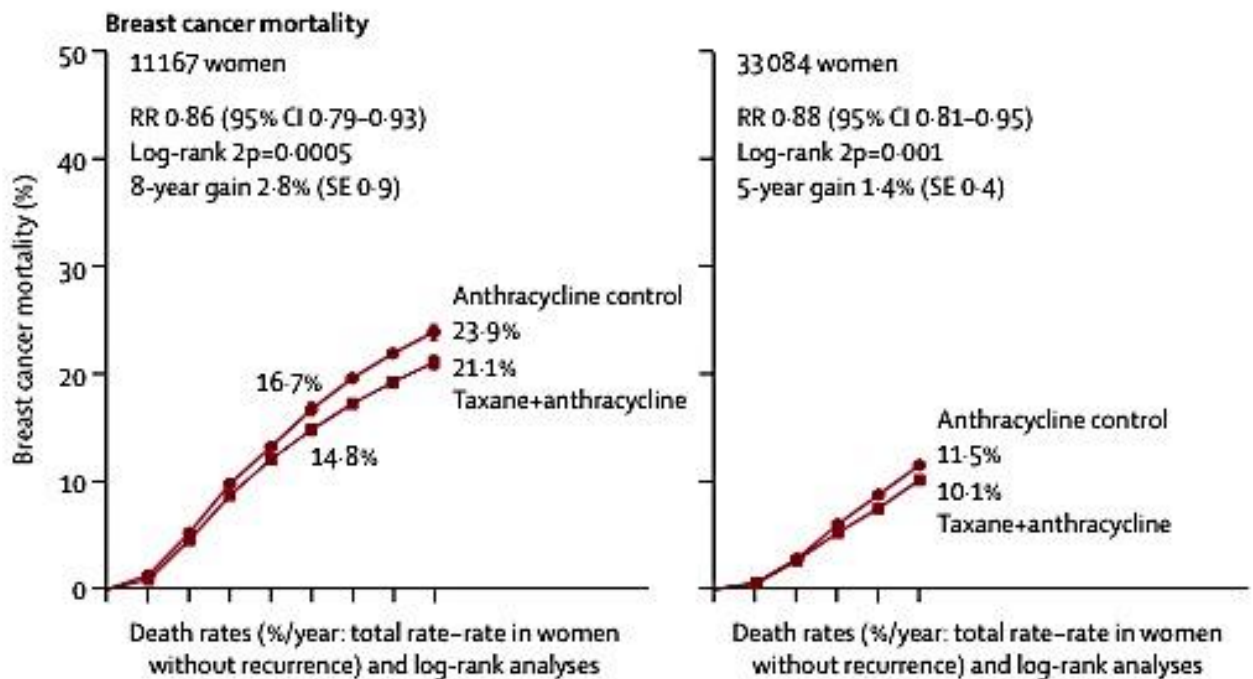
**Ainsi, un régime à base de taxanes permet globalement une réduction de la mortalité par cancer du sein de l'ordre de 10-15% par rapport aux protocoles de chimiothérapies à base d' anthracyclines seules.**

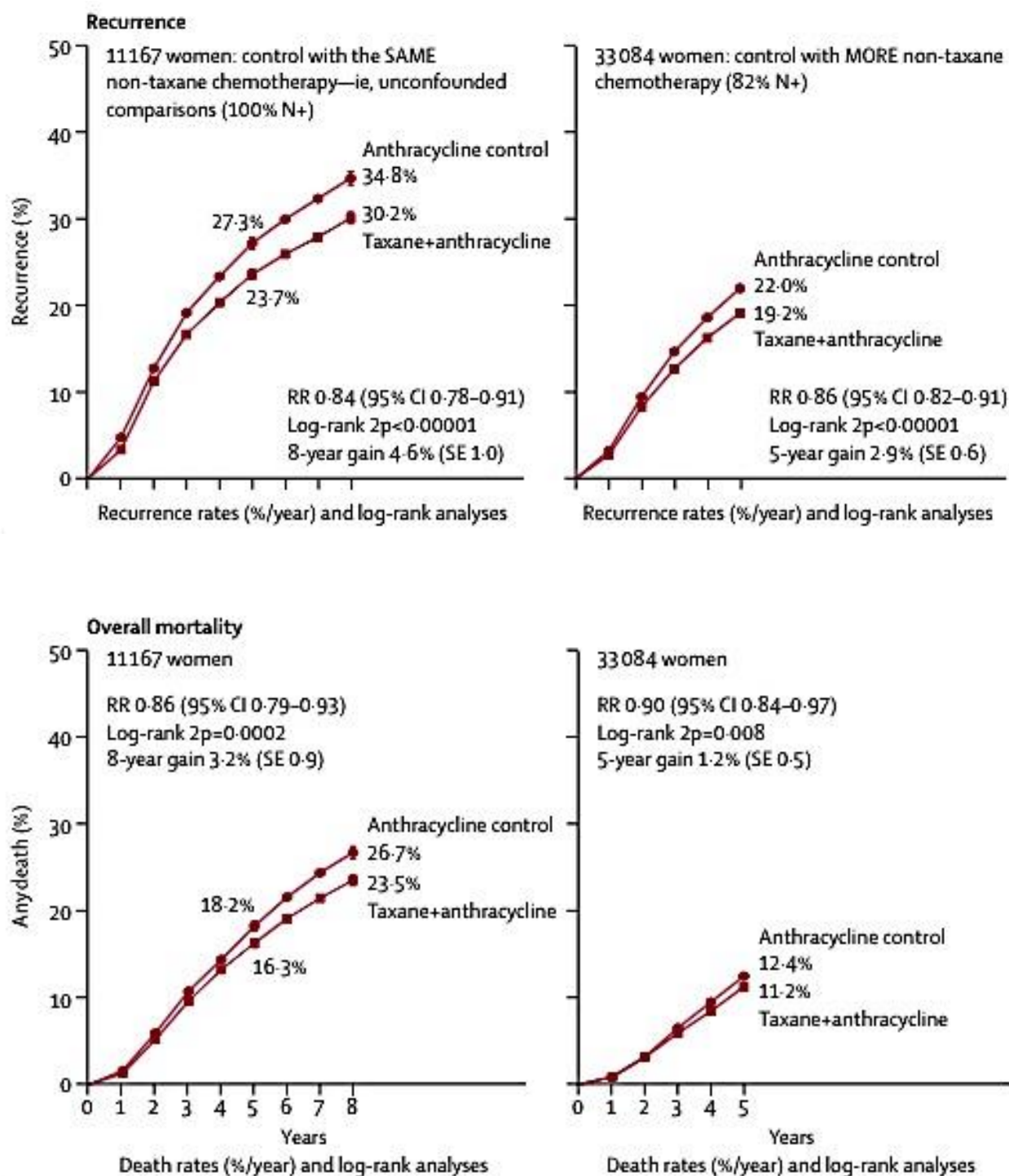
Cependant, en « dichotomisant » ces études (n=44000) qui comparent A+T vs A seule, entre celles avec le même protocole à base d'anthracycline A dans les deux bras (**études dites « non confondantes » (n=11000), car ceci allonge en pratique la durée de la chimiothérapie dans le bras A+T**) et celles avec une augmentation de chacune des drogues du protocole à base d'anthracyclines (**études « confondantes », n=33000) durée alors équivalente de la chimiothérapie adjuvante dans les deux bras**), le bénéfice semble plus limité dans le 2<sup>ème</sup> cas de figure sur tous les critères de jugements : récurrence, mortalité globale et par cancer **(Figure 2.)**

- Ainsi, pour 11000 patientes de ces études non « confondantes », et avec un suivi de 8 ans, les HR respectifs, p value et gain absolue à 8 ans : **pour la récurrence 0.84  $2p < 0,00001$ (+4,6%), la mortalité par cancer du sein RR : 0.86  $2p = 0,0005$  (+2,8%), et la mortalité globale 0.86  $2p = 0,0002$ (+3,2%)**. L'effet de l'adjonction des taxanes est modéré sur la récurrence et discrète sur la mortalité globale et spécifique par cancer du sein.
- Le même effet en terme de réduction de risque est observé y compris en cas de dose d'anthracyclines supérieure à 4AC comme 6 FEC ou FAC mais avec une amplitude de réduction de risque dans ce cas encore nettement moindre (la durée de traitement de chimiothérapie étant alors sensiblement ou

équivalente). Ces études confondantes (effet des taxanes contrebalancés par une augmentation du nombre de cycles de chimiothérapie sans taxanes dans le bras contrôle) comparent anthracyclines+ taxanes vs anthracyclines seules et sont de deux types :

- soit avec un nombre de cycles d’anthracyclines doublé dans le bras contrôle (n=10000) ou augmentée sans être doublée, incluant quelques études de séquentiels comme le TAC (n=23000). Les HR, p value et gain absolu à 5 ans sont respectivement **pour la récurrence 0,86 2p<0,00001(+2,9%), la mortalité par cancer du sein 0,88 2p=0,001(+1,4%)** et la mortalité globale **0,90 2p=0,008 (+1,2%)**.
- En analyse en sous groupes sur ces 44000 patientes, en cas d’adjonction de taxanes aux anthracyclines contrebalancés par une doublement des doses de chimiothérapies à bases d’anthracycline, **le bénéfice de l’adjonction des taxanes sur la réduction de la mortalité par cancer du sein n’est plus observé : HR : 0,94, SE 0,06 2p=0,33.**





**Figure 2. Mortalité par cancer du sein à 10 ans, récurrence, et mortalité globale entre une chimiothérapie adjuvante par anthracyclines+taxanes versus anthracycline seule.**

A gauche, sur n=11000 patientes issues d'études non confondantes (même nombre de cycle de chimiothérapie sans taxanes). A droite, sur n=33000 patientes issues d'études confondantes (comparaison avec une augmentation (doublée ou pas) du nombre de cycles de chimiothérapie sans taxanes (11)).

Ainsi, les régimes de chimiothérapie comportant plus de 4 AC, comme 6 FEC ou 6 FAC, et 4AC-4Taxanes sont plus efficaces comparativement, et permettent de réduire encore de 15-20% supplémentaires la mortalité par cancer du sein par rapport au CMF et au 4AC. En multipliant les réductions de risque relatif de décès apportés par les différents protocoles de chimiothérapie depuis le CMF équivalent à 4AC jusqu'au protocole à base de taxanes, **la méta analyse objective une réduction du taux de mortalité par cancer du sein de 36%** ( $HR=0,775 \times 0,825=0,64$ ) par les protocoles actuels par rapport à l'absence de chimiothérapie adjuvante. **Une réduction du risque de 36% du taux de décès par année correspond en pratique à une diminution du taux de décès à 10 ans de 30 à 20%, donc une réduction du risque de décès par cancer du sein de 1/3 à 10 ans. C'est ainsi que le standard de chimiothérapie adjuvante est devenu un protocole à base d'anthracyclines et de taxanes.** La question reste débattue encore actuellement sur les modalités optimales d'administration : séquentielle selon le 3 FEC100-3TAXOTERE ou 4AC-4Taxanes (Docetaxel ou Paclitaxel) versus concomitante de type 6 TAC. Une large étude, l'étude **BCIRG-005** sur 3298 malades, N+, HER2-, a comparé directement ces deux modalités possibles, à savoir 6 cycles concomitant TAC (75/50/500 mg/m<sup>2</sup> toutes les 3 semaines) versus un schéma séquentiel 4AC(60/600mg/m<sup>2</sup> toutes les 3 semaines)-4T(Docetaxel 100mg/m<sup>2</sup>) sans prophylaxie par facteurs de croissance GCSF. Les résultats de cette étude montrent une stricte équivalence en terme d'efficacité : DFS à 5 ans 79% dans les deux groupes ( $p= 0.98$  HR : 1.0 IC95%, 0.86-1.16), et OS à 5 ans : 88% (TAC et 89% AC>T ( $p=0.37$  HR : 0.91 IC95%, 0.75-1.11) mais des différences nettes de toxicité (12). En effet, le protocole TAC est associé à comme attendu à plus de toxicité hématologique : neutropénie fébrile (17.4% vs 7.7%;  $p<0.001$ ) et de thrombopénie (25.6% vs 41.0%;  $p<0.001$ ). Le schéma séquentiel est quant à lui associé à plus de neuropathie sensitive secondaire au Docetaxel (42.8% vs 27.5%), à des troubles unguéaux (44.5% vs 22.1%) et de myalgies (50.9% vs 35.8%),  $p<0,001$ . Le taux d'arrêt de la chimiothérapie était plus élevé dans le bras séquentiel versus concomitant. Ainsi les deux protocoles sont équivalents en terme d'efficacité, la décision se fera sur le profil de toxicité (qui peut être amélioré par les GSCF) et sur la durée du traitement (12 versus 24 semaines).Cependant, il faut noter que l'analyse

des toxicités tardives montre davantage de toxicité tardive cardiaque (baisse de la FEVG) sous TAC incitant à utiliser en prime intention un schéma séquentiel (13).

Enfin, le 4<sup>ème</sup> élément fort de cette méta analyse concerne le fait que le bénéfice apporté par la chimiothérapie, sur la réduction du risque de récurrence précoce, de toutes récurrences et de mortalité par cancer du sein, pour les protocoles à base de taxanes ou d'anthracyclines seule, **n'est pas affecté par l'âge de la patiente, (jusque 70 ans), le statut ganglionnaire, la taille tumorale, le grade de différenciation, le statut RE et l'utilisation d'une hormonothérapie adjuvante, soulignant un bénéfice de la chimiothérapie dans tous les sous groupes, indépendamment de ces caractéristiques.**

La chimiothérapie adjuvante actuelle réduit ainsi de 1/3 la mortalité par cancer du sein à 10 ans, indépendamment de ces caractéristiques. Cependant le gain absolu d'une réduction du risque de mortalité à 10 ans de 1/3 dépend du risque absolu sans chimiothérapie. Bien que les paramètres précédents n'influencent pas sur le bénéfice de la chimiothérapie, il aide dans les décisions thérapeutiques, étant fortement prédictif du risque absolu sans chimiothérapie et donc du bénéfice potentiel absolu obtenu par une réduction de 1/3 de ce risque.

Ainsi, par exemple, en cas de cancer du sein RE+, N0, avec un score de récurrence RS bas selon la signature Oncotype DX, le pronostic est très favorable si bien que même si la chimio adjuvante réduit le risque de rechute et de mortalité de 1/3 à 10 ans le nombre absolu de patientes qui bénéficie du traitement est de 2 à 3 sur 100, dépassant les 1% de toxicités menaçant la vie, imputable de façon générale à un protocole de chimiothérapie adjuvante (14). Ainsi, l'utilisation d'OncoType DX dans cette catégorie de patientes a permis de réduire les indications de chimiothérapie adjuvante (15).

**Au total, les régimes à base d'anthracyclines et de taxanes réduisent globalement la mortalité par cancer du sein de 1/3 et sont actuellement la référence de standard de prise en charge adjuvante du cancer du sein. Cependant, cette réduction de risque de mortalité de façon globale dépend bien entendu du niveau de risque individuel de récurrence : un faible risque**

**impliquant un plus faible bénéfice de la chimiothérapie adjuvante. L'évaluation du risque est donc capitale.**

## **B. Protocoles de chimiothérapies de référence**

Ainsi, si une chimiothérapie adjuvante est indiquée, dans la mesure du possible et en l'absence de contre indication, celle ci doit consister en un protocole plutôt séquentiel (moins toxique) à base d'anthracyclines (Adriamycine=Doxorubicine, Epirubicine) et de taxanes (Docetaxel, Paclitaxel), ce protocole s'est avéré actuellement comme apportant le plus de bénéfice sur les données de survie selon la méta analyse de *Peto et al.* Ainsi, les différentes options possibles de chimiothérapie en adjuvant sont les protocoles suivants sur les bases de cette méta analyse et des essais mentionnés :

- 3FEC100-3 Docetaxel (7)
- 3FEC100-12 Paclitaxel hebdomadaire (16)
- 4AC-4 Docetaxel (17)
- 6TAC (avec facteurs de croissance) (8) (10) (13)

### En option :

- 6FEC100 (18)
- 4TC seul, sur les données de l'étude de *Jones*, notamment si contre-indication aux anthracyclines (4AC=4TC) (19)

Le protocole actuellement le plus utilisé en France est le protocole **FEC100-Taxotere** selon les modalités suivantes :

- Protocole FEC initialement : 3 cycles espacés de 3 semaines : J1=J21
  - 5Fluorouracile (5FU) : 500mg/m<sup>2</sup>
  - Epirubicine : 100mg/m<sup>2</sup>
  - Cyclophosphamide (ENDOXAN) : 500mg/m<sup>2</sup>
- Puis Docetaxel 100mg/m<sup>2</sup> ou TAXOTERE : 3 cycles espacés toutes les 3 semaines J1=J21



## II. Facteurs décisionnels pour l'indication de chimiothérapie adjuvante

Après chirurgie d'exérèse du cancer du sein et exploration des aires ganglionnaires (ganglion sentinelle et/ou curage axillaire), va se discuter le plus souvent un traitement complémentaire dit « adjuvant » à la chirurgie. Le but étant à la fois de limiter le risque de récurrence locale mais surtout à distance, grâce à la chimiothérapie et l'hormonothérapie notamment. Il est ainsi clairement démontré, notamment par la dernière méta analyse de *Peto et al*, publiée dans le Lancet en 2012, que l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante est réel et dépend bien du niveau de risque individuel du patient (20). Il faut bien différencier les facteurs pronostiques des facteurs prédictifs de réponse à la chimiothérapie. Les facteurs pronostiques sont utiles après chirurgie première pour définir le risque de rechute locale ou métastatique et évaluer le risque de décès. Les facteurs prédictifs reflètent la capacité de réponse tumorale au traitement médical adjuvant. Certains paramètres sont uniquement pronostiques, d'autres à la fois pronostiques et prédictifs (RH et HER2 essentiellement, et signatures moléculaires).

L'examen anatomopathologique de la pièce opératoire est cruciale, ceci afin d'établir une stadification selon la classification TNM, mais aussi d'obtenir les caractéristiques biologiques de la tumeur (grade d'agressivité tumorale de Scarff Bloom Richardson ou grade SBR, index mitotique, récepteurs hormonaux, statut HER2, présence d'embols vasculaires et d'engainements perinerveux, Ki67...etc.) pour l'estimation du pronostic tumoral. Les paramètres cliniques notamment l'âge, le statut hormonal, les comorbidités sont autant de paramètres additionnels qui vont s'intégrer à la décision thérapeutique.

Les facteurs histopronostiques requis pour les décisions de chimiothérapie adjuvante ont fait l'objet de recommandations en 2013 selon le St Gallen International Expert Consensus (21). Cependant, dans un certains nombres de cas, ces paramètres classiques seront insuffisants pour pouvoir « statuer » de façon formelle sur le bénéfice « potentiel » d'un traitement adjuvant. Cette situation est de plus en plus fréquente avec le diagnostic croissant de tumeurs de petite taille (T1aT1b) sans atteinte ganglionnaire (N0) par la généralisation du dépistage. *Algood et al* ont ainsi

rapporté en 2011 au Royaume Uni que 31,6% des patientes avec des tumeurs T1aT1bN0M0 sont diagnostiquées via ces programmes de dépistage. Aux Etats Unis, selon la base de données SEER, entre 2004-2008, 50% des nouveaux cas de cancers du sein étaient des stade I, soit des tumeurs de moins de 2 cm sans atteinte ganglionnaire (T1N0M0), dont 50% de moins de 1cm (T1aT1bN0M0), soit 25% des nouveaux cas diagnostiqués de cancer du sein.

Dans ces situations, les données sur le bénéfice de la chimiothérapie restent plus controversées et plus limitées, car ces patients étaient jusqu'alors traditionnellement exclus des essais adjuvants de par leur pronostic spontanément favorable, avec une survie sans récurrence à 10 ans dépassant les 90% (22). Cependant, des récurrences ou des décès surviennent pour cette catégorie de tumeurs T1a-bN0M0 (23). Il faut recourir à d'autres critères que les paramètres histopronostiques habituels. Il s'agit des logiciels informatiques multiparamétriques d'estimation de gain apporté en survie par la chimiothérapie et ou l'hormonothérapie adjuvante (« Adjuvant Online »), mais aussi et de plus en plus du recours à des signatures moléculaires validées dans des cas sélectionnés.

**L'évaluation du pronostic est cruciale car de la bonne détermination du niveau de risque individuel de chaque patient va dépendre l'amplitude du bénéfice de la chimiothérapie adjuvante. L'objectif est à la fois double, éviter le « sur » comme le « sous » traitement.**

Les facteurs justifiant d'une chimiothérapie adjuvante et validés par la dernière conférence de consensus d'experts internationaux de Saint Gallen sont :

- Sur le plan anatomopathologique : **un Grade SBR 3, un Ki67 élevé, un statut hormonal faible, la surexpression de HER2, une tumeur triple négative, une atteinte ganglionnaire N >3 ganglions.**
- Sur le plan le plan moléculaire : **un score de récurrence (RS) élevé selon la signature à 21 gènes (Oncotype DX) ou selon celle à 70 gènes (Mammaprint) (21)** sont des critères pour une chimiothérapie adjuvante. L'American Society Of Clinical Oncology (ASCO), recommande également l'utilisation de certaines de ces signatures multigéniques et le marqueur UPA/PAI1 (24).

## A. Critères cliniques

Sur le plan clinique, l'âge reste un critère débattu comme paramètre à intégrer pour les indications de chimiothérapie adjuvante. En effet, lors de la dernière conférence de consensus de Saint Gallen en 2013, l'âge <35 ans n'est retenu que par 50% des experts comme un critère de chimiothérapie adjuvante, en raison du pronostic plus péjoratif (21). En effet, certaines études rétrospectives tendent à montrer que les femmes jeunes diagnostiquées avant 35 ans ont une moins bonne survie sans récurrence et une survie spécifique liée aux cancers du sein. Deux larges études (*Nixon et al*, *Albain et al*) ont démontré un plus mauvais pronostic pour les patientes de moins de 35 ans, après ajustement sur les autres variables pronostiques. Ainsi *Nixon et al*, objective que l'âge  $\leq 35$  ans est un facteur prédictif indépendant de temps jusqu'à récurrence, de temps jusqu'à la survenue de métastases et de mortalité globale chez des patientes atteintes de cancer du sein de stades I ou II (25). *Albain et al* confirme le rôle pronostique défavorable de l'âge (26). *Gnerlich et al*, retrouve un âge <40 ans comme corrélé au risque de récurrences et de décès (27). Plus spécifiquement pour les tumeurs de <1cm, *Kwon et al* note sur 375 patientes de stades T1mic,a,bN0 une association entre âge <35 ans et un risque de récurrence multiplié par 4 :HR 4,91 IC95% 1,014-23,763 p=0,048 (28). Les autres paramètres cliniques ne vont pas influencer l'indication de chimiothérapie en elle-même, mais le type de protocole : comorbités, âge physiologique mis en parallèle aux tares associées, à l'état global de santé du sujet âgé, au désir de préservation de la fertilité par exemple.

## B. Critères anatomopathologiques

Sur le plan anatomopathologique, les principaux facteurs « **pronostiques** » reconnus et validés par l'European Society Of Medical Oncology (ESMO) dans le cancer du sein de stade précoce sont : le type histologique, le grade tumoral selon la classification de Scarff Bloom et Richardson (SBR), la taille tumorale (T), le nombre de ganglions envahis (N) soit la classification TNM, les marqueurs de prolifération (Ki67, index mitotique), les embols vasculaires, le statut HER2, le statut hormonal

tumoral (RE/RP). Seuls HER2, le statut RE et RP sont des facteurs « **prédicatifs** » validés, autorisant la sélection des patients pour la thérapie ciblée anti HER2 par Trastuzumab (Herceptin) ou encore l'hormonothérapie (29).

## 1. Stadification tumorale : Classification TNM

Etablir le stade du cancer du sein fondamental en raison de sa corrélation forte avec le pronostic. La classification doit être établie selon la classification TNM 2010 de l'American Joint Committee on cancer (AJCC) (*Edge SB, Byrd DR et al, (eds) (2010) AJCC cancer staging manual. Springer, New York*), ce qui permet d'établir un stadification selon l'Union for International Cancer Control (UICC). Elle est initialement clinique ou cTNM, puis secondairement après chirurgie, anatomopathologique, ou pTNM. En effet, la **taille tumorale (T)** est un facteur pronostique déterminant, corrélée positivement à l'envahissement ganglionnaire (N) au moment du diagnostic, mais aussi à la récurrence tumorale et à la mortalité (30). De façon schématique, selon la base de données SEER, sur 13464 patientes N0, les tumeurs <1 cm ont une survie globale à 5 ans de 99% versus 89% entre 1 et 3 cm, versus 86% entre 3 et 5 cm (31). Avec un recul plus long de 20 ans sur des tumeurs T1-T2, *Rosen et al*, retrouve un lien entre survie sans récurrence tumorale à 20 ans et taille tumorale (T) : 88% si  $\leq 1$ cm, 72% si 1.1 à 3cm et 59% si 3.1-5cm (32).

**L'atteinte ganglionnaire** est pronostique également, tout en sachant qu'une atteinte limitée ne justifiera plus d'une chimiothérapie systématique, notamment en cas de tumeurs moins de 1 cm (21). En effet, l'impact de l'atteinte ganglionnaire est majeure, dichotomisant les patientes en N0 ou N+ (33) (34). Comme la taille tumorale, il existe une relation directe entre nombre de ganglions envahis et le risque de récurrence à distance. Il existe 4 groupes d'atteintes ganglionnaires principalement basés sur les essais du NSABP et retranscrits dans la classification TNM : 0 ganglion atteint, 1-3, 4-9,  $\geq 10$ . La survie relative à 5 ans est directement corrélée à l'atteinte ganglionnaire avec respectivement des taux de survie à : 82,8%, 73%, 45,7% pour 4-12 ganglions et 28,4% pour un N  $\geq 13$ , sur les données de la revue de *Fisher et al* (35). Ainsi, avec un risque de récurrence à distance  $\geq 20\%$  en cas d'atteinte ganglionnaire, le recours à la chimiothérapie adjuvante est licite. Cependant, l'atteinte ganglionnaire à elle seule n'est pas une indication absolue de

chimiothérapie adjuvante (21). La situation se complexifie en cas de micro-métastases occultes ganglionnaires (0,2 mm et/ou de plus de 200 cellules, < strict à 2mm), mais surtout en cas de cellules tumorales isolées (CTI) (<0,2 mm dépistées en immunohistochimie (IHC), par coloration à l'Hématoxyline et Eosine (HE), ou en biologie moléculaire, sur les ganglions sentinelles notamment. Les pratiques sont actuellement standardisées actuellement pour les indications de reprise en curage axillaire en cas de CTI ou de micro-métastases, avec l'apport des éventuels nomogrammes (36) (37) (38) (39) (40). Pour les indications de chimiothérapie adjuvante, la signification pronostique de ces atteintes ganglionnaires non macroscopiques, avec reprise secondaire ou pas en curage axillaire reste controversée (41).

Pour les patients N0, la taille tumorale sera alors le paramètre pronostique le plus puissant utilisé en routine. En général, les tumeurs de plus de 1cm (>T1b donc T1cT2N0) seront une indication à une chimiothérapie adjuvante, en raison du risque de récurrence à distance >20% (41). Les autres paramètres histologiques RE/RP/HER2/Ki67... et éventuellement moléculaires seront alors utiles pour les petites tailles tumorales (T1a-bN0M0).

Ainsi, la classification TNM et la stadification selon l'UICC sont à la base de la détermination du pronostic (Annexe 1) (Annexe 2).

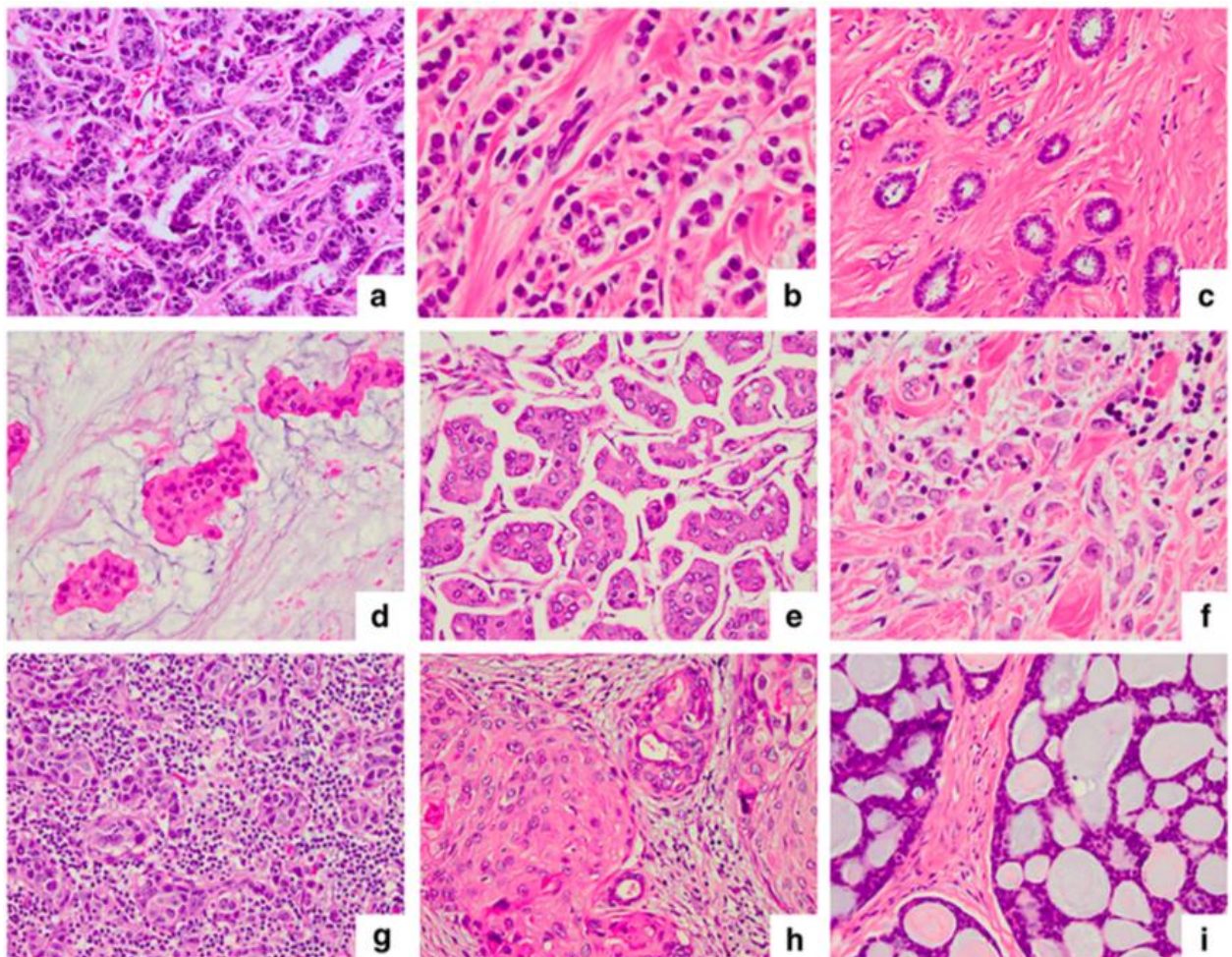
## **2. Type histologique**

Le cancer du sein n'est pas une seule maladie mais comprend 21 types histologiques distincts selon la classification de l'OMS de 2003 (42). Certains sous-types histologiques ont en effet en plus de leur caractéristiques morphologiques des comportements cliniques typiques, et des signatures génétiques spécifiques qui apportent une information pronostique et prédictive importante (43).

Il est important de connaître le type histologique, certains ayant spontanément un pronostic plus favorable (tubuleux, mucineux, cribriforme, sécrétant juvénile, adénoïde kystique) ou défavorable (micro papillaire, métaplasique), pouvant impacter dans la balance décisionnelle thérapeutique (41). Dans 70 à 75% des cas, il s'agira de carcinome canalaire infiltrant ou (CCI), moins fréquemment, dans 10 à 15%

environ de carcinome lobulaire ou (CLI), moins chimio sensibles, et enfin dans 15% des cas d'entités tumorales beaucoup plus rares (35) (42).

L'observation microscopique de ces tumeurs (**Figure 3.**) permet de se rendre compte que sous « l'appellation » commune d'adénocarcinome mammaire existe de nombreuses sous entités. Ceci reflète déjà au niveau anatomopathologique la grande hétérogénéité du cancer du sein, même si toutes tumeurs sont regroupées sous la même entité nosologique d'adénocarcinome et traitées avec les mêmes protocoles de chimiothérapie notamment.



**Figure 3. Formes anatomopathologiques de cancer du sein.**

a) carcinome canalaire invasif, b) carcinome lobulaire classique, c) carcinome tubuleux, d) carcinome mucineux, e) carcinome micro-papillaire invasif, f) carcinome lobulaire pléiomorphe, g) carcinome médullaire, h) carcinome métaplasique, i) carcinome adénoïde cystique (42).

### 3. Grade de prolifération

Tous les cancers du sein indépendamment du type histologique sont et doivent être gradés. Le grading le plus largement validé est celui de Bloom et Richardson (44), modifié par Elston et Ellis (45). **L'index mitotique, la différenciation et le pléomorphisme** sont scorés de 1 à 3 avec totalisation des scores pour chacun des 3 items. Ceci permet d'obtenir 3 grades tumoraux : Grade I (3-5) ou bien différencié, Grade II (6-7) ou moyennement différencié, et Grade III (8-9) ou faiblement différencié. Une corrélation forte a été retrouvée entre grade SBR et survie sans rechute (DFS) à 5 ans sur plus de 1200 femmes. Le risque de récurrence est multipliée d'un facteur 4.4 en cas de grade III versus un grade I (46). Le grade est un puissant indicateur pronostique, validé par la conférence de consensus de Saint Gallen (Grade III et chimiothérapie adjuvante) (21) et par ailleurs intégré d'ailleurs dans les index pronostiques comme celui de Nottingham ou Adjuvant On Line.

### 4. Marqueurs de prolifération : Ki67

Plusieurs marqueurs de prolifération existent comme la fraction de cellules en phase S, l'index de marquage de la thymidine, l'index mitotique, ou encore le marquage en IHC d'antigènes de prolifération comme le Ki67. Les principaux problèmes de ces marqueurs étaient l'absence de méthodologie fiable, reproductible et le manque d'information au regard des traitements systémiques, et des autres variables pronostiques. Le plus éprouvé et utilisé est le Ki67, une protéine nucléaire non histonique, marqueur de prolifération cellulaire. En effet, il a été utilisé pendant plus de 20 ans comme marqueur pronostique dans le cancer du sein de stade précoce (47) (48) (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55). Un Ki67 élevé est associé à une survie spécifique du cancer du sein moins bonne, mais son utilisation en routine a souffert de l'absence de standardisation de sa méthode d'évaluation et de son cut-offs. Une méta analyse d'études publiées sur le Ki67 sur plus de 12000 malades retrouve qu'un Ki67 positif (Cut Off différent en fonction des études) est positivement associé à la récurrence avec un risque relatif multiplié par 1,93 chez tous les patients, par 1.59 chez les N+, et par 2,31 chez les patients N0. Il est surtout associé à la survie chez tous les patients (RR=1,95), chez les patientes N+ (RR= 2,33) comme N0 (RR=2,54) (52). Il est reconnu comme un facteur pronostique à part entière par l'ESMO (29).

Actuellement, il n'y pas de consensus sur le protocole optimal de management de ces patients (41). Cependant, un Cut-Offs  $\geq 20\%$  a été validé par les experts de St Gallen comme clairement indicatif d'un status Ki67 élevé. C'est également pour les experts de la conférence de consensus de Saint Gallen un critère indicatif de chimiothérapie adjuvante (21). Cependant, le seuil de ce pallier est discuté par certains auteurs, car potentiellement trop élevé (variabilité interlaboratoire importante), pouvant entraîner un sous traitement des patientes avec une tumeur de type luminal A. D'autre part, le Ki67 est validé en association au statut ER et PR pour différencier les sous types moléculaires Luminal A et B sans recourir aux techniques de biologie moléculaire, sans pouvoir être substitué par le grade SBR III (21).

## 5. Embols Vasculaires et lymphatiques

Les embols vasculaires et lymphatiques sont également pronostiques, à la fois sur le risque de rechute locale et à distance. *Rosen et al* ont démontré une corrélation entre le risque de récurrence et de décès par cancer pour les stades I, avec 38% de récurrence en cas d'embols versus 22% si absents (22). De façon similaire une étude de l'International Breast Cancer Study Group sur plus de 1275 femmes, N0, qui recevaient aucun traitement adjuvant ou 1 cycle de chimiothérapie péri-opératoire retrouve une augmentation du risque de récurrence de 15% à 5 ans, en cas d'embols, indépendamment si un traitement adjuvant était administré ou pas (56). Ce critère est surtout utile pour les tumeurs sans atteinte ganglionnaire, de taille limitée. Il est reconnu par les dernières guidelines de l'ESMO comme facteur pronostique (29) mais pas reconnu par la conférence de Saint Gallen comme une indication en soi même de chimiothérapie adjuvante (21).

## 6. Récepteurs hormonaux

Les récepteurs hormonaux (RH), à l'estrogène (RE) et à la progestérone (RP) restent avec HER2, les biomarqueurs les plus utilisés en routine (57). En effet, la présence de ces récepteurs est à la fois pronostique en terme de rechute et de survie, et prédictive de l'efficacité des traitements adjuvants par hormonothérapie, mais aussi par chimiothérapie.



Le RE a été identifié en 1960 par Ellwood Jensen, puis couramment utilisé dès le milieu des années 1970 comme facteur pronostique pour la récurrence précoce et tardive, et comme facteur prédictif de réponse à l'hormonothérapie adjuvante (42).

Environ 75 à 80% des cancers du sein expriment les RE (57) (58). Le mécanisme d'action des RE et de son ligand l'estrogène est complexe, mais peut être simplifié par une liaison de ces deux éléments, une dimérisation du récepteur RE et une translocation nucléaire sur des promoteurs de gènes, modulant la transcription de ceux ci. L'action du RE est par ailleurs influencée par d'autres récepteurs de facteurs de croissance comme HER2.

**Le rôle pronostique de RE** est difficile à évaluer puisqu'il doit l'être en l'absence de toute hormonothérapie. L'étude du NSABPC-06 a randomisé des patientes avec un cancer du sein de stade précoce entre mastectomie, tumorectomie seule, ou tumorectomie suivie de radiothérapie post-opératoire. Dans cette étude, aucune thérapeutique adjuvante de type chimiothérapie ou hormonothérapie n'était administrée. Les patientes avec des tumeurs RE+ ont une survie sans progression (PFS) à 5 ans de 74% et une survie globale (OS) de 92% tandis que les patientes avec des RE négatifs ont une PFS et OS respectives plus péjoratives, de 66 et 82%. L'amplitude de la différence est modérée à 5 ans : 6% en terme de PFS et 10% en terme d'OS (59). De plus, certaines études avec un suivi tendent à démontrer que la valeur pronostique de RE ne persiste pas à long terme. *Hilsenbeck et al* ont ainsi retrouvé un effet pronostique favorable des RE les trois premières années qui n'existe plus après 3 ans (60). La présence de récepteurs hormonaux prédit une croissance tumorale plus indolente, ralentie avec un temps plus long jusqu'à la récurrence, et donc des récurrences plus tardives (41). En effet, les tumeurs RE+ sont plus différenciées, avec des caractéristiques biologiques moins agressives, et des meilleures données cliniques, indépendantes des autres paramètres pronostiques (61) (62). Ainsi, en corollaire, pour les tumeurs sans récepteurs oestrogéniques (RE=0) ou RE faible (<10 femtomoles/mg), plus « agressives » (62), le bénéfice d'une polychimiothérapie est largement démontré en terme de réduction du risque de récurrence, de mortalité par cancer du sein et décès de toutes causes, sur les données de la méta analyse de l'Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) publiée dans le Lancet en 2008 (63). Cependant, même si les tumeurs

RE+ sont reconnues moins chimio sensibles, le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante n'est pas nul, même si l'amplitude est moindre que pour les tumeurs RE négatives. Ainsi, la dernière méta analyse de *Peto et al*, portant sur 100000 patientes issues de 123 essais randomisés, la chimiothérapie adjuvante séquentielle par Anthracyclines/Taxanes entraîne une réduction relative du risque de récurrence précoce, de toutes récurrences et de mortalité par cancer du sein, largement indépendante de certains paramètres et notamment du statut RE (RE faible ou positif) (64). Ainsi même pour des tumeurs RE fortement positives, les données de survie peuvent être affectées positivement par la chimiothérapie, avec un impact certes moindre que pour les tumeurs moins fortement RE + ou RE-.

**Ainsi, le RE est un paramètre pronostique, prédictif de réponse à l'hormonothérapie mais aussi de chimiosensibilité.** Il doit être utilisé en association avec le statut RP, et également intégré avec tous les autres paramètres histopronostiques dans l'arbre décisionnel. Sa positivité, à elle seule, même forte, n'exclue pas une chimiothérapie cytotoxique.

**Le récepteur à la progestérone RP** est régulé par l'œstrogène et son expression indique une voie RE fonctionnelle et intacte (65) (66). 40% des tumeurs RE positives sont RP négatives (42) (67). La régulation de la voie RP est complexe avec implication d'autres récepteurs de facteurs de croissance. Les tumeurs RE+/RP- expriment des niveaux d'HER1 et HER2 plus élevés et sont plus « agressives » que les tumeurs doublement positives pour les RH (62) (68). L'absence de RP dans les tumeurs RE + est un marqueur d'activation aberrante des voies de signalisation des facteurs de croissance, qui expliquerait ainsi la moindre réponse à l'hormonothérapie et au Tamoxifène notamment (67) (68) (69).

Au delà de leur rôle pronostique, les RE et RP sont de puissants facteurs **prédictifs** du bénéfice de l'hormonothérapie adjuvante, et notamment du Tamoxifène. L'étude du Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group publiée en 1998 dans le Lancet, incluant 37000 femmes montre qu'à 5 ans, le Tamoxifène entraîne une réduction du risque relative de récurrence de 47% et de mortalité de 26% pour les patientes avec une tumeur RE positive (70). La réduction de la mortalité était similaire entre les patientes N0 ou N+. L'hormonothérapie par Tamoxifène se traduit

ainsi par une réduction absolue de la mortalité de 5,6% pour les N0 et de 10,9% pour les N+. Il n'y a bien sûr aucun bénéfice au Tamoxifène chez les patientes RE-.

Les tumeurs RE+/RP- sont considérées comme de phénotype plus « agressifs » avec des récurrences plus importantes et des survies plus courtes (57) (67), et en terme de facteurs prédictifs, prédisent une moins bonne réponse à l'hormonothérapie (57) (67) (68) que les tumeurs positives pour les deux récepteurs.

**Enfin, un 3<sup>ème</sup> sous type, les tumeurs RE-/RP+** sont considérées comme une entité bien distincte cliniquement et biologiquement des tumeurs RE+/RP-. Elle ne représenterait que 10% des tumeurs RH+, voire moins selon les études plus récentes (0,2 à 2% des cancers du sein au total), avec l'amélioration de la sensibilité des techniques d'IHC de mesure du récepteur RE ou le recours à la qPCR (mRNA de RE et PR) (57). L'existence de cette entité est controversée, affirmée par certains (71) mais réfutée par d'autres, liée à des faux négatifs de RE (72). *Dowsett et al* ont ainsi démontré que ces tumeurs RE-/RP+ pourraient bénéficier de l'hormonothérapie adjuvante à l'instar des tumeurs double négatifs (RE-/RP-), mais cet effet de l'hormonothérapie pourrait être en réalité lié à des RE faussement négatifs (73).

Les tumeurs double négatives, soit **RH négatives, sont le 4<sup>ème</sup> sous type tumoral,** les plus agressives, avec l'absence de réponse à l'hormonothérapie adjuvante (57). Elles sont un critère validé de chimiothérapie adjuvante (21).

Au total, tous ces éléments sont des critères qui vont peser en 1<sup>ère</sup> intention dans l'indication de l'hormonothérapie adjuvante bien entendu, mais aussi pour l'indication de chimiothérapie. Avec la combinaison de RE et RP, 4 sous groupes de tumeurs existent :  **doubles RH+, (RE+/RP+), les simples RH+ (RE+/RP-) et (RE-/RP+) et les doubles RH- (RE-/RP-).** Les cancers du sein peuvent être ainsi « classifiés » de façon schématique et simplifiée dans cet ordre pronostique de bon à mauvais pronostic : RE+/RP+ > RE+/RP- > RE-/RP+ > RE-/RP- et la combinaison des deux RE et RP permet de mieux identifier les différents variants de cancers du sein que RE ou RP isolément (57).

- **Les tumeurs doubles RH+ représentent le 1<sup>er</sup> sous type tumoral** et la majeure partie des cancers du sein (55-65%). Elles arborent le meilleur pronostic, avec un risque de mortalité moindre que les trois autres sous groupes (62) et une très bonne réponse à l'hormonothérapie (75-85%) (57). De ce fait, elles sont associées à un moindre bénéfice de la chimiothérapie adjuvante, mais qui n'est pas nul pour autant (64).
- **Les tumeurs doublement négatives (RE-/RP-) représentent le 2<sup>ème</sup> groupe** avec 18-25% des cas de cancer du sein, et font partie des critères de la conférence de consensus de Saint Gallen comme motivant la réalisation de la chimiothérapie adjuvante (21). En effet, elles sont associées à un taux de récurrence plus élevée, une survie diminuée et l'absence de réponse à l'hormonothérapie (57).
- **Enfin, les cancers du sein avec un seul récepteur hormonal positif, soit RE+/RP-(12-17%) ou RE-/RP+(1-2%)** sont le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> groupe de cancers du sein, dont la signification reste encore mal comprise. Le pronostic est moins favorable (62)(67), avec une « possible » moindre réponse à l'hormonothérapie (40% de réponse à l'hormonothérapie vs 75-85% pour les doubles RH+), qui doit être intégrée dans la décision thérapeutique (57).

De plus, les RH sont utiles car combinés aux autres facteurs, HER2 et le Ki67 pour définir les sous types moléculaires (Luminal A, B, HER2 enrichi, Basal Like) qui orientent également l'indication de chimiothérapie adjuvante. En effet, la combinaison de RE/RP/Ki67 a été validée par la conférence de consensus de Saint Gallen comme pouvant se substituer à la biologie moléculaire pour la définition du statut Luminal A ou B (21). Leur connaissance est donc cruciale pour l'établissement du pronostic et la discussion du traitement adjuvant.

## 7. Statut HER2

HER2 est le 3<sup>ème</sup> élément fondamental dans la détermination du pronostic et la balance décisionnelle thérapeutique. L'importance clinique de l'amplification de HER2 dans le cancer du sein est connue depuis 1987 (68). L'amplification du gène HER2 ou la surexpression de la protéine HER2 a en effet une double valeur pronostique et prédictive de l'efficacité de la thérapie ciblée anti-HER2 par

Trastuzumab (Herceptin). La « positivité » de HER2 est retrouvée dans 13-20% des cancers du sein invasifs, et plus de la moitié (55%) de ces tumeurs sont récepteurs hormonaux négatifs (75) (74). L'expression de HER2 montre ainsi une relation inverse avec celle de RE et RP (76).

**Concernant sa valeur pronostique**, de nombreuses et conséquentes études ont bien démontrées que l'amplification/ la surexpression de HER2 était associée à un mauvais pronostic et de faible réponse à la chimiothérapie cytotoxique conventionnelle (77) (78) (79) (80). La valeur pronostique de HER2 est forte en cas d'atteinte ganglionnaire N+ (agressivité tumorale plus forte, augmentation des taux de récurrence, majoration de la mortalité) alors que son influence chez les patientes indemnes d'envahissement ganglionnaire N0 est plus variable (moindre PFS globale et PFS à distance, avec survie spécifique au cancer du sein plus médiocre (81) (82) (83) (84).

**Concernant sa valeur prédictive**, la détermination du statut HER2 positif est un prérequis fondamental à la prescription des thérapeutiques anti-HER2, en métastatique (85) comme en adjuvant (86), car celles-ci ayant démontrées un bénéfice dans les essais cliniques que chez les patientes avec une surexpression ou une amplification génique de HER2 (85) (86) (87). L'association du Trastuzumab à la chimiothérapie cytotoxique réduit de moitié le risque récurrence comparée à la chimiothérapie seule. **Ceci se traduit par une amélioration absolue de la PFS à 3 ans de 10% et de la survie globale de 3% à 3 ans** (88) (89) (90). Selon les critères de l'ESMO, le statut HER2 est un critère de chimiothérapie adjuvante dès qu'une surexpression ou une amplification de HER2 est retrouvée pour les tumeurs N+, les tumeurs N0 de plus de 1cm, mais doit être considérée également pour les tumeurs de petite taille de moins de 1cm (T1a-T1bN0) au regard des autres paramètres, notamment si RE -, en raison d'un risque de rechute non négligeable (29).

Ainsi, le statut HER2 est facteur pronostique et prédictif validé par l'ESMO, (29) et la conférence de consensus de Saint Gallen, qui l'a intégré avec le grade III, le Ki67 élevé  $\geq 20\%$ , le faible statut hormonal, le statut triple négatif, l'atteinte de plus de 3 ganglions et les scores de récurrences élevés des signatures à 21 ou 70 gènes comme critère indicatif de chimiothérapie adjuvante (21).

## 8. Tumeurs triple négatives : RE- RP- HER2-

10-15% des cancers du sein sont négatifs pour les trois principaux paramètres RE, RP et HER2, et sont appelées tumeurs triples négatives. Il s'agit d'une entité hétérogène avec plusieurs sous types, notamment définies par des caractères morphologiques, des présentations cliniques, des données pronostiques différentes. Ainsi par exemple, les tumeurs basales like, sont une de ces sous entités de tumeurs triples négatives, exprimant les cytokératines des cellules basales ou myoépithéliales (CK5/6 et 14). Le spectre des tumeurs triples négatives, incluant les basal like est large, avec un pronostic péjoratif, sans traitement ciblé actuellement. Il regroupe également les cancers du sein liés aux mutations germinales de BRCA1 (42).

**Le statut triple négatif est un critère de St Gallen de chimiothérapie adjuvante (21).**

## C. Procédure automatisée : Adjuvant OnLine (AOL)

Adjuvant ! Online ([www.adjuvantonline.com](http://www.adjuvantonline.com)) est un programme informatique en ligne sur internet qui permet d'évaluer le pronostic individuel de chaque patiente présentant un cancer du sein.

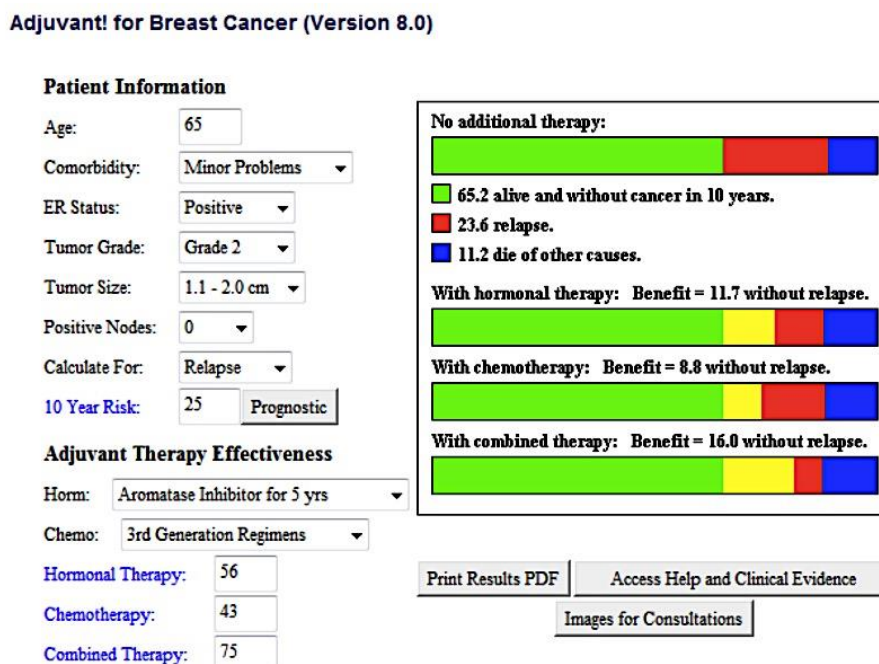
Il constitue un outil pour les indications difficiles de chimiothérapie adjuvante : petites tumeurs, N0, sujet âgé >70 ans, tumeurs hormonosensibles RH+ avec N1-3. Il estime le risque de rechute et de décès dans les 10 ans qui succèdent le traitement, sans traitement, donc estime le pronostic et avec un traitement médical adjuvant (chimiothérapie et hormonothérapie adjuvante) donc le bénéfice attendu du traitement. Les paramètres qui sont intégrés dans ce logiciel d'analyse sont : l'âge de la patiente au moment du diagnostic de cancer du sein, la présence de comorbidités et sur le plan carcinologique : la **taille** de la tumeur (de 0,1 à 1 cm, de 1,1 à 2 cm, de 2,1 à 3 cm, de 3,1 à 5 cm et >5 cm. **Le grade** de la tumeur, **la statut des récepteurs aux oestrogènes**, **le nombre de ganglions axillaires envahis** (0, 1 à 3, 4 à 9 et plus de 9 ganglions envahis) sont également intégrés dans l'analyse.

Le logiciel a été construit en 1995 et publié dans le JCO en 2001 par *Ravdin et al* sur une cohorte de patientes issues base de données de surveillance

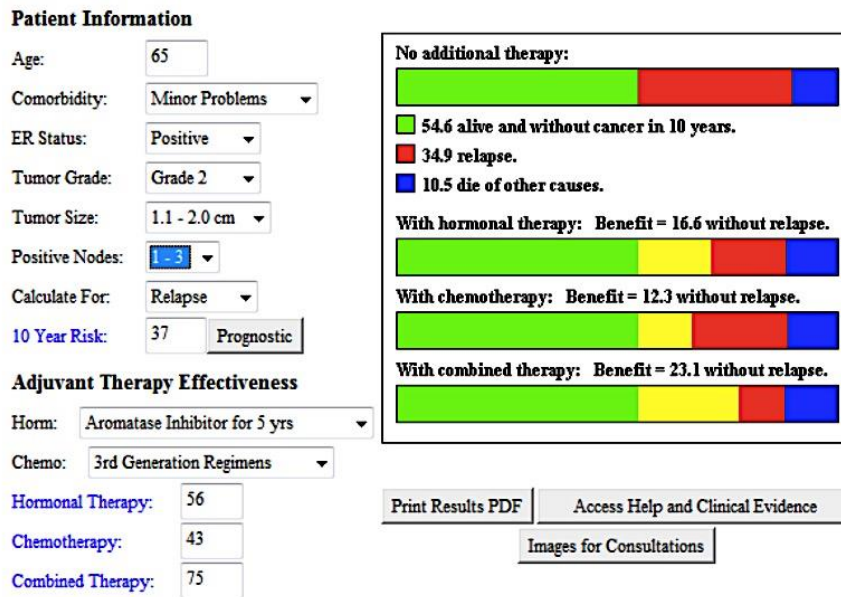
épidémiologique américaine, la base SEER entre 1988 et 1992 (91). Dans cette cohorte, les patientes étaient âgées de 36-59 ans, bénéficiaient toutes d'une d'un curage axillaire (>6N) et d'une radiothérapie après chirurgie conservatrice. Les données de la méta analyse de l'EBCTCG permettaient d'évaluer la réduction de risque de rechute et de décès apportée par les traitements adjuvants (Tamoxifène, CMF, protocole avec anthracyclines mais sans taxanes).

Les limites pour l'évaluation de l'effet du traitement sont liées au fait que cette méta analyse inclut des études anciennes, sans documentation du pourcentage de positivité des RE et RP (uniquement + ou -), ni considération du statut HER2, avec très peu de patients de plus de 70 ans inclus. Compte tenu des ces conditions de développement, AOL ne peut ainsi être utilisé que en cas de carcinome canalaire infiltrant et en situation adjuvante uniquement.

**Les figures 4. 5. 6.** illustrent des exemples de taux de rechutes et de survies attendues en fonction des caractéristiques cliniques et tumorales ainsi que le gain absolue apporté par la chimiothérapie seule, l'hormonothérapie seule ou l'association des deux.

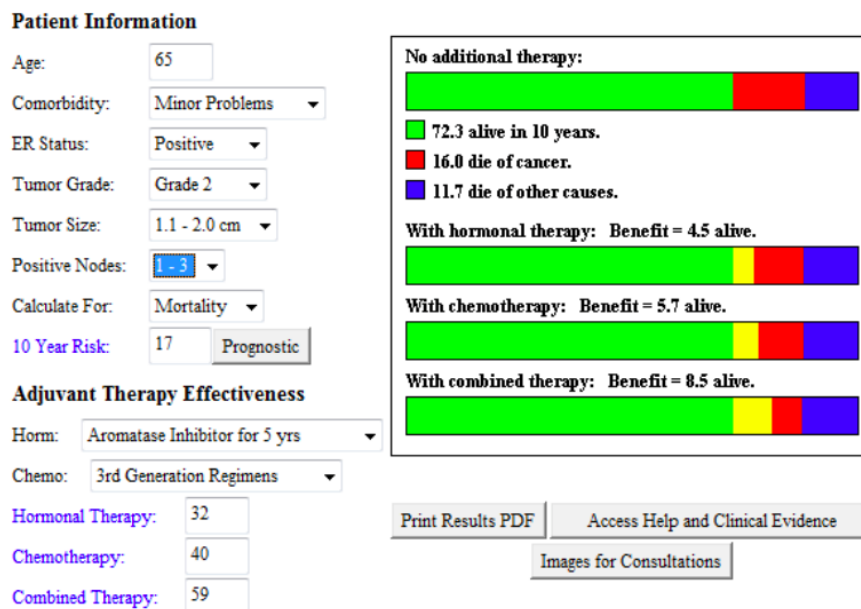


**Figure 4.** Exemple d'estimation du taux de rechute attendu sans traitement à 10 ans en cas de tumeurs de stade pT1cpN0M0G2RE+ : 23,6% et du bénéfice attendu avec un traitement adjuvant, par HT ou CT seul ou association combinée des deux.



**Figure 5.** Exemple d'estimation du taux de rechute attendue à 10 ans sans traitement en cas de tumeurs de stade pT1cpN1-3M0G2RE+ : 34,9% et du bénéfice attendu avec un traitement adjuvant, par HT ou CT seule et association combinée des deux.

Adjuvant! for Breast Cancer (Version 8.0)



**Figure 6.** Exemple d'estimation du taux de survie attendue à 10 ans sans traitement en cas de tumeurs de stade pT1cpN1-3M0G2RE+ : 16% de décès par cancer et bénéfice attendu en survie avec un traitement adjuvant par HT ou CT seul, et association combinée des deux.



Plusieurs études de validations rétrospectives d'AOL ont été réalisées sur des cohortes de patientes issues de différentes institutions (British Columbia Agency Breast cancer Unit database, du Churchill Hospital d'Oxford, du Netherlands Cancer Institute, l'international Breast Cancer Study Group ...etc.) en comparant les estimations de survie et la survie réelle. Celles ci ont mis en évidence les limites d'AOL, avec une mauvaise estimation du pronostic en cas d'âge <35 ans, ou >75 ans associés à des facteurs additionnels de mauvais pronostic comme les embols vasculaires (92) pour la version 5 d'AOL, une estimation trop optimiste de plus de 10% de la survie globale sur la population anglaise (93), une surestimation du pronostic chez les femmes jeunes <40 ans ou >70 ans dans la population néerlandaise (version 8) dans l'étude de *Mook et al.* (94). AOL a été étudié spécifiquement dans une population de plus de 2000 sujets âgés de plus de 70 ans et se révèle être non applicable dans cette population, surestimant la survie globale et sans récurrence à 10 ans de 10% en moyenne (95). Les limites d'AOL sont liées au fait que le calcul du risque et de l'effet du traitement sont basés sur des données insuffisantes, que la validité d'AOL dans différentes régions avec des traitements différents est questionnable, mais aussi que l'effet de l'hormonothérapie a tendance à être sous estimé.

Enfin et surtout, Adjuvant On Line ne prend pas en compte des facteurs biologiques plus récents et fondamentaux qui ont clairement démontrés leur valeur pronostique et prédictive tel HER2, le Ki67 et les récepteurs hormonaux (% de positivité de RE et RP, intensité ...) et qui sont utilisés en pratique courante. Ces imperfections doivent être connues afin d'utiliser AOL à bon escient. Une étude menée à l'Institut Curie par *Hajage et al* sur un peu moins de 500 patientes a essayé de déterminer si la précision d'AOL pouvait être améliorée en y adjoignant le statut HER2 et les marqueurs de prolifération. Cette étude a confirmé l'estimation correcte d'AOL dans la population globale de l'étude, mais une estimation trop optimiste dans les populations de mauvais pronostic : âge jeune <40 ans, haut grade, surexpression de HER2. L'adjonction des paramètres Ki67, index mitotique et statut HER2 apportait une information significative à l'estimation pronostique d'AOL seul (96). De la même manière, l'adjonction du Ki67 améliore les performances pronostiques par rapport à AOL seul dans une étude coréenne (97).

D'autres outils ont été développés, notamment les signatures moléculaires comme Oncotype DX, Mammaprint, le marqueur UPA-PAI1 qui semblent apporter davantage d'information pronostique et prédictive, mais sont pour autant sous utilisés, en partie pour des raisons de coût et de contraintes techniques. En effet, deux études ont comparé l'évaluation du pronostic selon AOL à celle des signatures génomiques de type Oncotype DX et Mammaprint. Ces études ont montré que les signatures génomiques reclassées jusque à 25-30% des patientes après évaluation première par Adjuvant OnLine (98) (99), avec une reclassification dans les deux sens : à savoir des bon pronostic selon AOL reclassés en mauvais pronostic et des bons pronostic reclassés en mauvais.

#### **D. Index Pronostique de Nottingham ou NPI**

Il s'agit d'un index utilisé pour évaluer le pronostic après chirurgie de cancer du sein. Trois critères anatomopathologiques sont intégrés dans son calcul : la taille de la tumeur, le nombre de ganglions envahis et le grade histopronostique de la tumeur.

L'index est calculé selon une formule définie de la façon suivante :

$$\mathbf{NPI = (0,2XS) + N + G}$$

S est la taille de la tumeur en centimètres, N est le nombre de ganglions envahies 0=1, 1 à 3=2, et >3=3, G est le grade de la tumeur Grade I=1, Grade II=2 et grade III=3.

L'index calculé est ainsi corrélé à une survie globale à 5 ans qui décroît au fur et à mesure que l'index croit. La survie à 5 ans est de 93% en cas de  $2,0 \leq \text{NPI} \leq 2,4$  et chute à 50% en cas de  $\text{NPI} \geq 5,4$ . Il a été développé initialement en 1982 par *Haybitte J.L et al* à partir d'une analyse multivariée de 9 facteurs pronostiques sur une série de 387 patientes atteintes de cancer du sein. En effet, l'index ainsi construit à partir des trois paramètres restant pronostiques en multivariée était plus discriminant que l'atteinte ganglionnaire seule (100). Sa valeur pronostique a été confirmée secondairement de façon prospective sur une série de 320 patientes (101). Cet index a été validé par *Galea MH et al* en 1992 sur une série de 1629 patientes opérées d'un cancer du sein jusqu'à un âge de 70 ans permettant de séparer les patientes en

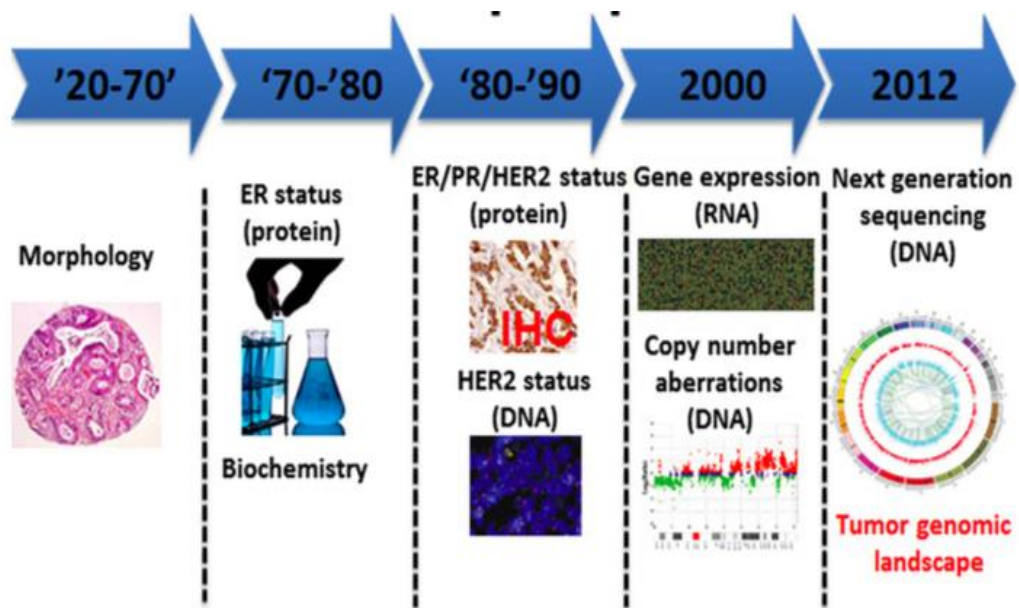
3 groupes pronostiques en fonction de la valeur de cet index : Bon pronostic avec plus de 80% de survie à 15 ans, pronostic intermédiaire avec 42% de survie à 15 ans et mauvais avec 13% de survie à 15 ans (102). Les données ont été révisées avec actualisation des données de survie en 2007 dans l'European Journal Of cancer et permettent de classer les patientes en 5 groupes pronostiques selon le NPI : Excellent, bon, moyen (1 et 2), mauvais, très mauvais (103).

Cependant comme Adjuvant On Line, cet index présente certaines limites, la principale étant l'absence d'intégration des paramètres hautement pronostiques et prédictifs que sont le Ki67, l'expression de HER2 et des RE/RP. Ainsi, *Van Belle V et al* ont démontré dans le JCO en 2010 que l'intégration qualitative du statut RP et HER2 améliorait la performance pronostique du NPI, appelé alors iNPI (104). De la même manière, de façon plus récente, en 2014, *Rakha et al* ont associé les paramètres du NPI donc les critères anatomopathologiques aux profils moléculaires de la tumeur établis en IHC. Cet index de Nottingham, le NPI Plus ou NPI+ améliore l'estimation du pronostic des patientes par rapport au NPI classique (105).

Concernant la comparaison directe entre les deux outils, Adjuvant Online et le NPI, une étude publiée dans BMJ Open en 2015 a évalué de façon comparative leur performance pronostique, en particulier dans la population de patientes jeunes de moins de 40 ans. Sur un peu plus de 100 patientes, il n'y avait pas de différences entre les estimations de survie à 10 ans selon le NPI, AOL et les survies réelles observées (106).

Les paramètres anatomopathologiques classiques restent importants dans l'évaluation du pronostic mais les outils développés comme le NPI ou AOL démontrent ici leurs limites et la nécessité de recourir à d'autres outils décisionnels.

Ainsi nous sommes passées en plusieurs décennies de critères morphologiques (type histologique, taille, atteinte ganglionnaire, grade) à des critères immunohistochimiques ou en FISH/CISH pour RE/RP/HER2, éventuellement combinés au sein de nomogramme, a plus récemment des critères moléculaires pour estimer le pronostic et guider les indications thérapeutiques adjuvantes. Ceci notamment dans des situations de plus en plus complexes pour des petites tumeurs sans atteinte ganglionnaire diagnostiquées par le dépistage systématique (107) **(Figure 7)**.



**Figure 7.** Evolution des facteurs pronostiques dans l'arbre décisionnel thérapeutique adjuvant : de la morphologie à la biologie moléculaire (107).

### E. Sous types moléculaires : impact pronostique et décisionnel.

Le cancer du sein est un groupe hétérogène de maladies, regroupant une grande variété d'entités, traditionnellement définies sur des critères cliniques et histopathologiques encore jusqu'au début des années 2000. Cependant, des tumeurs avec des présentations cliniques et pathologiques similaires ont parfois des « comportements » totalement différents. Ces critères étaient insuffisants pour refléter la complexité des altérations génétiques et des événements biologiques impliqués dans le développement et la progression du cancer. La « révolution des puces d'expressions géniques » ou micro-arrays en 2000 a non seulement amélioré

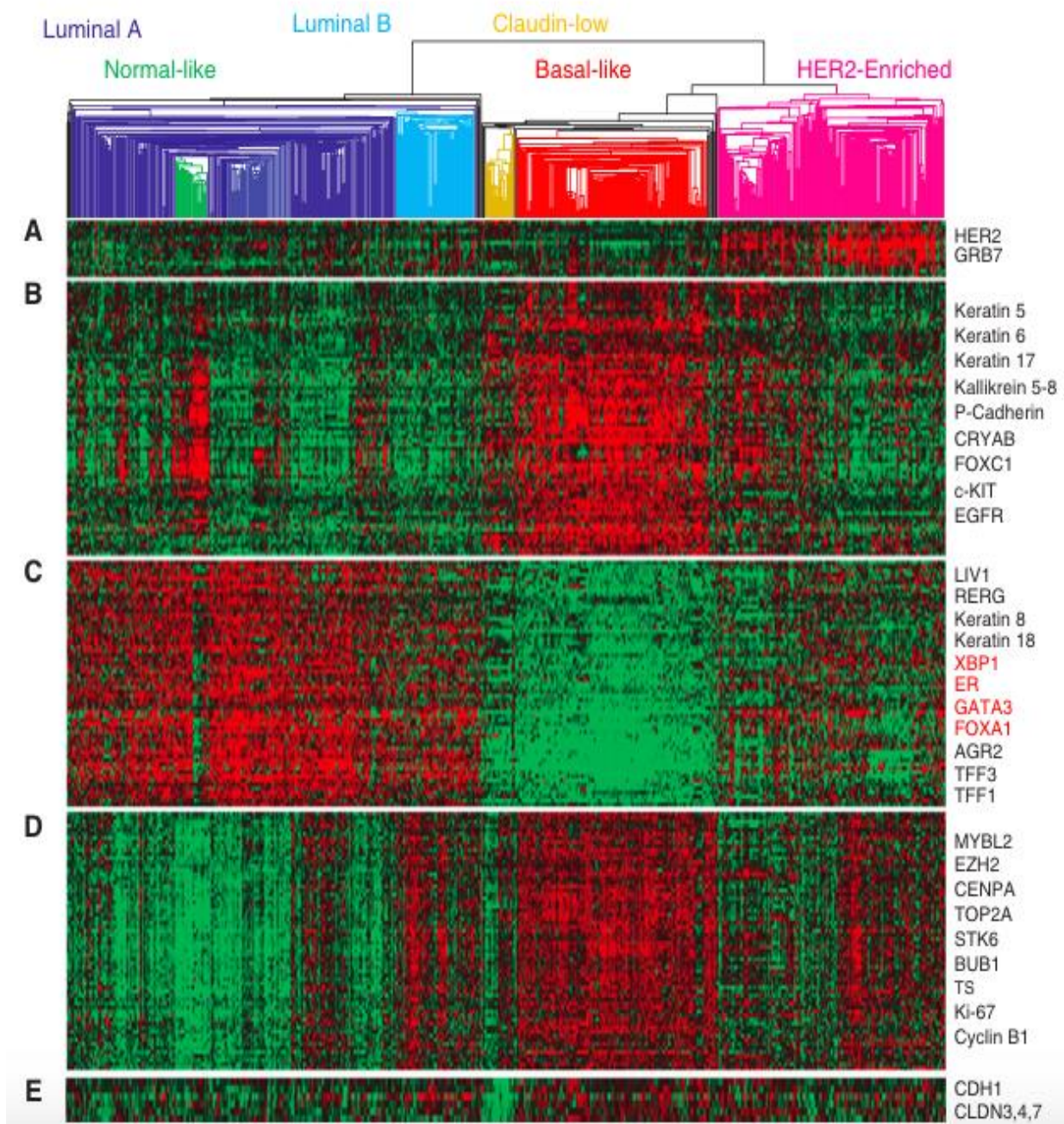
la connaissance de la biologie du cancer du sein, mais aussi et surtout a permis d'établir de nouveaux paramètres moléculaires pronostiques basés sur **les profils d'expressions (mRNA)**. Ceci a abouti dans un 1<sup>er</sup> temps à une nouvelle classification, la classification moléculaire de Pérou, pronostique, puis secondairement au développement de signatures géniques pronostiques et prédictives de l'efficacité de la chimiothérapie. Ceci permettant une personnalisation des traitements, notamment pour les situations d'indication difficile, pour lequel le bénéfice formel ne peut être établi sur les critères usuels seuls.

La « révolution génomique actuellement en cours » révèle la base de l'hétérogénéité tumorale du cancer du sein, à l'échelle du génome et au delà. En effet, les techniques ne sont plus limitées à l'ADN, l'ARN mais plus globale (méthylome, exome, micro ARN, protein arrays), définit sous le terme « multi-omic ». Cependant, elles sont pour l'instant sans application en routine, notamment pronostique et ou prédictive pour la chimiothérapie adjuvante.

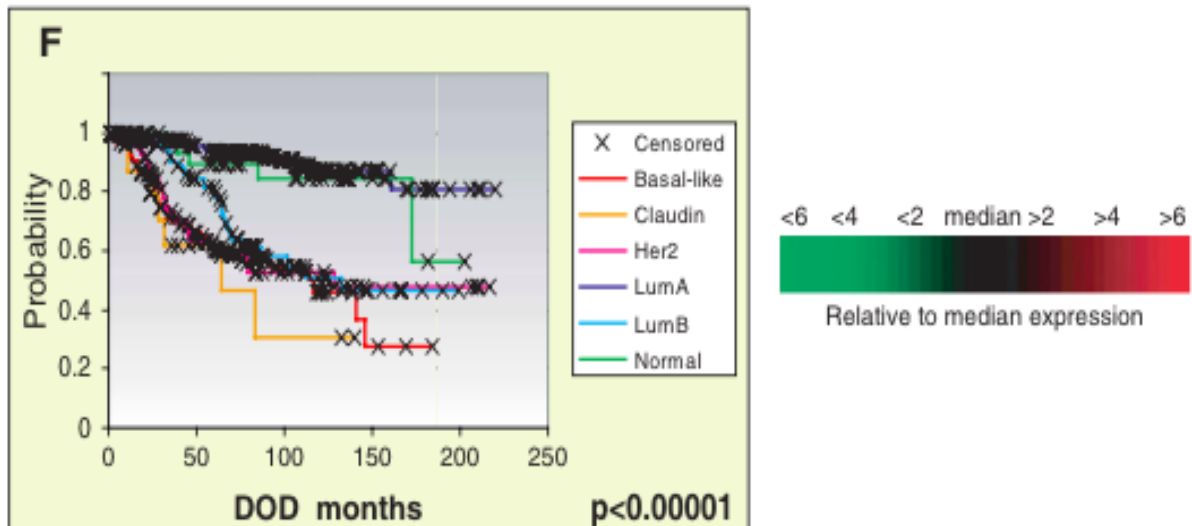
## 1. Classification moléculaire de Pérou

En effet, une avancée majeure de ces deux dernières décades a été celle de la découverte des sous types moléculaires du cancer du sein grâce aux micro-puces d'expression génique avec initialement quatre sous types identifiés : Luminal A, luminal B, HER2 enrichi, basal like, et normal like, publiée par *Pérou et al* dans Nature en 2000 (108).

L'identification de ces sous types moléculaires est en fait dichotomisée en deux branches principales, déterminée par l'expression des gènes en rapport avec RE+ ou RE-. D'autres sous types moléculaires ont été secondairement identifiés (**Figure 8.**) Cette classification moléculaire est directement corrélée au pronostic et à la survie des patientes (**Figure 9.**)



**Figure 8.** Exemple de profiling moléculaire de 677 cancers du sein par clustering hiérarchisé effectué par *Benito et al* en 2004 sur 340 échantillons de l'UNC et 377 du Netherlands Cancer Institute : analyse clustérisée retrouvant les 5 sous types majeurs de cancers du sein (109).



**Figure 9.** Corrélation aux données de survie globale pour 470 tumeurs en fonction des 5 sous types majeurs et le nouveau sous type défini ultérieurement Claudin Low (109).

**En effet, les tumeurs RE+ positives** correspondent aux tumeurs dénommées « Luminales ». 75% des cancers du sein sont RH+ (RE et /ou RP). Les cancers du sein luminaux présentent les caractéristiques des cellules luminales mammaires normales : expression de gènes régis par RE, expression des cytokératines luminales et autres marqueurs luminaux. Deux types de tumeurs luminales existent, les Luminal A et B, se démarquant par une expression différente des gènes relatifs à la prolifération cellulaire.

- **Les tumeurs luminal A**, sous type moléculaire le plus fréquent, (50-60%) sont de bas grade, avec un faible pléomorphisme nucléaire, un index de prolifération bas, des RP toujours positifs, l'absence d'expression d'HER2. Elles sont caractérisées par des niveaux élevés d'expression des gènes en rapport avec RE et un faible niveau d'expression des gènes de prolifération. Les tumeurs Luminal A sont associées à de meilleures survies comparativement à tous les autres sous groupes, la majorité des tumeurs de ce groupe étant de bas grade (108) (110) (111) (112), avec un taux de rechute moyen de 27,8%, significativement plus bas que les autres sous types (113). De plus, la survie à la récurrence est prolongée avec une médiane à 2,2 ans. La

récidive est fréquemment osseuse, avec moins de 10% d'atteintes viscérales métastatiques viscérales (foie, cerveau, poumon) (113). L'incidence des métastases osseuses est de l'ordre de 18,7% (113).

- **Les tumeurs Luminal B**, sont quant à elle moins fréquente (15-20%), de grade histologique plus élevé, avec parfois l'absence ou l'expression faible des RP, l'amplification ou la surexpression possible d'HER2, mais avec un index de prolifération Ki67 toujours élevé (114). Le Ki67 est le principal critère discriminant des tumeurs Luminal A versus Luminal B avec un seuil fixé par la conférence de Saint Gallen à 14%. Concernant les RP pour différencier les 2 entités, le seuil est placé à 20%. Ces deux entités diffèrent dans leur complexité génomique, dans les altérations génétiques clefs et surtout dans leur pronostic (115) (116) (110). Les tumeurs lumineales B montrent une expression augmentée des gènes de récepteurs de facteurs de croissance (117). Elles sont de plus mauvais pronostic (118), avec des récurrences plus fréquentes et différentes, et une survie plus péjorative que les tumeurs luminal A (119).

Même si comme les lumineales A, les métastases osseuses sont le site de récurrence métastatique le plus fréquent (30%), il existe une incidence de métastases viscérales plus élevée, de l'ordre par exemple de 13,8% au niveau hépatique (113). Le délai médian de survie à la récurrence est plus court de l'ordre de 1,6 ans(113).

**Les tumeurs RE- sont plus variées** et se répartissent en 3 principaux sous groupes moléculaires : les HER2 enrichi, les normal breast like et les basal like.

- **Le groupe des tumeurs HER2 enrichi** représente 15-20% des cancers du sein et sont caractérisés par un haut niveau d'expression du gène HER2 et d'autres gènes associés à la voie HER2 ou des gènes liés à l'amplicon d'HER2 sur le chromosome 17q12. Ces tumeurs sont morphologiquement proliférantes, de grade histologique et nucléaire élevée. Il existe un recouvrement incomplet entre la définition moléculaire et clinique des tumeurs HER2. En effet, toutes les tumeurs définies en IHC comme HER2 ne sont pas incluses dans le cluster moléculaire HER2 : certaines tumeurs HER2+/RE+



« tombent » dans le cluster Luminal B et d'autre HER2+/RE- dans le cluster basal like (120). Inversement, 70% des tumeurs clustérisées en HER2 sur le plan moléculaire n'expriment pas HER2 en IHC. Il existe ainsi différents sous types de tumeurs HER2 enrichi avec des données cliniques différentes (121) et des réponses différentes à la chimiothérapie (122).

- **Le groupe normal-like (5-10%)** se caractérise par l'expression de gènes associés au tissu adipeux et à d'autres cellules stromales. L'existence même de ce groupe est controversée car selon certains auteurs, potentiellement liée à la contamination par des cellules normales, plutôt qu'un réel sous type moléculaire en soi. Elles n'expriment pas RE/RP/HER2, classées donc comme tumeur triple négative mais non considérées comme basal like (CK5 et EGFR négatifs). Peu d'études existent pour ce sous type et la signification clinique reste à déterminer.
- **Le sous type basal like**, montre la plus grande diversité des trois « sous types moléculaires » de type RE- au regard de plusieurs paramètres : histologiques, profil mutationnel, réponse à la chimiothérapie, comportement métastatique et données de survie (115) (110) (112) (113) (123) (124) (125) (126) (127). Il représente de **8 à 37%** des cas de cancers du sein en fonction de la proportion de grade 3 inclus dans cette catégorie selon les études (128). Comme leur nom l'indique, elles expriment des caractéristiques des cellules myoépithéliales basales mammaires normales (cytokératines basales, RE-). Ce sous type est marqué par l'expression de cytokératines CK5-6 et CK14, conjointement avec EGFR, c-KIT, FOXC1, un index de prolifération élevé et des mutations fréquentes de TP53 (129). Elles appartiennent à la catégorie des tumeurs dites triples négatives (RE/RP/HER2-) qui sont de définition histologique, alors que les tumeurs basal-like sont bien de définition moléculaire. Des marqueurs immuno-histochimiques, sans pour autant de consensus international validé, peuvent être utilisés en alternative pour la définition des tumeurs basal like (130). Ces tumeurs sont essentiellement de grade 3, de mauvais pronostic avec des rechutes précoces et métastatiques, et représentent  $\frac{3}{4}$  des cancers liés aux mutations germinales de BRCA1. Il existe une grande multiplicité des tumeurs triples négatives et basal like, avec

des réponses différentes à la chimiothérapie (131). *Lehmann et al* ont ainsi analysés l'expression des gènes de plus de 500 tumeurs triples négatives et ont identifié au moins 6 sous types de tumeurs triples négatives : les basal like (BL1 et BL2), les tumeurs immunomodulatrices (IM), mésenchymateuses (M), de type cellules souches mésenchymateuses (MSL) et Luminal à récepteurs à androgènes (LAR) (132).

Depuis la classification initiale de *Pérou et al*, d'autres sous types ont été identifiés : **le sous type Claudin-Low, molecular apocrine et le groupe relatif à l'interféron.**

- **Le cluster « Claudin-Low »** est caractérisé par la faible ou l'absence d'expression des marqueurs luminaux, un enrichissement des marqueurs de la transition épithelio-mésenchymateuse, des gènes de la réponse immunitaire et des cellules aux caractéristiques de cellules souches (133). Le nom « claudin Low » est lié à la faible expression des gènes impliqués dans les jonctions serrées et les adhésions cellulaires portant sur la claudin 3,4,7, occludin, E-Cadherin. Elles sont souvent triples négatives, avec un enrichissement dans ce groupe par des carcinomes métaplasiques et des tumeurs à différenciation médullaire-like. Les courbes de survie et le pronostic sont intermédiaires entre les tumeurs lumineales et basal like (133).
- **Les tumeurs « molecular apocrine »** regroupent des tumeurs RE-, AR+ et aux caractéristiques histologiques apocrines (cytoplasme éosinophile abondant et nucléole proéminent) (134). Elles montrent souvent une expression ou amplification de HER2. Ces tumeurs sont associées à des rechutes précoces mais cliniquement une bonne réponse à la chimiothérapie néoadjuvante (96).
- **Enfin le sous type lié à l'interféron** est marqué par une forte expression de gènes régulant l'interféron comme (STAT1) (112). La signification complète de ce sous type tumoral reste encore à déterminer.

Enfin, il convient de noter que cette classification moléculaire est basée sur des puces d'expression mais est actuellement substituée par l'immunohistochimie en pratique courante en raison du coût et du temps imputé à la biologie moléculaire.

Cette substitution est validée par la plupart des groupes, y compris par la conférence de consensus de Saint Gallen (21). RE, RP et HER2 et le Ki67 sont les 4 éléments critiques qui vont permettre de réaliser cette classification moléculaire pronostique sans passer par la technique des micro-arrays. Ce quadruple panel en IHC ou (IHC4 score) a déjà démontré son utilité clinique (135) (136). L'addition de CK5-6 et de EGFR au panel est utile pour identifier les basal like (137). Les caractéristiques principales des sous types moléculaires sont résumées dans la **figure 10.** (138).

Characteristics of molecular subtypes of breast cancer

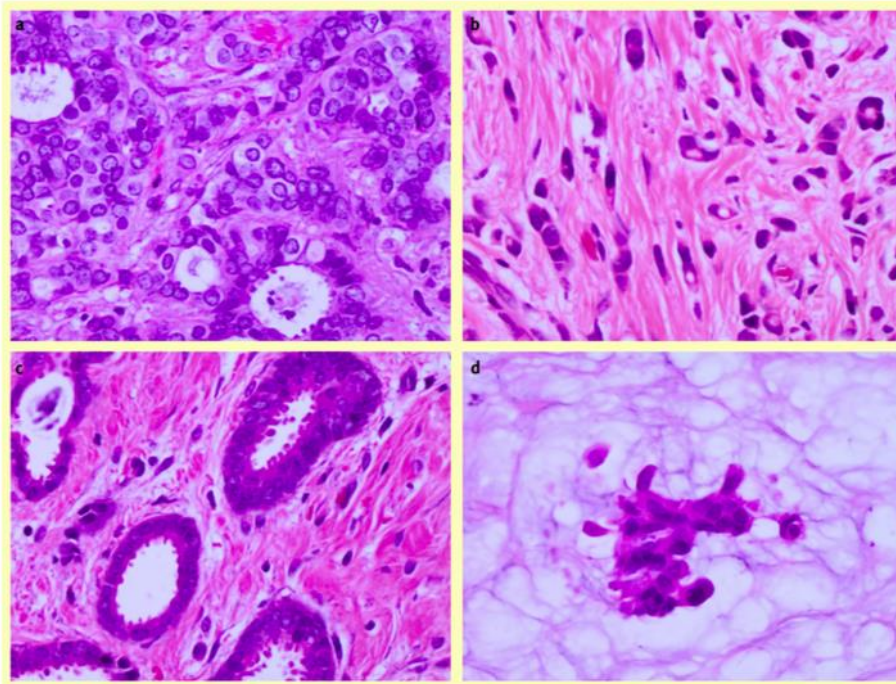
ER division	Molecular Subtype	HER 2 by IHC/ISH	Ki-67 IHC	Histological Grade	Additional features	Common histological types	
ER-positive	Luminal A <sup>a</sup>	HER2–	Low	1 or 2	Luminal cytokeratin +; E-cadherin +/-	IDC-NST; classic lobular; tubular; mucinous; neuroendocrine; Cribriform	
	Luminal B <sup>a</sup>	HER 2–/+	High	2 or 3	Luminal cytokeratin +; TP53 mutations	IDC-NST; micropapillary	
ER-negative	HER2	HER2+	High	2 or 3	TP53 mutations	IDC-NST; apocrine; micropapillary; pleomorphic lobular	
	Basal-like	HER2–	High	3	Basal cytokeratin +; TP53 mutations; DNA repair loss; EGFR +/-; KIT +/-	IDC-NST; medullary; metaplastic; adenoid cystic; secretory	
	Molecular apocrine	HER2–	High	2 or 3	Androgen receptor +	IDC-NST; apocrine; pleomorphic lobular	
	Claudin-low	HER2–	High	3	Cancer stem cell-like; EMT-like; E-cadherin low	IDC-NST; medullary; metaplastic	
	Interferon-related		HER2–	High	3	STAT1	IDC-NST; medullary

Here the most frequent molecular subtypes are given for each special type and also, the most likely ER, HER2 and Ki-67 profile.

<sup>a</sup> Luminal A and luminal B tumours may represent part of a continuum rather than discrete subgroups.

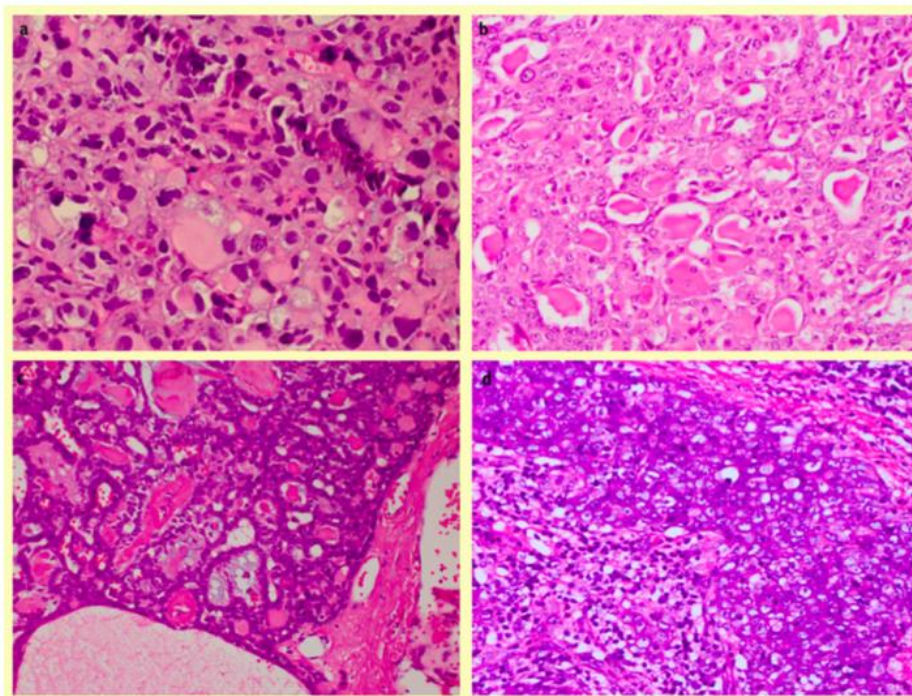
**Figure 10.** Caractéristiques principales des sous types moléculaires du cancer du sein sur le plan du statut RE, HER2, du grade SBR, des cytokératines, du statut p53 et du sous type anatomopathologique (138).

Enfin et surtout, il n'existe pas de recoupement exact entre type anatomopathologique et classification moléculaire. Ainsi, les tumeurs classées Luminal A d'un point de vue moléculaire peuvent regrouper plusieurs entités anatomopathologiques (carcinome canalaire, lobulaire, tubuleux, ou encore mucineux) (**Figure 11.**), tous comme les Basal Like (carcinome métaplasique, sécrétoire, médullaire, adénoïde cystique montrant la complexité des classifications et l'absence de recoupement entres elles (**Figure 12.**).



**Figure 11.** Différents aspects histologiques de tumeurs classées sur le plan génomique en Luminal A.

a) CCI de grade II, b) CLI classique, c) carcinome invasif tubuleux d)carcinome invasif mucineux (138).



**Figure 12.** Différents aspects histologiques de tumeurs classées sur le plan génomique en Basal Like.

a) carcinome métaplasique b) carcinome sécrétoire c) carcinome adénoïde cystique d) carcinome médullaire (138).

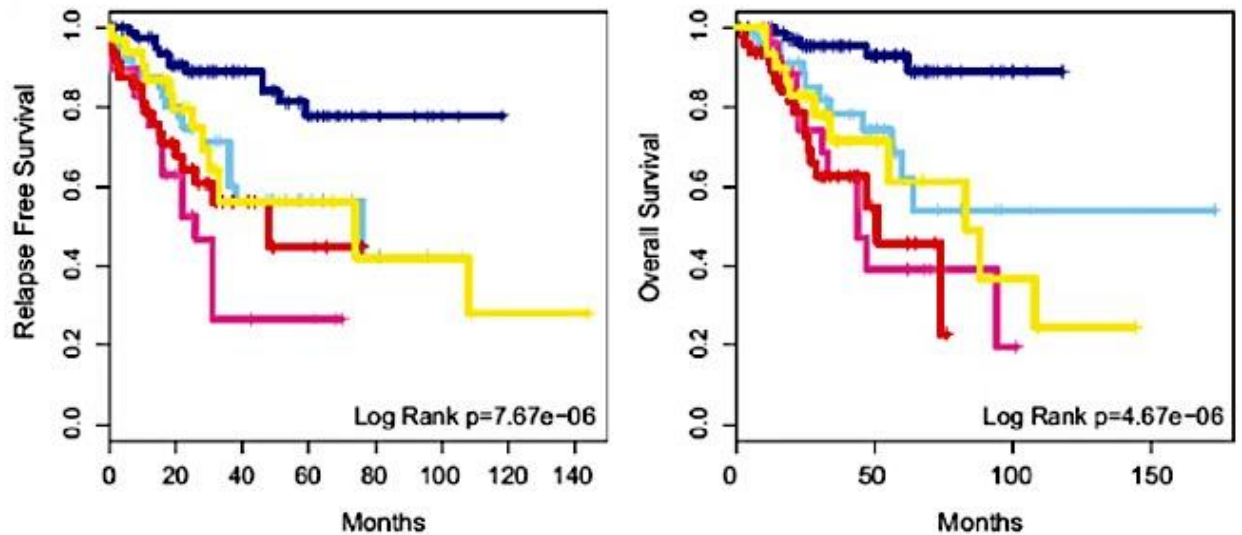
## 2. Impact pronostic, implications thérapeutiques adjuvantes et limites.

### a) Impact pronostic

La classification moléculaire de Pérou a un impact pronostic démontré et constitue une aide pour orienter les indications de chimiothérapie adjuvante. Le cancer du sein de type Luminal A présente un très bon pronostic comparativement à tous les sous types moléculaires avec un traitement adjuvant essentiellement basé sur l'hormonothérapie (113) (139). Les cancers de type Luminal B ont des taux de récurrences plus élevés et des survies moindres que les Luminal A (119). Leur survie globale est, en l'absence de traitement, sensiblement équivalentes aux tumeurs basal like et aux tumeurs HER2 enrichies (112).

Enfin, certaines études montrent que tumeurs les Luminal B sont moins sensibles à l'hormonothérapie que les Luminal A, mais répondent davantage à la chimiothérapie néoadjuvante notamment. Les tumeurs HER2 enrichies, ont en l'absence de traitement un mauvais pronostic. Elles ont une résistance relative à l'hormonothérapie, une sensibilité majorée aux cytotoxiques comme la doxorubicine (lié potentiellement à la co-amplification du gène de la topo isomérase près du locus de HER2), et une propension à la dissémination métastatique cérébrale et viscérale (140). Les tumeurs Basal like arborent une « comportement » clinique agressif avec des disséminations métastatiques cérébrales et pulmonaires très fréquentes (140) et un pronostic péjoratif (110).

Les survies globales comme sans récurrence diffèrent de façon nette entre ses différents sous types tumoraux, comme le montre à titre d'exemple les analyses de survies sans récurrence et globale en fonction des sous types moléculaires sur la base de données UNC 337 (**Figure 13**) (141)

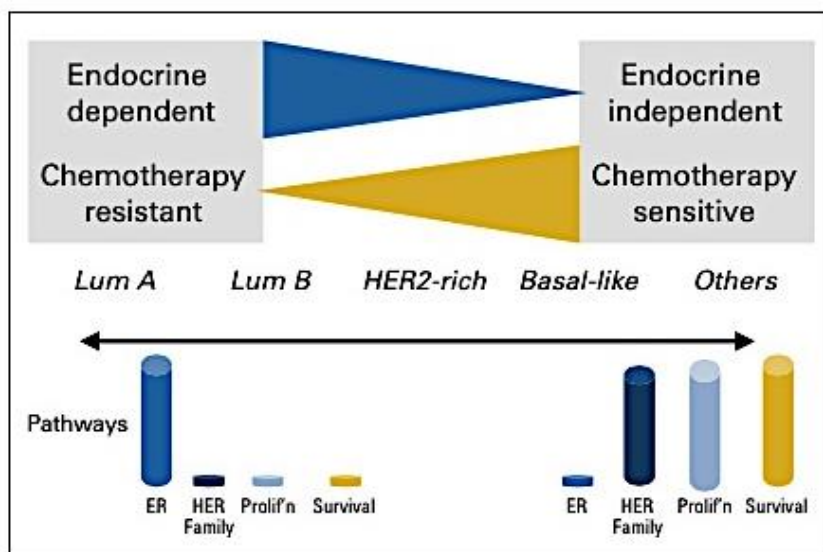


**Figure 13.** Courbes de survie sans récurrence (RFS) et globale (OS) en fonction du sous type moléculaire selon la base de données UNC 337.

En bleu foncé : Luminal A, Bleu clair : luminal B, rouge : basal-like, rose : HER2 enrichie, Jaune : Claudin Low (141).

**b) Impact prédictif : influence du statut moléculaire sur les décisions de traitement adjuvant**

Schématiquement, il existe un lien entre les différents sous types moléculaires de cancer du sein et la réponse au traitement, à savoir la chimiosensibilité et l'hormonosensibilité attendue de chacun des sous types (**Figure 14.**)

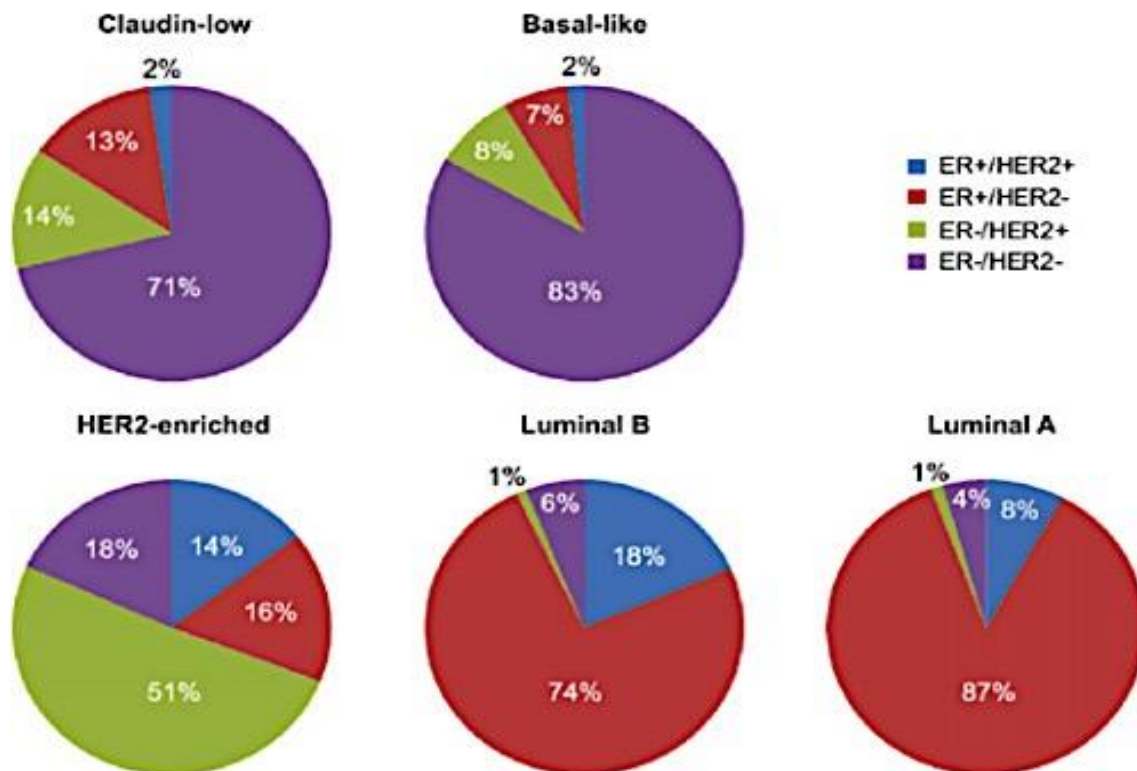


**Figure 14.** Sous types moléculaires intrinsèques du cancer du sein et spectre théorique de sensibilité aux thérapeutiques adjuvantes (126).

Le rôle prédictif de la classification moléculaire sur l'efficacité de la chimiothérapie est démontré, mais surtout pour la chimiothérapie néoadjuvante essentiellement. *Rouzier et al* ont ainsi démontré que les taux de réponse histopathologiques complètes à la chimiothérapie diffèrent en fonction du sous type moléculaire avec respectivement 45% pour les basal-like et HER2 enrichi et 7% pour les tumeurs Luminales (122).

### **c) Limites de la classification et de son impact dans l'arbre décisionnel**

Les implications pronostiques de cette classification moléculaire ont été acceptées par les groupes internationaux. La conférence de consensus de Saint Gallen a ainsi reconnu que les décisions thérapeutiques doivent être basées sur la reconnaissance de ces sous types moléculaires intrinsèques de cancer du sein, ceux-ci influençant l'indication de chimiothérapie mais pas la nature du protocole. Cette sous division en sous type moléculaire a été validée initialement par des micro-arrays mais une approximation de la classification par IHC a été acceptée pour des questions de coût, de temps et de faisabilité en routine, sur la base minimal de 4 marqueurs : RE/RP/HER2/Ki67. Cependant, il s'agit d'une « simplification » du nouveau système de classification moléculaire qui ne peut être considérée comme équivalente. En effet, le recoupement entre la définition du sous type moléculaire par la biologie moléculaire et l'examen anatomopathologique est totalement incomplet : tumeurs HER2 sur le plan moléculaire sans expression de HER2 en IHC, tumeurs HER2 clustérisées en basal like ou en Luminal B, tumeurs basal like sur le plan moléculaire mais RE+ ou HER2+...etc. **La figure 15** illustre la répartition de l'expressions des RE et de HER2 en anatomopathologie en fonction du sous type moléculaire défini par la biologie moléculaire.



**Figure 15.** Discordance entre classification moléculaire et classification anatomopathologique.

Analyse de la répartition de l'expression anatomopathologique des RE et de HER2 en fonction du sous type moléculaire (141).

Ainsi une signature a été développée, la signature **PAM50** ou **Prosigna®**, basée sur la définition par biologie moléculaire des sous types intrinsèques du cancer du sein mais de façon simplifiée et accessible en routine. Il s'agit d'un set de gènes minimaux pour classifier les sous types selon Pérou et Sorlie sur tissu en paraffine, s'étant avérée plus performante que les facteurs cliniques et histopathologiques (RE/RP/Ki67/HER2). PAM50 est un set de 50 gènes avec 5 gènes contrôles, qui calcule un score de récurrence ou (ROR), et identifie un des quatre sous types moléculaires de Pérou (143). Sur le matériel issu de patientes incluses dans l'essai prospectif du NCIC CTG MA.12 (Hormonothérapie par Tamoxifène versus pas d'hormonothérapie chez des patientes pré ménopausées), la capacité à prédire le pronostic des sous types moléculaires identifiés par IHC ou par la signature PAM50 ont été confrontées. La classification en sous type moléculaire par PAM50 est pronostique en survie sans récurrence et globale et prédictive du bénéfice du Tamoxifène chez les patientes N0 comme N+, alors que la classification effectuée



sur les données de l'IHC ne l'est pas (144). Il a bien démontré rétrospectivement sa validité pronostique sur l'analyse combinée de plus de 2400 patientes post ménopausées, RE+, N+ traités par hormonothérapie et semble être utile sur le plan thérapeutique pour identifier les patientes RE+,N+ qui peuvent être dispensées de chimiothérapie adjuvante (145). Ce test, bien que validé par la FDA depuis 2013, est peu utilisé en routine en raison du coût lié à l'équipement et de la nécessité de personnel formé (test décentralisé).

Cependant au final, d'un point de vue informatif, l'impact de la détermination des sous types moléculaires même si elle pourrait réalisée par micro-arrays et non par IHC reste limité. En effet, la plupart des tumeurs luminales sont RH+ et sont identifiées en routine par IHC. Les tumeurs triples négatives, sont de définition immunohistochimique plus pratique et d'application plus facile en routine que les tumeurs dites basal-like, qui peut être identifiées en IHC. Les tumeurs HER2+ ne recevront le Trastuzumab que si la surexpression/l'amplification est démontrée, indépendamment de la classification moléculaire. Même si l'apport pronostique est clair, l'impact en terme décisionnel thérapeutique reste plus limité.

Ainsi en parallèle de cette classification moléculaire des cancers du sein, plusieurs signatures multigéniques, pronostiques et prédictives du bénéfice de la chimiothérapie adjuvante ont été développées. Celles ci constituent de nouveaux outils d'aide décisionnel thérapeutique, néanmoins non encore validés de façon prospective.

## **F. Signatures pronostiques et/ou prédictives**

Le but de ces signatures géniques pronostiques est avant tout d'identifier les sous groupes de patients de bon pronostic qui ne bénéficieront pas en terme de survie d'un traitement adjuvant et donc d'être de nouveaux outils prédictifs. Ceci afin d'éviter le « sous » comme le « sur » traitement. Ainsi, ces signatures pronostiques et/ou prédictives permettent actuellement en pratique courante de réduire d'environ de 33% les indications de chimiothérapie adjuvante, notamment pour Oncotype Dx, à la fois pour les patientes N0 ou N+ (146).

En effet, si on se limite aux critères histopronostiques classiques combinés éventuellement au sein d'un algorithme décisionnel comme Adjuvant online ou l'index pronostique de Nottingham, environ **60% des cancers du sein** de stade précoce seront traités par de la chimiothérapie adjuvante, mais parmi elles seules, **2 à 15%** des patientes bénéficieront en terme de survie de la chimiothérapie, les autres uniquement des effets secondaires toxiques (3) (147). De nombreuses signatures ont ainsi été développées mais les plus abouties et validées en routine sont Mammaprint, Oncotype DX et UPA-PAI1. Celle-ci sont indiquées (car développées) dans des situations spécifiques : Atteinte ganglionnaire N+ ou N0, récepteurs RE+ ou RE- ...etc. Toutes ces signatures ont été établies de façon rétrospective en corrélant les données de micro-arrays à celles de la survie chez des patientes recevant ou non une chimiothérapie et/ou hormonothérapie adjuvante (effet pronostique et ou prédictif).

### 1. Mammaprint ou signature à 70 gènes

Mammaprint est une signature d'expression génique, basée sur la RT-PCR, nécessitant de grande quantité d'ARN, mais surtout, initialement du matériel frais. Elle a été développée par Van de Vijver en 2002, initialement de façon rétrospective sur 78 cancers du sein, **RE+, N0, de moins de 5 cm, chez des patientes <55 ans, ne recevant pas de traitement adjuvant.**

**Sur le plan pronostique,** cette signature assigne les patients soit en haut versus bas risque de métastases à distance à 5 ans. 70 gènes corrélés aux données pronostiques ont ainsi été identifiés, s'agissant essentiellement de gènes de prolifération, d'invasion et d'angiogenèse. Un seuil discriminant en deux groupes pronostiques « bon » ou « mauvais » a ainsi été mis en évidence sur les données de l'expression de ces gènes (148). Cette signature a été validée secondairement sur une 2<sup>ème</sup> cohorte rétrospective de 295 patientes N0 ou N+ et révèle que Mammaprint est un marqueur indépendant du pronostic : la survie globale à 10 ans est de 94,5% en cas de bas risque et chute à 54,6% en cas de haut risque avec un risque relatif de métastases à distance à 10 ans multiplié par 5, restant significatif après ajustement sur l'atteinte ganglionnaire (149). Mammaprint identifierait de façon plus précise les

patientes avec une maladie de bon pronostic que les guidelines du National Cancer Institute ou de la conférence de consensus de Saint Gallen (149) (147).

L'Etude RASTER (Micro-arRAY-prognoSTics-in-breast-cancER), a été la 1<sup>ère</sup> étude qui a évaluée de façon **prospective** la performance **pronostique** de cette signature à 70 gènes. Environ 500 patientes de stade **cT1-3N0M0** étaient traitées ou non par chimiothérapie adjuvante sur plusieurs critères : données clinico-histopathologiques habituels, résultat de la signature Mammaprint, décision du médecin ou du malade. La performance de cette signature est bonne, avec une bonne corrélation aux données de survie sans rechute à 5 ans avec la dichotomisation « bas » ou « haut » risque selon Mammaprint : DFS à 5 ans à distance « bas » versus « haut » risque de 97% vs 91,7% respectivement, alors que pour Adjuvant on line, les DFS pour le groupe bas risque sont de 96,7% et haut risque de 93,4%(150) (151). Cette étude prospective confirme la valeur ajoutée de cette signature à 70 gènes à l'estimation clinicopathologique classique.

La valeur pronostique de ce test a été prouvée par d'autres cohortes indépendantes de cancers du seins en cas de tumeurs N0 dans l'étude de *Buyse et al* (98), mais aussi en cas de N+(1-3) dans l'étude de *Mook et al* (152), et aussi pour les tumeurs HER2+ par *Knauer et al* (153). Pour les tumeurs RE-, le pouvoir discriminant est beaucoup plus limité, avec moins de 5% des tumeurs RE- qui sont classées en bon pronostic, la majorité classées en mauvais pronostic (148) (98) (151). **Ainsi, Mammaprint est actuellement un outil pronostique utile essentiellement pour les femmes de <62 ans, RE+ essentiellement, N0 ou N+ <3N (=N1)** (154).

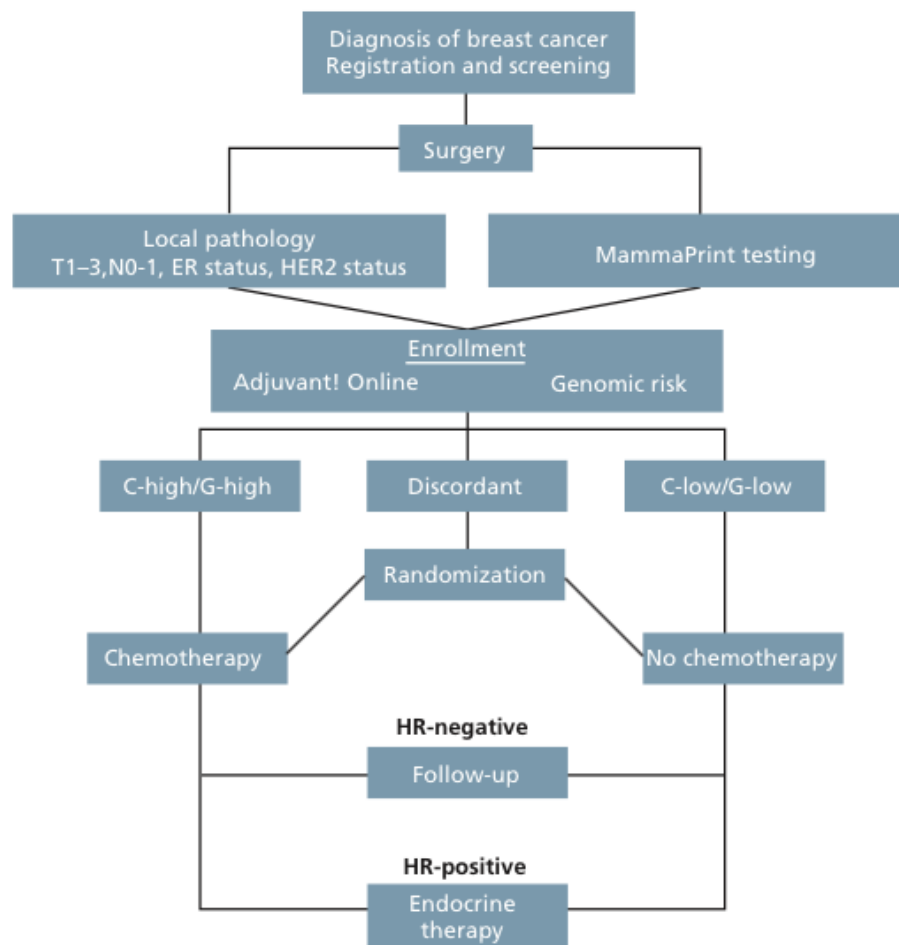
**Sur le plan prédictif.** la signature Mammaprint a été retrouvée, de façon **rétrospective, prédictive** du bénéfice de la chimiothérapie adjuvante puisque les sous groupes pronostiques identifiés par cette signature sont corrélés à la chimio sensibilité, avec des patientes de mauvais pronostic qui « tirent » le plus bénéfice de la chimiothérapie adjuvante versus les bas risque (155). En effet, *Knauer et al* retrouve de façon rétrospective que Mammaprint prédit le bénéfice de la chimiothérapie, avec un bénéfice significatif uniquement chez les patientes classées haut risque: Hormonothérapie versus Hormonothérapie + Chimiothérapie (majoritairement chimiothérapie à base d'anthracyclines) : Survie spécifique par

cancer du sein à 5 ans de 81% si HT seule versus 94% si HT+CT avec HR : 0,21 p=0,02.

Pour la pratique quotidienne, ce test a ainsi été validé à visée **pronostique** par la Food and Drug Administration (FDA) depuis 2007 pour les patientes <62 ans, avec des tumeurs <5 cm, de stade I-II, N0/N1, RE+. Le rationnel pour son utilisation en pratique courante est sa capacité à mieux discriminer les patients de bon pronostic que les critères du NCI, de Saint Gallen, et d'adjuvant OnLine (147). En cas de discordance entre les données clinicopathologiques et Mammaprint, cette dernière serait plus performante pour prédire le pronostic (98) (149). Cependant, il n'est pas approuvé comme outil, notamment à visée prédictive, dans les recommandations de l'ASCO ou les guidelines du NCCN ou de Saint Gallen, et bénéficie d'un niveau de preuve de niveau II.

En effet, concernant sa **valeur prédictive**, celle-ci a été insuffisamment étudiée mais une large étude prospective MINDACT enrôlant 6600 patientes (Microarray in Node Negative and 1 to 3 lymph node positive Disease may Avoid Chemo Therapy NCT00433589) permettra de répondre à cette question (**Figure 16**).

Il s'agit d'une large étude de phase III, randomisée, multicentrique, évaluant Mammaprint comme outil pronostique pour l'estimation du risque et comme outil prédictif décisionnel adjuvant, en parallèle d'Adjuvant OnLine. Elle permettra notamment de déterminer les cas où la chimiothérapie adjuvante peut être évitée en cas de discordance entre test génomique et informations clinicopathologiques, à la fois dans la population **N0** comme **N+**.



**Figure 16.** Design de l'étude MINDACT (156).

## 2. Oncotype DX

Oncotype Dx est la signature d'expression génique **pronostique et prédictive** la plus utilisée et validée avec un niveau de preuve (LOE) I. Elle est basée sur la qRT-PCR, et contrairement à MammaPrint, effectuée sur blocs de paraffine (ARN fragmenté). Son application est essentiellement **pronostique** pour les données cliniques de survie mais aussi **prédictive** du bénéfice de la chimiothérapie adjuvante.

Elle a été initialement développée de façon rétrospective en 2004 par *Paik et al*, à partir de tumeurs également **RH+**, **N0**, **mais recevant un traitement adjuvant par Tamoxifène (14)** (NSABP B-14) et se révèle être pronostique en terme de rechute à distance et de survie globale. En effet, ce test est basé sur 21 gènes sélectionnés (16 en rapport avec le cancer et 5 gènes de références) en rapport avec la

prolifération, l'invasion et les voie HER2 et RE. L'expression de ces gènes a été retranscrite en un score de récurrence ou (RS), quantitatif, utilisé comme variable continue, allant de 0 à 100 pour estimer la probabilité de récurrence. RS constitue une mesure du risque de rechute à distance à 10 ans, divisant les patientes en 3 groupes de risque : bas ( $RS < 18$ ), intermédiaire ( $RS 18-31$ ) et haut risque ( $RS \geq 31$ ) avec des taux respectifs de rechutes à distance à 10 ans de **7, 14 et 30%**.

Secondairement, d'autres études, ont démontré que le RS au delà de sa valeur pronostique en terme de récurrence à distance, est bien corrélé au bénéfice de la chimiothérapie, dans la même population de patientes **RE+, N0 et donc prédictif**. Paik et al a ainsi démontré, sur les données de l'étude NSABP-B20, que les patientes RE+N0 avec un RS élevé ont un mauvais pronostic spontané mais qu'ils s'agit des patientes qui « tirent » le plus du bénéfice de la chimiothérapie adjuvante par CMF, tandis que les patientes avec une tumeur RE+N0 de RS bas ont un bon pronostic spontané avec un bénéfice dérivé de la CT adjuvante somme toute réservé voir nul (157) : si  $RS > 31$ , survie à distance sans métastase à 10 ans de 60% en cas d'HT seule par Tamoxifène versus 88% si CT +HT par Tamoxifène, soit réduction absolue du risque de récurrence à distance de 27,6% et relative (RR) de 0,26. Pour le groupe RE+N0, RS bas, aucun bénéfice de la chimiothérapie adjuvante par CMF n'était retrouvé avec un RR à 1.31, -1,1% en valeur absolue (157).

Initialement développée pour les tumeurs RE+, N0, traité par Tamoxifène seul, les applications d'Oncotype DX ont été largement étendues à d'autres cohortes de cancers du sein, notamment **avec atteinte ganglionnaire (N+), et recevant un autre type d'hormonothérapie que le Tamoxifène**. Dans l'étude de Dowsett et al, (TransATAC study), il s'est en effet révélé être **pronostique** pour les cancers du sein **RE+, N0 ou N+, recevant une hormonothérapie par Tamoxifène tout comme par inhibiteurs de l'aromatase (158)**. Les taux de récurrences à distance à 9 ans en fonction du RS (bas-intermédiaire-haut) sont de 4%, 12%, 25% en cas de tumeurs **N0** et 17%, 28%, 49% en cas de **N+**. La valeur pronostique ajoutée du RS ne diffère pas entre le Tamoxifène et l'Anastrozole.

Le score de RS est également **prédictif** du bénéfice de la chimiothérapie en cas d'atteinte ganglionnaire. En effet, Albain et al, sur les données de l'étude du SWOG-

8814, a démontré la valeur à la fois pronostique et prédictive d'oncotype DX en cas de tumeurs RE+, N+(<3N), recevant une chimiothérapie-hormonothérapie adjuvante par FAC-Tamoxifène (159). En effet, les patientes avec un RS élevé ont avec l'adjonction d'une chimiothérapie par CAF au Tamoxifène, une amélioration significative de la DFS à 5 ans comme à 10 ans, HR : 0,59 p=0.033 contre l'absence de bénéfice chez les patientes RS bas risque même N+; HR 1,02 p= 0,97. Cette étude suggère ainsi que oncotype DX est capable d'identifier les patientes qui ne bénéficient pas de la CT adjuvante par FAC, même en cas d'atteinte ganglionnaire.

Ainsi, en pratique le score de récurrence RS est capable de prédire soit l'absence de bénéfice de la chimiothérapie adjuvante par FAC chez des patientes **RE+N+** (<3N) (159), ou à l'inverse un bénéfice de chimiothérapie par CMF chez les patientes **RE+, N0 (157)**. Il est capable de prédire un pronostic plus péjoratif des patientes RE+, N0 ou N+, traitées par Tamoxifène (14) (158) ou inhibiteurs de l'aromatase seul (158). La corrélation avec le profil moléculaire est étroite puisque l'analyse de cette signature à 21 gènes par sous type moléculaire démontre que 100% des tumeurs Luminal B ont un RS élevée contre 29% pour les luminal A (160).

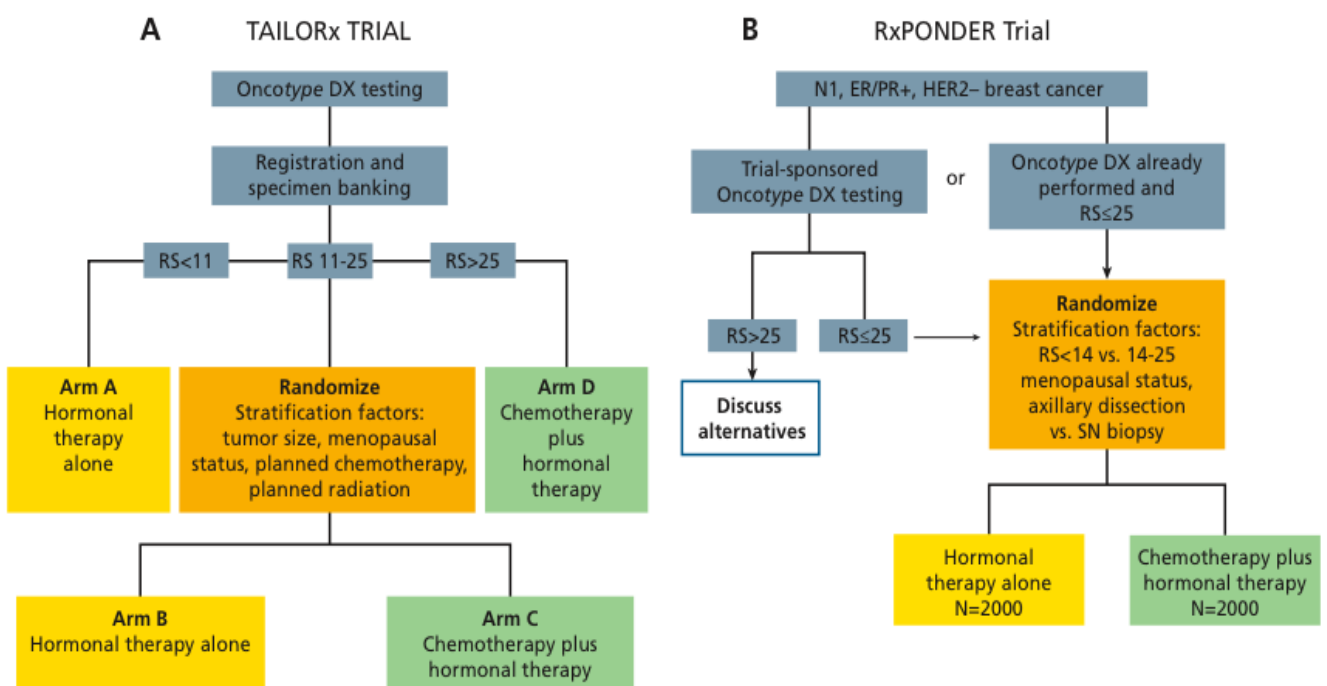
**Au total, le score de récurrence RS est capable d'estimer le pronostic et de prédire la chimio sensibilité générale des cancers du sein RH+,N0 et N+(<3N), et constitue donc un test raisonnable pour guider l'indication de chimiothérapie adjuvante, en particulier pour la population N0 (161).**

Compte tenu de ces résultats, Oncotype DX bénéficie actuellement d'un niveau de preuve (LOE I) pour estimer le risque de récurrences à distance à 10 ans, la survie globale et la réponse à la chimiothérapie adjuvante. Oncotype DX est ainsi actuellement recommandé par l'ASCO et le NCCN, la conférence de consensus de Saint Gallen à visée pronostique et prédictive pour orienter les indications « discutées » de chimiothérapie adjuvante dans la population **RE+, N0 (161) (21) (162)**.

Néanmoins, ce test à 21 gènes n'a pas été validé de façon **prospective**, notamment pour sa valeur prédictive. TAILORx (Trial Assigning Individualized Option for Treatment) à l'image de l'essai MINDACT, est une large étude randomisée

prospective de phase III portant sur plus de 11000 patientes pour valider cette signature en pratique clinique quotidienne, mais aussi pour mieux définir le « management » de la catégorie intermédiaire de risque (**Figure 17**). Dans cette étude, les patientes **RE+**, **uniquement N0** (à la différence de Mammaprint) sont évaluées pour leur risque de rechute après chirurgie selon Oncotype DX : bas (<11), intermédiaire (11-25) et haut risque (>25) avec double randomisation pour les risques intermédiaires entre hormonothérapie ou chimio-hormonothérapie, les bas risque sont traités par hormonothérapie seule et les hauts risques par chimiothérapie et hormonothérapie. Les résultats sont attendus également pour 2015.

Une autre étude de phase III, RxPONDER/SWOG S1007, comme TAILORx évaluera la valeur pronostique et prédictive d'Oncotype DX, mais chez les patientes N+ (9400 prévues) (**Figure 17.**)



**Figure 17.** Etudes prospectives de validation d'Oncotype DX, chez les patientes N0 TAILORx (A) et les patientes N1, RxPONDER (B) (156).



### 3. Marqueurs protéiques : UPA/PAI1

UPA/PAI-1 sont des facteurs protéolytiques jouant un rôle clef dans l'invasion et le processus métastatique. Ce ratio peut être mesuré par test ELISA sur des tissus frais, biopsie comprise, ce qui constitue sa principale limite. Les patients avec les deux marqueurs bas ( $uPA \leq 3ng/ml$  et  $PAI-1 \leq 14ng/mg$  de protéine) ont un pronostic significativement meilleur que ceux avec un ou deux facteurs élevés. La valeur pronostique de cette signature a été démontrée et validée avec un niveau I d'évidence (LOE I) sur une étude poêlée rétrospective de l'EORTC-RBG (163) et la valeur prédictive sur une étude prospective, Chemo N0, actualisée en 2013 par *Harbeck et al* avec 10 ans de recul.

Concernant **sa valeur pronostique**, dans l'étude rétrospective de l'EORTC-RBG portant sur plus de 8000 tumeurs, uPA/PAI-1 est un facteur pronostique les plus forts (avec le N), et indépendant de survie sans rechute, survie globale, pour les tumeurs N0 ou N+.

L'essai prospectif **ChemoN0** a validé à la fois son **impact pronostique** et sa **valeur prédictive** du bénéfice de la chimiothérapie adjuvante chez les patientes N0 (164) (165). En l'absence de toute thérapeutique adjuvante, les patients avec uPA/PAI-1 bas ont une survie sans récurrence à 10 ans de 87,1% versus 77% en cas d'uPA/PAI-1 élevé avec une survie globale également significativement meilleure de 89,8% vs 79,1%. Dans une comparaison randomisée chez les patientes N0 avec uPA/PAI-1 élevé et recevant de la chimiothérapie adjuvante par CMF, celle ci réduit significativement le risque de récurrence par rapport aux patientes randomisées dans le bras observation (HR : 0,48  $p=0,019$ ) (165). La valeur prédictive de cette signature sur le bénéfice a aussi été validée sur large une étude rétrospective par la même auteur (166).

Ainsi UPA/PAI-1 définit un groupe à haut risque avec un fort bénéfice de la chimiothérapie adjuvante et un groupe avec une faible probabilité de bénéfice mais une excellente survie sans chimiothérapie (165) (166). UPA/PAI-1 est un facteur pronostique indépendant recommandé par l'ASCO pour guider les décisions de chimiothérapie adjuvante dans le cancer du sein de stade précoce, dans la population N0 (167). Cependant, même si son coût est bien plus limité que les autres signatures (environ 275 euros), la nécessité de recours à du matériel frais sur des

tumeurs de petite taille, constitue une de ces principales limites, ce qui fait que ce test demeure peut réalisé en routine.

D'autre part, sa valeur prédictive devra également être confirmée au sein de deux essais prospectifs, toujours chez des patientes N0 haut risque pour l'étude NNBC- 3 (168) et chez des patientes N0 haut risque mais **aussi N+**, dans le cadre de l'étude « WSG-Plan B Trial ».

#### **4. Impact pronostiques/prédictifs décisionnels et limites des signatures.**

##### **a) Impact pronostique**

Comme nous l'avons vu, l'impact **pronostique** de ces signatures est « réel » et démontré sans pour autant remplacer les critères usuels histopathologiques usuels. Plusieurs méta analyses ont démontré que la taille tumorale (T) et l'atteinte ganglionnaire apportent des informations pronostiques indépendantes des signatures moléculaires et ne peuvent donc être substituées (169) (170) (171). A titre d'exemple, il a été prouvé que le score de récurrence RS d'Oncotype DX est en fait bien corrélé aux données histopathologiques, notamment le grade (14) et que l'information pronostique apportée par la taille tumorale, l'atteinte ganglionnaire mais aussi le grade lui même, reste majeure et indépendante du score de récurrence (172). Développer des modèles combinés de ces signatures avec les données histopathologiques pourrait apporter davantage d'information pronostique que ces signatures seules (173), ce qui conduit au développement actuel d'autres signatures mixtes comme Endopredict. Il s'agit d'une signature qui prédit le risque de récurrence à distance à 10 ans chez les patientes avec des tumeurs HER2-, RE+ traitées par hormonothérapie. Elle combine la quantification en ARN de 11 gènes sélectionnés et de deux facteurs de risque clinique, la taille tumorale et le statut ganglionnaire.

Durant les 10 dernières années de nombreuses signatures ont émergées, dites signatures de 1<sup>ère</sup> génération, mais partageant une caractéristique commune. Même si les gènes de ces signatures sont différents, la majorité identifie en fait les « même groupes » de patients de mauvais pronostic (171) (174). En effet, elles sont similaires dans leurs capacités à prédire la rechute et la survie globale par leur lien avec une forte expression des gènes de prolifération cellulaire (171) (175). Les méta analyses

de large cohorte de cancers du sein sur le profiling d'expression génique révèlent que la capacité des signatures à prédire les survies est uniquement liée à ce contingent de gènes de la prolifération, notamment pour les cancers RE+. En conséquence, pour les tumeurs RE-, majoritairement à prolifération élevée, toutes ces signatures de 1<sup>ère</sup> génération classifient les tumeurs RE- comme de mauvais pronostic, et sont d'impact limités (175) (176). Enfin, la capacité à prédire le pronostic semble temps dépendante, avec des prédictions pronostiques plus précises 5 ans qu' à 10 ans (98).

**Au total, actuellement la valeur pronostique ajoutée de ces signatures de 1<sup>ère</sup> generation reste encore limitée.** Une étude publiée par *Cuzick et al* dans le JCO en 2011 comparant l'information pronostique apportée par l'analyse semi quantitative de RE/RP/HER2 et le Ki67 en IHC (IHC4) à la signature Oncotype Dx dans un sous groupe de patientes de l'étude prospective ATAC montre des performances pronostiques similaires pour les deux modèles (135). Enfin, les signatures dites de 2<sup>ème</sup> génération, développées séparément pour chaque entité (HER2+, RH+ HER2-, RH-HER2-) reconnues maintenant comme des entités bien distinctes, ainsi que l'étude de l'expression de gènes relatifs à la réponse immune anti tumorale et au compartiment stromal devraient permettre d'être davantage discriminante surtout **sur le plan pronostique**, au delà des seuls gènes de prolifération, notamment pour les tumeurs RE-.

### **b) Intérêt prédictif**

Enfin, l'autre intérêt, **prédictif** concernant la chimio sensibilité a déjà été prouvée essentiellement de façon rétrospective, et s'expliquant en partie par le fait que la chimiothérapie cytotoxique cible des cellules proliférantes, or toutes ces signatures sont en lien avec des gènes de prolifération (177) (176). L'intérêt est actuellement essentiellement pour les tumeurs RE+. Néanmoins, la valeur prédictive reste rétrospective, avec des tests approuvés pour la pratique par la FDA, l'ASCO, le NCCN, la conférence internationale de consensus de Saint Gallen, mais qui nécessite d'être validés au sein de plusieurs essais prospectifs, dont trois majeurs et à la fois dans les populations RE+/RE-, N0 ou N+. Il s'agit des essais MINDACT et TAILORx et RxPONDER, dont les résultats sont attendus pour 2015-2016.

Le développement de signatures prédictives robustes de réponse aux agents de chimiothérapie spécifiques semble quant à lui plus compliqué. Les raisons sont multiples : la cause de résistance à une chimiothérapie n'est souvent pas unique mais multiples, avec une corrélation génotype phénotype imparfaite, ainsi que par la survenue d'altérations à l'échelle épigénétique ; le fait que le cancer est une mosaïque de cellules avec des altérations géniques et épigénétiques, avec une résistance conduite parfois par un sous clone rare de la tumeur non identifié par des tests globaux comme les microarrays.

Ainsi, compte tenu de cette complexité, il n'est pas illogique que même si certaines de ces signatures prédictives ont une certaine puissance prédictive dans des études de validation, leur précision est insuffisante en pratique pour déterminer si un patient peu ou pas recevoir un agent de chimiothérapie donné.

### **III. Personnalisation du traitement adjuvant : de la tumeur à l'hôte**

Le cancer du sein est une maladie hétérogène, qui nécessite de recourir à une évaluation « multiparamétrique » pronostique pour statuer sur l'indication d'un traitement adjuvant de type chimiothérapie. Le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante n'est plus à démontrer, en revanche, une meilleure définition des sous groupes relevant d'une chimiothérapie adjuvante reste encore un **enjeu majeur**, surtout en terme d'efficacité pour éviter le surtraitement davantage que le sous traitement, mais aussi en terme de toxicité.

Ces paramètres pronostiques décisionnels sont encore actuellement uniquement des paramètres tumoraux. Le développement de la génétique tumorale a permis d'apporter de nouveaux éléments pronostiques et/ou prédictifs, au delà des critères anatomopathologiques jusqu'alors utilisés. L'ensemble contribuant ainsi à tendre vers une approche pronostique/prédictive plus personnalisée pour l'indication de chimiothérapie adjuvante. Or, actuellement nous avons pu constater les limites actuelles de la classification moléculaire en pratique, ainsi que celles inhérentes aux

signatures moléculaires. Cette médecine personnalisée pourrait être optimisée en recherchant d'autres facteurs prédictifs génétiques, non pas lié à la tumeur mais à l'hôte.

**Ainsi, l'analyse de variants génétiques d'enzymes impliquées dans le métabolisme, le transport, l'élimination des cytotoxiques ou encore des variants de gènes cibles de certains agents cytotoxiques, pourrait ainsi permettre d'identifier de nouveaux facteurs prédictifs d'efficacité / non efficacité de la chimiothérapie adjuvante utilisée dans le cancer du sein.**

Ces variants génétiques les plus fréquents correspondent à ce que l'on appelle des variations d'un seul nucléotide ou « single nucleotide polymorphism » (SNP).

## IV. Les Single Nucleotide Polymorphism ou SNP

### A. Définition

Le polymorphisme nucléotidique ou polymorphisme d'un seul nucléotide dénommé « **SNP** » (**single nucleotide polymorphism**) correspond à la variation d'une seule paire de bases entre individus d'une même espèce avec une fréquence allélique >1% dans la population (**Figure 18**). Ils représentent la forme la plus abondante de variations génétiques dans le génome humain.



**Figure 18.** Représentation schématique d'un SNP.

Substitution d'une base cytosine (1) par une base thymine (2).

En effet, le génome entre deux individus ne diffère que de 0.1%, mais 90% de ces divergences est représentée par des SNP. On les retrouve en moyenne à la densité de 1.14 pour 1000 pb ou 1 SNP pour 875 pb, et peuvent toucher les exons comme les introns, avec une fréquence plus élevée dans les parties non codantes introniques, moins conservées, mais pouvant néanmoins avoir des conséquences (épissage, facteurs de transcription) (1). A l'inverse, dans les parties codantes exoniques, un SNP dit « synonyme » n'entraîne pas de modification sur la protéine, notamment grâce à la redondance du code génétique. En revanche, des SNP non synonymes peuvent affecter la composition en acides aminés via des mutations non-sens ou faux sens, et donc la fonction de la protéine. La majorité des SNP sont bialléliques (2 variants nucléotidiques) mais des formes tri voire tétra alléliques ont été décrites (178).

On estime qu'il en existe environ 10 millions, 3.1 millions ayant été validés au travers de la première phase du HapMap Project. Dans la deuxième phase, 2.1 millions de SNP ont été testés sur 270 individus issus de quatre régions géographiques différentes, permettant de valider 25-30% de l'ensemble des SNP du génome de fréquence allélique  $>0.05\%$  (179). La majorité des SNP rapportés dans les bases de données sont hautement polymorphes, mais on estime que plus de 60% des SNP ont une fréquence allélique mineure  $<5\%$ (1).

L'ensemble de ces SNP sont répertoriés dans une base de données en accès libre : la dbSNP database. Développée en 1998 par le National Center for Biotechnology Information (NCBI), en collaboration avec National Human Genome Research Institute (NHGRI), elle répertorie les variations génétiques intra et inter espèces (SNP et autres modifications comme les insertions, délétions, microsatellites).

Ainsi, la majorité des SNP n'entraîne aucune conséquence biologique et confère la diversité entre populations ou individus, mais ils peuvent avoir deux conséquences majeurs : la prédisposition héréditaire à certaines maladies comme le cancer, mais surtout engendrer une différence dans la réponse/toxicité aux traitements ce qui va nous intéresser dans le cadre de ce travail.

L'intérêt théorique actuel de la recherche de SNP est donc double :

- l'identification de nouveaux marqueurs de risque de maladies, notamment dans le cadre du cancer.
- la découverte de nouveaux marqueurs prédictifs de réponse ou de résistance aux traitements.

## **B. Données générales de pharmacogénomiques.**

En effet, sur le plan thérapeutique, des études d'associations réalisées sur des cohortes de malades recevant de la chimiothérapie ont conduit à l'identification de SNP impliqués dans la réponse ou la résistance aux thérapeutiques oncologiques, offrant la perspective de nouveaux outils pour optimiser le traitement.

Ces SNP portent sur différents gènes cibles impliqués dans :

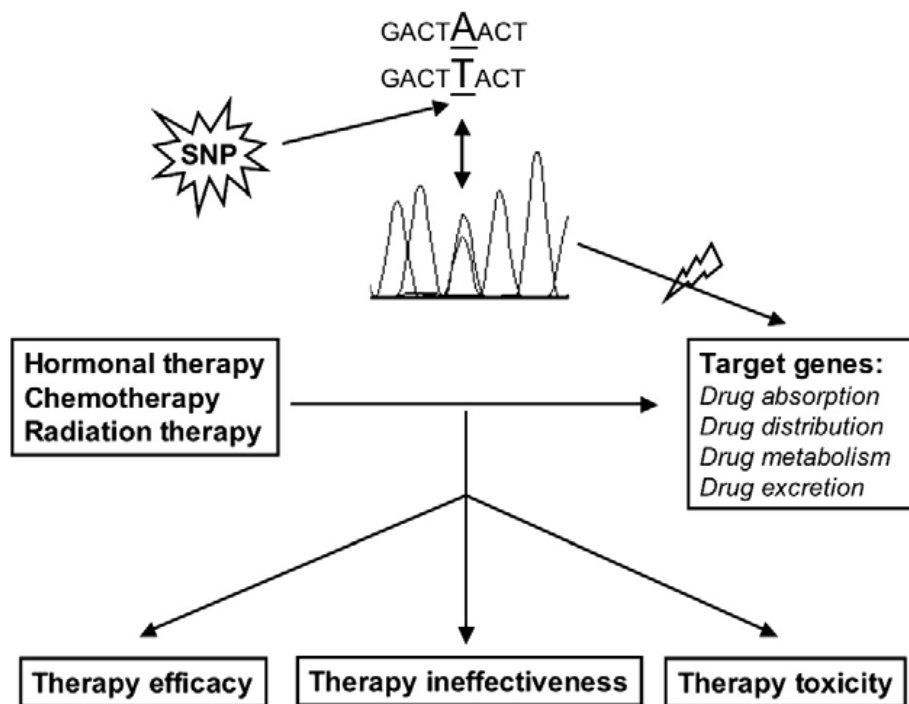
**-le métabolisme** : enzymes de type I (cytochrome P450 essentiellement), et enzymes de type II : glutathione S-transférase avec plusieurs iso enzymes : mu (GSTM1), pi (GSTP1), alpha (GSTA1), thêta (GSTT1) et Zêta, les Sulfo-transférases (SULTA1), la NADPH : quinone oxydoréductase 1 (NQO1), les carboxyl-esterase 2 (CES2) et les UGT (UDP-Glucuronosyltransferase), l'UGT2B7 pour l'épirubicine.

**-le transport des cytotoxiques** (transporteurs à ATP de type ABC et les transporteurs organiques cationiques de type OCT)

**-la biosynthèse de bases nucléotidiques** indispensables à la formation de l'ADN : différentes enzymes impliquées : Thymidylate synthase (TS), Dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD), Méthylène tetrahydrofolate réductase (MTHFR)

**-ou dans les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN** induits par les cytotoxiques (XRCC1, BRCA1, P53)

Ces variations vont ainsi expliquer à pronostic équivalent des différences d'efficacité et ou de toxicité des chimiothérapies administrées au patientes **(Figure 19.)**



**Figure 19.** Influence des SNP sur la toxicité et l'efficacité des traitements du cancer du sein (chimiothérapie, hormonothérapie et radiothérapie) (1).

Dans la littérature, on retrouve de nombreuses études de pharmacogénomique objectivant des associations entre SNP et réponse / résistance aux traitements ou SNP et toxicité, notamment dans le cancer du sein.

**Sur le plan du métabolisme des cytotoxiques**, rappelons qu'il existe deux types d'enzymes de métabolisme. Les enzymes de type I responsables de l'activation / inactivation de la drogue. Les enzymes de type II ont pour rôle essentiel d'effectuer une conjugaison du xénobiotique à un substrat endogène hépatique (acétylation, glucuronidation, conjugaison à un sulfate, un acide aminé, ou un glutathion) via des réactions d'oxydations, réductions et d'hydrolyse afin de le rendre hydrosoluble et permettre une élimination par voie rénale.

- Les enzymes de type I sont représentées essentiellement par les cytochromes, exprimés dans le tissu hépatique et intestinal. Il s'agit principalement du cytochrome P450 (CYP), dont 4 sous familles principales sont impliquées dans le métabolisme des drogues anticancéreuses. Les cytochromes **CYP 1, 2, 3, 19** interviennent dans le métabolisme des cytotoxiques utilisés dans le cadre du traitement adjuvant du cancer du



sein comme le Paclitaxel, ou le cyclophosphamide. Dans la littérature, un grand nombre de polymorphisme des gènes CYP ont été reliés aux données d'efficacité et de toxicités. L'effet des variants génétiques sur la réponse à l'hormonothérapie par Tamoxifène (CYP2D6), décrits par *Goetz et al (180)*, ou *Wegman et al (181)*, ou par inhibiteurs de l'aromatase (CYB19A1) décrits par *Colomer et al (182)* est connu depuis longtemps. Concernant les cytotoxiques, à titre d'exemple, certains variants de cytochrome impliqués dans le métabolisme du Paclitaxel comme CYB1B1\*3 à l'état homozygote ont été retrouvé associés à une meilleure survie sans progression chez des patientes de haut risque ou de stade IV traitées par Paclitaxel (183) (184).

- Les différentes enzymes de type II peuvent être également le siège de SNP. Ainsi, par exemple, un variant de la Glutathione S transférase pi1 (GSTP1 : conjugaison des métabolites de la doxorubicine et du cyclophosphamide), le variant rs 1695 (GG ou AG) a été retrouvé par *Bewick et al*, associé à un pronostic plus dévorable (PFS et mortalité spécifique par cancer) chez des patientes métastatiques traitées par des agents alkylants (cyclophosphamide) à haute dose et autogreffe (185). L'enzyme NQO1 est une réductase qui inactive les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) induisant des dommages à l'ADN. Elle utilise le NADP ou le NADPH comme cofacteurs de réduction, et a ainsi été décrite comme une enzyme « préventive » du cancer. Le port à l'état homozygote du variant NQO1\*2 a été retrouvé, chez des patientes atteintes de cancers du sein et traités par épirubicine en adjuvant notamment, comme ayant une forte valeur pronostique et prédictive. En effet, les homozygotes avec le variant faux sens NQO1\*2 avaient de mauvaises survies après traitement adjuvant par épirubicine, associés in vitro à l'absence de réponse aux anthracyclines (186).

**Sur le plan des transporteurs des cytotoxiques**, il s'agit essentiellement :

- **des transporteurs de la famille ABC** (« ATP-Binding Cassette transporters »), dont il existe 7 sous familles majeures, dont trois : ABCB, ABCC, ABCG, impliqués dans le transport des drogues anticancéreuses. Les polymorphismes génétiques qui affectent ces transporteurs peuvent

contribuer aux différences de réponses aux chimiothérapies. Il s'agit de protéines transmembranaires qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour l'activité de transport. Par exemple, le gène ABCB1, plus connu sous le nom MDR1 code pour la glycoprotéine P d'efflux, responsable du phénotype multi drogues résistance. En effet, elle est entre autre responsable de l'efflux de la doxorubicine. Un grand nombre de SNP pour ce gène ont été décrits dans la littérature, mais peu de choses sont connues sur l'importance des variants génétiques de MDR1 spécifiquement dans le cancer du sein. Ainsi, le gène ABCB1 ou MDR1 peut être le siège d'un SNP de type cytosine (C) remplacée par une thymine (T) en position 3435 de l'exon 26. Le génotype 3435 TT a été décrit par *Kafka et al* comme associée à une meilleure efficacité de la chimiothérapie néoadjuvante dans le cancer du sein avec des réponses histologiques complètes à la doxorubicine chez les patientes porteuses de ce génotype (187).

- **Une autre classe de transporteur existe**, il s'agit des transporteurs organiques cationiques ou OCT (Organic Cationic Transporters), qui jouent un rôle clef dans l'absorption des drogues ainsi que leur élimination. Comme leur nom l'indique, il utilise le gradient ionique au travers des membranes pour faciliter le transport des substances selon le gradient électrochimique. A titre d'exemple dans le cancer du sein, le transporteur cationique SLC22A16 a été évalué d'un point de vue pharmacocinétique, en terme de niveau d'exposition sanguine à la doxorubicine dans une population asiatique atteintes de cancers du sein. Le génotype 146 GG étant retrouvé lié à de plus hauts niveaux d'exposition sanguins (187).

**Sur le plan des polymorphismes génétiques des enzymes associés à la synthèse de l'ADN, et cibles de cytotoxiques**, il s'agit essentiellement dans le cadre du cancer du sein du 5 Fluorouracile. Le 5FU est une prodrogue qui est anabolisée en métabolites actifs et détruit à plus de 80% par la Dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD). Le 5FU inhibe essentiellement la thymidylate synthase nécessaire pour la synthèse de dTMP, puis de dTTP et donc de l'ADN lui même, expliquant l'effet cytotoxique du 5FU. Concernant les SNP, il s'agit essentiellement

de polymorphismes affectant le gène de l'enzyme de détoxification, le gène DPD engendrant des différences de toxicité plus que d'efficacité. En effet, les déficits partiels ou complets de l'activité de la DPD sont responsables de toxicités sévères dans 0,1 et 3 à 5% des cas respectivement. De nombreux SNP du gène DPD ont été identifiés, avec des variants non synonymes bien connus dans les régions codantes, notamment au niveau du site d'épissage et d'autres variants en régions non codantes (189) (190). Des polymorphismes de la TS sont décrits, associés à une moindre réponse au 5FU par augmentation de l'expression de la TS, mais il ne s'agit pas de polymorphismes de type SNP, mais de répétition en tandem de 28 paires de bases sur le promoteur du gène de la TS, et décrites essentiellement dans le cadre du cancer colorectal et non dans le cadre du cancer du sein (1). Néanmoins, dans une étude prospective de patientes avec un cancer du sein avancé recevant du 5FU oral (capecitabine), *Largillier et al* ont ainsi montré une augmentation de la toxicité et une durée de réponse significativement raccourcie chez les patientes avec un variant du gène de la thymidylate synthase, TS 3RG, à l'état homozygote :3RG3RG (191). Celui ci correspondant à une substitution d'une base Guanine par une cytosine en région 5' entraînant une augmentation de l'expression de la TS.

**Sur le plan des gènes impliqués dans la réparation des lésions de l'ADN, induits par les cytotoxiques,** des SNP peuvent être associés à des différences d'efficacité de la chimiothérapie. Pour rappel, 6 grands mécanismes de réparation des lésions de l'ADN existent. Il s'agit de la **réversion ou réparation directe**, la réparation par excision de base ou **BER**, la réparation par excision de nucléotides ou **NER**, la réparation des mésappariements de l'ADN ou mismatch repair **MMR**, la réparation par jonction d'extrémités non homologues, **NHEJ** et la réparation par **recombinaison homologue**. Les 2 gènes majeurs du système BER sont les gènes XRCC1 (X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 1) et APE1 (apurinic, apyrimidinic endonuclease 1). XRCC1 joue un rôle majeur dans la réparation des lésions induites par les agents alkylants (comme le cyclophosphamide et les anthracyclines). Ainsi, à titre d'exemple, les patientes porteuses d'un génotype XRCC1 de type 1196AA traitées par chimiothérapie adjuvante de type CMF ou AC présentaient un risque de récurrence moindre et une meilleure survie, faisant de ce SNP un marqueur prédictif potentiel de l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante (192).

Ainsi, il existe de nombreux SNP décrits dans la littérature qui sont associés à des différences d'efficacité à la chimiothérapie, en contexte **adjuvant, néoadjuvant et métastatique**. Ces SNP peuvent porter sur le métabolisme du cytotoxique, à plusieurs niveaux de son devenir dans l'organisme depuis son absorption, son transport, son métabolisme, son élimination. Les SNP peuvent également impacter sur la cible même du cytotoxique (variant de la TS pour le 5FU) ou encore sur les mécanismes de réparation de l'ADN mis en place suite aux dommages causés par les anthracyclines ou le cyclophosphamide. Les sources potentielles de polymorphismes sont donc multiples et complexes.

Afin de comprendre les sources de SNP, il est nécessaire de comprendre le métabolisme général des cytotoxiques utilisés dans le cancer du sein en adjuvant.

### **C. Données de pharmacologie des cytotoxiques utilisés en adjuvant: sources possibles de SNP**

L'intérêt des SNP serait donc de prédire l'efficacité et/ou la résistance à la chimiothérapie, et donc d'adapter les thérapeutiques à chaque patiente, offrant la perspective d'une médecine personnalisée.

La pharmacologie des cytotoxiques utilisées dans le cancer du sein est complexe, mais il est important de connaître les grandes étapes générales du métabolisme de ces traitements, afin de comprendre les sources éventuelles de polymorphismes (SNP) expliquant les différences d'efficacité.

#### **1. Protocole FEC**

Le protocole FEC est l'association de trois cytotoxiques : le 5 Fluorouracile ou **5FU**, une anthracycline, l'**EPIRUBICINE**, et un agent alkylant le cyclophosphamide ou **ENDOXAN**.

### a) Les anthracyclines

**Les anthracyclines** sont des inhibiteurs de la topo isomérase II, même s'ils sont parfois classés également parmi les agents intercalants (insertion entre deux paires de bases), induisant des dommages à l'ADN. La topoisomérase II est une enzyme nucléaire responsable des modifications de structure tridimensionnelle de l'ADN, contrôlant le degré de « compactage » de l'ADN et l'accessibilité des enzymes nécessaires pour la réplication et la transcription. Ainsi, elle réalise des coupures double brin de l'ADN, permettant le passage d'un segment de l'ADN dans l'ouverture réalisée, puis restaure les liaisons coupées. Les anthracyclines inhibent la topo isomérase II, si bien que les coupures formées sont stabilisées sans poursuite possible de l'action de la topo II qui est inhibée. Ces coupures vont bloquer l'action des ADN et ARN polymérases lors des processus de transcription et de réplication, aboutissant à la mort cellulaire. Les anthracyclines sont également capables de produire des radicaux libres (ROS) sous l'effet des oxydoréductases cellulaires (NQO1, NOS3, XDH), médiés par la transformation de la doxycycline en Dox-semiquinone, causant des dommages oxydatifs et une cytotoxicité, contribuant aussi à l'efficacité des anthracyclines mais expliquant aussi leur cardiotoxicité **(Figure 20)**. La cytotoxicité des anthracyclines est liée essentiellement au blocage de la topo isomérase II mais est également influencé en partie par le stress oxydatif.

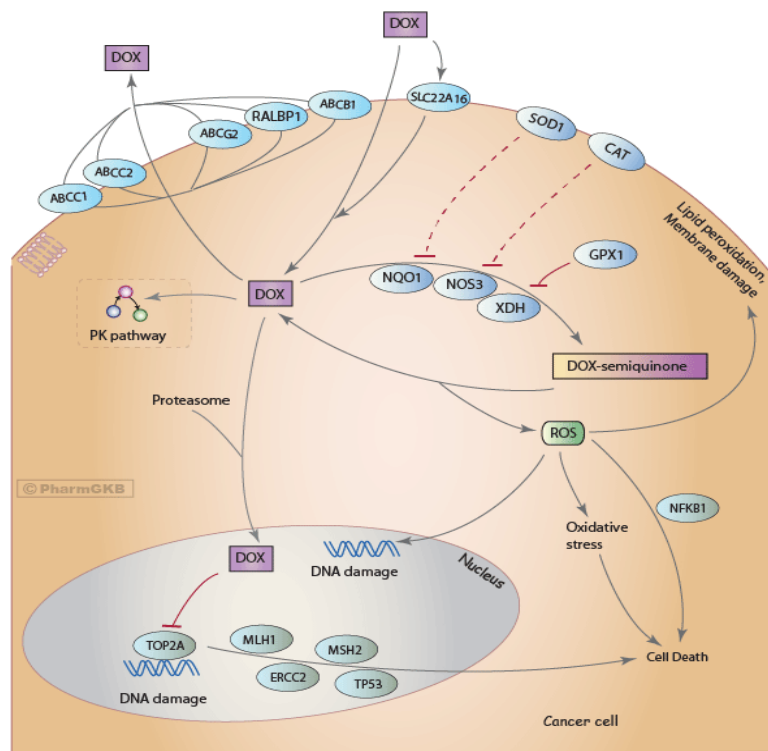
Les anthracyclines impliquent différentes voies métaboliques plus ou moins complexes, qui concernent de nombreuses enzymes et transporteurs, tout comme les enzymes de la balance du stress oxydatif et de l'apoptose. Ainsi, de nombreux variants de type SNP codant pour ces enzymes du métabolisme des anthracyclines, pour les transporteurs, les enzymes du stress oxydatif et de l'apoptose ont été décrits, l'ensemble expliquant la variabilité interindividuelle de réponse aux anthracyclines (193) **(Figure 21)**. Schématiquement, 50% de la doxorubicine est éliminée sous forme intacte (190). L'entrée dans la cellule se fait par un transporteur membranaire SLC22A16. La doxorubicine comme l'épirubicine subissent une réduction par des enzymes de classes I en doxorubicinol et épirubicinol par les carbonylréductases (CBR1-CBR3) et des aldokétoréductases (AKR1A1 et AKR1C3). L'efflux hors de la cellule se fait par les transporteurs ABC (ABCB1, ABCC1, ABCC2 et ABCG2) et l'inactivation par le cytochrome P450 (CYP3A4 et CYP3A5) (189).

L'épirubicine, quant à elle, subit une réaction de conjugaison par des enzymes de phase II, principalement l'UGT2B7 (**Figure 21**). Des variants génotypiques peuvent impacter chacun des éléments du métabolisme des anthracyclines.

Les SNP peuvent affecter chacune des étapes métaboliques des anthracyclines. Les enzymes de réduction de phase I **CBR1 et CBR3** peuvent ainsi être le siège de SNP et affecter l'efficacité de la doxorubicine, avec cependant des données contradictoires dans la littérature, notamment en fonction des populations étudiées (caucasien versus asiatique). A titre d'exemple, les polymorphismes de CBR3 ont été étudiés chez des patientes atteintes de cancer du sein et recevant une chimiothérapie adjuvante par CMF ou CAF (étude SWOG 8897) et n'ont pas été retrouvés associés à la survie sans progression (194). Dans une population asiatique, *Fan et al* retrouvait une association entre le variant CBR 311G >A et une réduction tumorale plus importante chez les patientes traitées par Doxorubicine en 1<sup>ère</sup> ligne. Concernant **les transporteurs**, le polymorphisme C3534T du transporteur **ABCB1 (MDR1)** a été décrits par *Kafka et al* comme associé à plus de réponse histologique complète (pCR) à la chimiothérapie néoadjuvante par doxorubicine et cyclophosphamide (187). Un autre variant allélique, ABCB1 2677A, à quant à oui été corrélé par *Bray et al* à des temps jusqu'à la récurrence plus courts et des survies moindres chez les patientes recevant une chimiothérapie adjuvante par AC (195). L'épirubicine contrairement à la doxorubicine subit une conjugaison par **l'UGT2B7**. De la même manière, un variant de l'UGT2B7-His268Tyr a été associé à une augmentation du risque de récurrence dans une cohorte de patientes traitées par chimiothérapie adjuvante par épirubicine (196).

Enfin, les produits d'oxydations secondaires induits par les anthracyclines et qui induisent eux mêmes des dommages cellulaires secondaires sont en partie réduits (réaction de réduction) par **la glutathione S-transférase (GST)**. Les individus avec un déficit complet ou partiel de cette enzyme peuvent ainsi avoir une meilleure efficacité du traitement par anthracyclines. En cas de variant génotypique de type GSTM1 ou GSTT1 nul de cette enzyme, *Ambrosone et al* a ainsi objectivé que la chimiothérapie adjuvante à base de doxorubicine était plus efficace (plus de dommages cellulaires induits par les produits d'oxydation secondaires en cas d'enzymes déficientes), avec une réduction de la mortalité sur une série rétrospective de 252 patientes atteintes de cancers du sein (197).

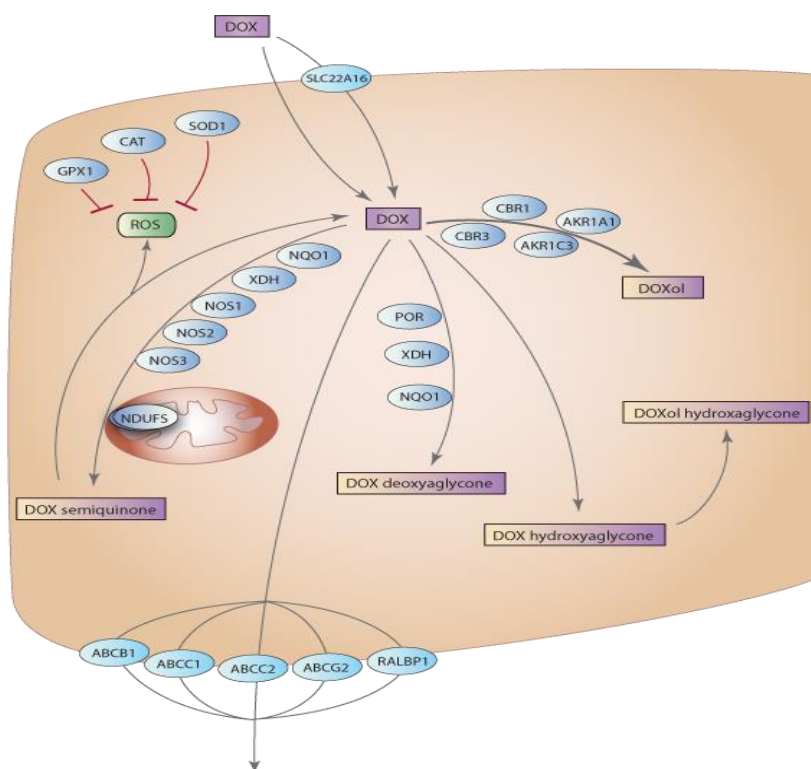
La cytotoxicité des anthracyclines étant en partie influencée par le stress oxydatif, les gènes des oxydants et antioxydants ont été évalués ainsi que leur relation avec les données cliniques. Ces enzymes, la manganèse superoxide dismutase (MnSOD), la catalase (CAT) et la glutathione peroxydase (GPX1) inhibent la perméabilité mitochondriale induite par les ROS et ont donc un effet protecteur pour la cellule tumorale tandis que d'autre comme la myéloperoxydase (MPO) favorise la production de radicaux libres. **Les polymorphismes de ces gènes pro-oxydants et antioxydants** mis en jeu suite à l'administration des anthracyclines, peuvent également entrainer des différences d'efficacité. Ainsi *Ambrosone et al* a identifié des polymorphismes génétiques de ces enzymes ayant pour conséquence des différences de survies sans récurrence et globale sur des cohortes de patientes de cancers du sein traitées par chimiothérapie (incluant des anthracyclines) et/ou radiothérapie adjuvante (193) (198). En effet, certains polymorphismes de la MPO en lien avec une augmentation de l'activité oxydative sont associés à une meilleure survie sans récurrence pour les patientes avec un cancer du sein de stade précoce traitées par anthracyclines(198).



**Figure 20. Mécanisme d'action des anthracyclines, ici de la doxorubicine.**

Blocage de la topoisomérase II au niveau nucléaire et production de radicaux libres (ROS) lors de la conversion en Dox-semiquinone par les oxydoréductases cellulaires

(NQO1, NOS3, XDH) contribuant à la cytotoxicité et à la mort cellulaire. Issu de la base PharmGKB.



**Figure 21. Métabolisme de la doxorubicine.**

Influx (SLC22A16), efflux (ABC), réduction par les réductases cellulaires (CBR1-3, AKR1A1, AKR1C3) et par les NOS, NQO1, XDH. Issu de la base PharmGKB.

Même si utilisées depuis plusieurs décades, les mécanismes qui sous tendent les variabilités interindividuelles des anthracyclines restent peu claires. La plupart des études ayant identifiées ces polymorphismes sont rétrospectives, avec le biais de confusion d'autres agents de chimiothérapies administrés dans le même temps, sans incorporation des paramètres pharmacocinétiques (PK) ou pharmacodynamiques (PD). Ainsi, avec l'essor de la pharmacogénétique, il existe une explosion des données. En 2000, le National Institute Of Health, (NIH) a crée une base de données, le Pharmacogenetics Knowledge Base (PharmGKB) pour regrouper ces données et colliger les associations entre gènes et cytotoxiques, lister la fréquence et la localisation génique de ces variants pouvant impacter sur la réponse aux drogues.



## b) Le cyclophosphamide (ENDOXAN)

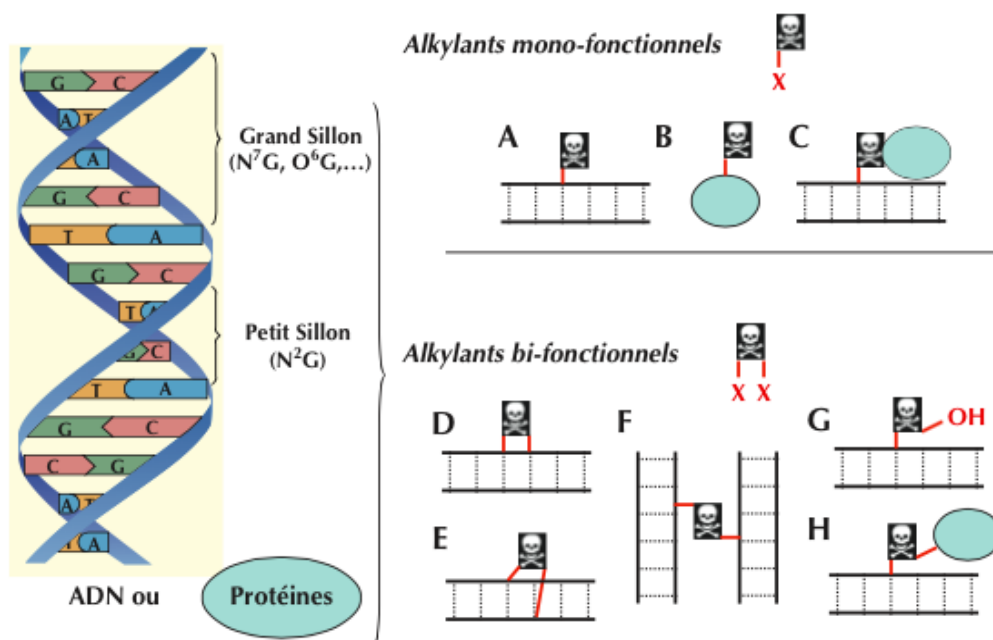
Le cyclophosphamide est un agent alkylant bifonctionnel responsable de l'adduit d'un groupe alkyl sur l'ADN avec formation de ponts intra et inter-brins. L'alkylation se fait essentiellement au niveau du grand sillon de la molécule d'ADN. Il s'en suit un blocage de la réplication et de la transcription avec mort cellulaire **(Figure 22)** **(Figure 23)**. L'effet de ce cytotoxique est indépendant du cycle cellulaire.

Il s'agit d'une prodrogue qui nécessite une activation multi-étapes **(Figure 23)** avant de pouvoir agir comme agent alkylant anti tumoral.

Il est activé en deux phases au niveau hépatique : transformation du cyclophosphamide en 4-OH cyclophosphamide par 3 cytochromes principaux : **CYP2B6 essentiellement**, mais aussi **CYP3A4**, **CYP2C9** puis en métabolite actif qui est l'**aldophosphamide (190)**. L'inactivation est effectuée par l'aldéhyde déshydrogénase **(ALDH1A1)** qui transforme le métabolite intermédiaire le 4-OH cyclophosphamide en kéto-cyclophosphamide et le métabolite actif l'aldophosphamide en carboxyphosphamide. Le métabolite actif l'aldophosphamide s'il n'est pas dégradé par l'ALDH, est transformé en moutarde phosphoramidate qui va former les ponts avec l'ADN et inhiber la synthèse des protéines et en acroléine, métabolite toxique responsable de la toxicité vésicale en cas de haute dose. De nombreux métabolites du cyclophosphamide sont inactivés par liaison irréversible à une glutathione, réaction catalysée par la **glutathione S-transférase (GST) A1 et P1** essentiellement.

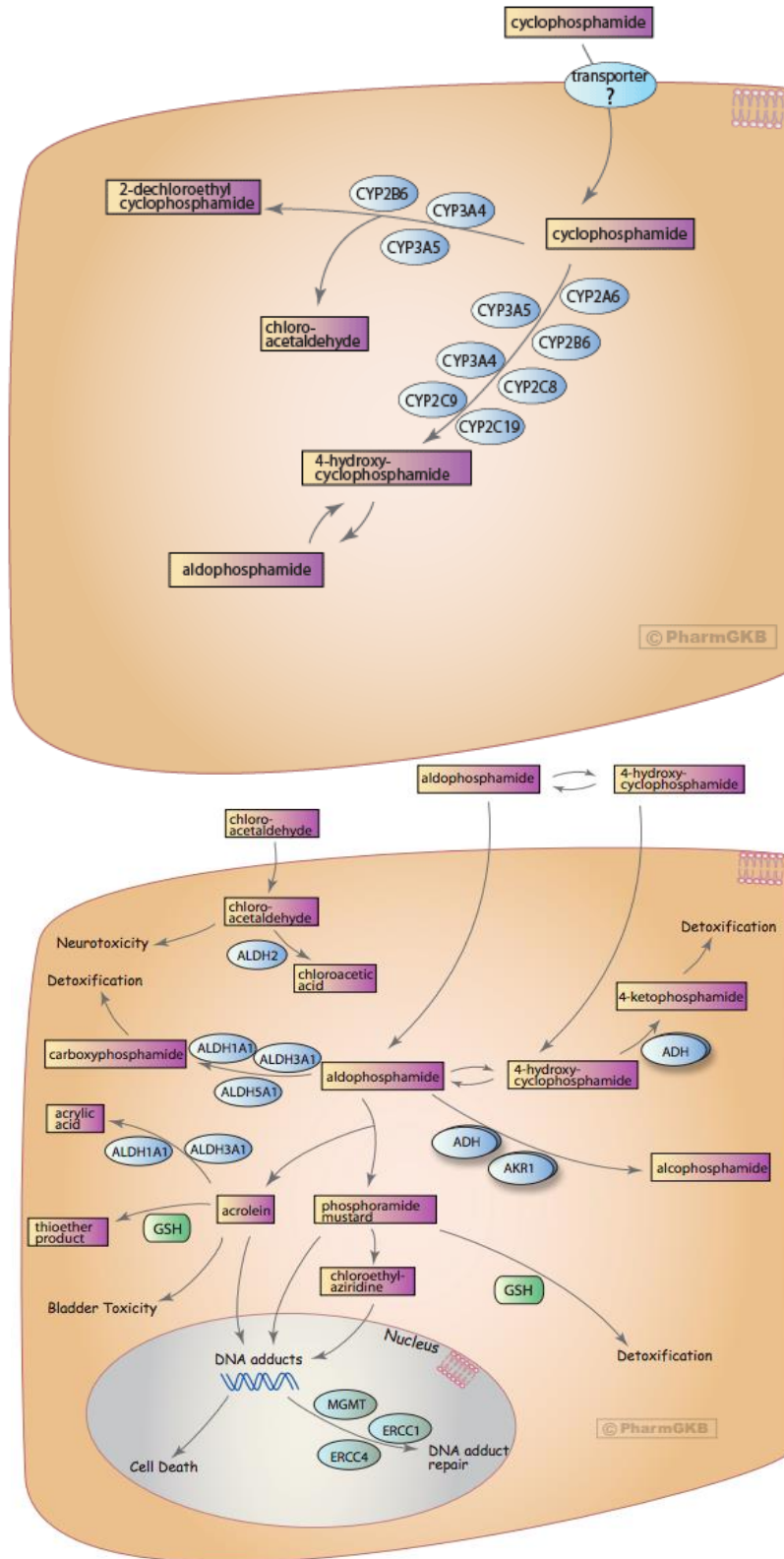
Les études sur les variants génétiques des enzymes intervenants dans le métabolisme du cyclophosphamide sont parfois discordantes (199). *Bray et al* objective une association entre certains génotypes de **CYP2B6** (CYP2B6\*2, CYP 2B6\*8, CYP 2B6\*9, CYP 2B6\*4) et des survies sans progressions et globales plus courtes chez des patientes recevant une chimiothérapie adjuvante selon le protocole AC (195). D'autres études, celle *Yao et al* sur les patientes de l'étude SWOG 8897 ne retrouvait pas cette association entre variants du CYP2B6 et la survie sans récurrence chez des patientes recevant une chimiothérapie à base de cyclophosphamide, soit CMF ou CAF (200). Les mêmes données contradictoires existent pour la **GSTP1**, retrouvée dans la même étude corrélée à la toxicité mais pas

aux données de survie sans récidence (200). Concernant l'enzyme **ALDH1A1**, impliquée dans la détoxification des métabolites cytotoxiques du cyclophosphamide son expression dans le tissu tumoral a été retrouvée, associée des stades tumoraux plus avancés (taille, N+), au phénotype triple négatif mais surtout à de mauvaises données de survie chez les patientes recevant une chimiothérapie néoadjuvante à base de cyclophosphamide (201). **Concernant les GST, un variant de la Glutathione S transférase pi1** (GSTP1 : conjugaison des métabolites de la doxorubicine et du cyclophosphamide), le variant rs 1695 (GG ou AG) a été retrouvé par *Bewick et al*, associé à un pronostic plus dévorable (PFS et mortalité spécifique par cancer) chez des patientes métastatiques traitées par des agents alkylants (cyclophosphamide) à haute dose et autogreffe (185).



**Figure 22. Mécanisme d'action des agents alkylants.**

Alkylants bifonctionnels avec création de ponts intra et interbrins. **A, B, C, G** : Produits de mono-alkylation. **D, E, F, H** Produits de bi-alkylation (202).

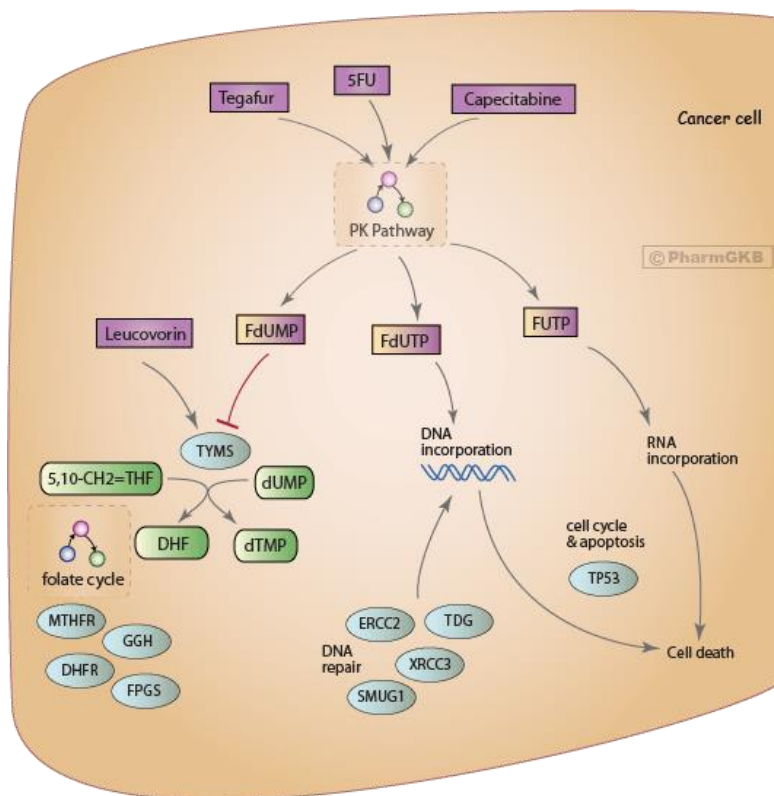


**Figure 23. Métabolisme du cyclophosphamide.**

a) Transformation en métabolite actif au niveau hépatique en 4-OH cyclophosphamide puis en aldophosphamide. b) Métabolisme du métabolite actif et mécanisme d'action : Dégradation en moutarde phosphoramide responsable des adduits sur l'ADN et en acroléine responsable de la toxicité vésicale. Base de données PharmGKB.

### c) Le 5FU

Le 5FU est un anti métabolite, caractérisé par une structure proche des substances endogènes nécessaires pour la synthèse des acides nucléiques et des protéines, agissant ainsi comme inhibiteurs compétitifs sur les enzymes impliquées dans cette synthèse. Le 5FU est un analogue pyrimidique. Il s'agit d'une prodrogue anabolisée en 3 métabolites actifs : le 5FdUMP, le 5FdUTP et le 5FUTP. Le 5FU a plusieurs mécanismes d'actions : inhibition de la thymidylate synthase (TS) par compétition entre le 5FdUMP plus affin pour la TS et le dUMP avec formation d'un complexe ternaire stable entre le 5FU-TS-Acide folinique. Il s'en suit un arrêt de la synthèse de dTTP nécessaire à la synthèse de l'ADN. Outre le fait de cibler la TS qui est l'action essentielle du 5FU, le 5FUTP s'incorpore dans les ARN et le 5FdUTP dans l'ADN entraînant mort cellulaire (**Figure 24**)



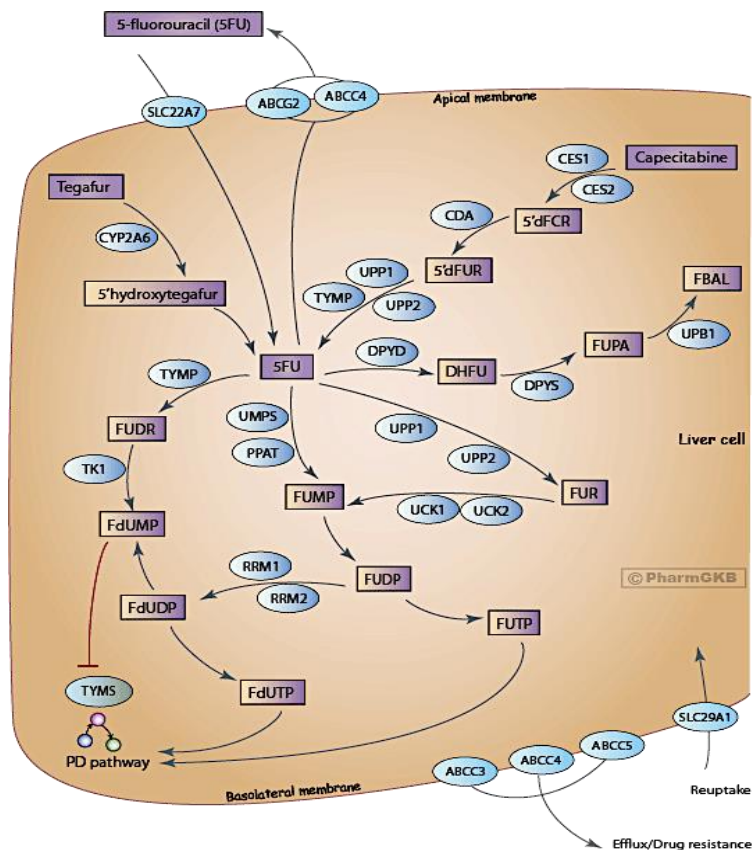
**Figure 24. Mécanisme d'action du 5FU.**

Issu de la base PharmGKB.

Le métabolisme comme figuré dans la **figure 25** est complexe et des polymorphismes peuvent survenir à toutes les étapes. Après son administration (via le transporteur d'influx SLC22A7), il est intégré à deux voies métaboliques : la

première anabolique qui le transforme en nucléotides actifs au niveau des cellules tumorales et la deuxième catabolique, nécessaire pour son inactivation et son élimination. Le 5FU est inactivé à plus de 80% par la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD). Il est ainsi transformé par réduction en fluoro-dihydro-uracil (FUH2) sans activité anti-tumorale, puis en fluoro-uréido-propionate (F-UPA) puis en fluoro-béta-alanine (FBAL). L'efflux hors de la cellule se fait via les transporteurs ABC mais il peut être réabsorbé par le transporteur SLC29A1.

Concernant les SNP, il s'agit essentiellement de polymorphismes affectant le gène de l'enzyme de détoxification, le gène DPD engendrant des différences de toxicité plus que d'efficacité. Le variant le plus fréquent est DYPD\*2A au niveau du site d'épissage. Des polymorphismes de la TS sont décrits, associés à une moindre réponse au 5FU par augmentation de l'expression de la TS, dans une étude prospective de patientes avec un cancer du sein avancé recevant du 5FU oral (capecitabine) (191).

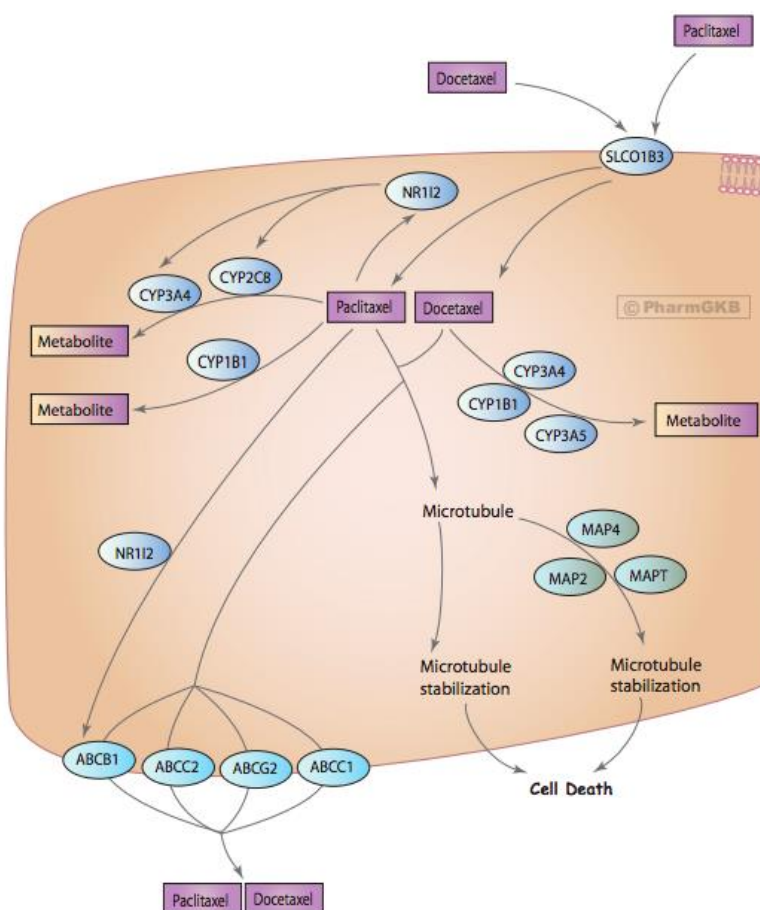


**Figure 25. Métabolisme du 5Fluorouracile.**

Entrée-Réentrée dans la cellule via le transporteur SLC22A7 et SLC29A1, efflux par les transporteurs ABC, voie d'activation et de dégradation. *Issu de PharmGKB.*

## 2. Protocole à base de taxanes : Docetaxel (TAXOTERE) ou Paclitaxel (TAXOL)

Avec les anthracyclines, les taxanes sont le deuxième agent cytotoxique le plus actif dans le cancer du sein. Il s'agit de poison du fuseau mitotique, empêchant la dépolymérisation des microtubules et du fuseau mitotique pendant la réplication, entraînant la mort cellulaire. Le Docetaxel est principalement métabolisé par le CYP3A4/5, tandis que le Paclitaxel par le CYP3A4/CYP2C8 en métabolites hydroxylés inactifs (190) (189). Le transport des taxanes aux travers des membranes cellulaires s'effectue par un transporteur d'influx : le SLCO1B3 (=OATP1B3) et d'efflux : ABCB1, ABCC1, ABCC2 et ABCG2 (190) (**Figure 26**).

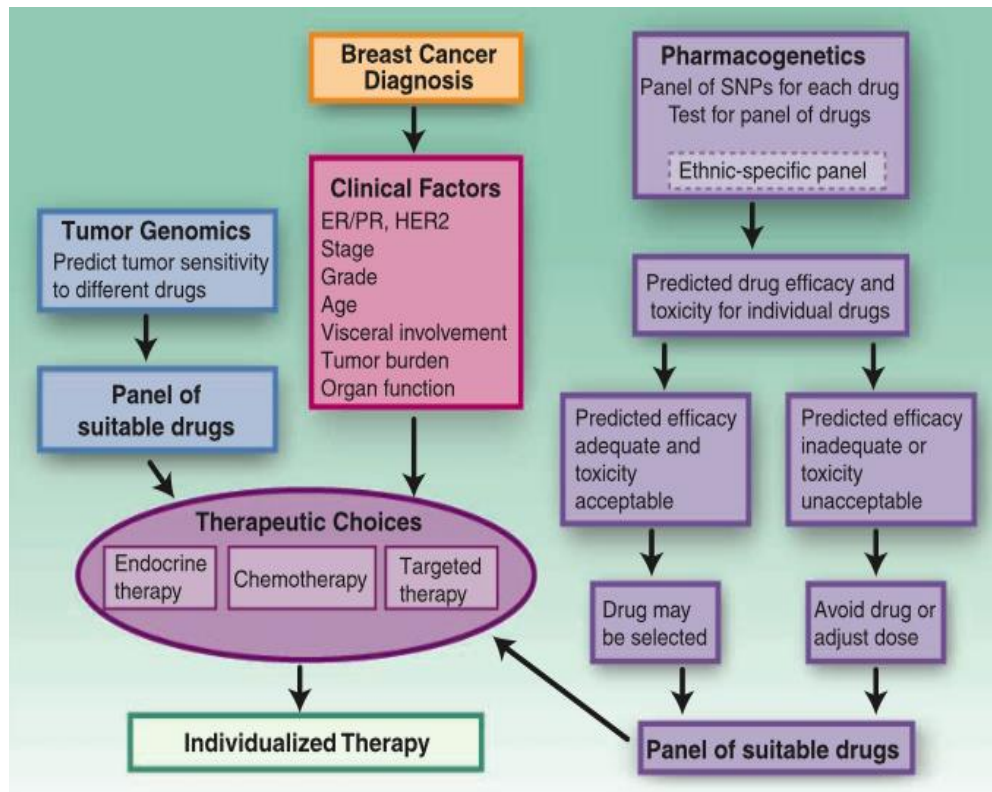


**Figure 26.** Métabolisme et mécanisme d'action des taxanes utilisés dans le cancer du sein

Entrée dans la cellule via le transporteur SLCO1B3, efflux par les transporteurs ABC, métabolisme intracellulaire par les cytochromes P450 : CYP3A4, CYB1B1 pour les deux drogues, CYP2C8 pour le Paclitaxel et CYP3A5 pour le Docetaxel. Action au niveau des microtubules aboutissant à la mort cellulaire.

Concernant les polymorphismes, de nombreux SNP ont été décrits avec comme beaucoup d'études de pharmacogénomiques des données parfois discordantes. Le transporteur SLCO1B3 est le transporteur d'influx cellulaire le plus important pour le Docetaxel et le Paclitaxel. Ainsi, pour le transporteur d'influx cellulaire **SLCO1B3**, un variant a été décrit comme associé à une toxicité hématologique granulocytaire du Docetaxel dans une population japonaise de patiente (203), tandis que d'autres études n'objectivent aucune association entre les génotypes de ces transporteurs et la clairance du Docetaxel (204). Le CYP2C8, enzyme clef du métabolisme du Paclitaxel est codée par un gène polymorphique avec de nombreux variants démontrés comme impactant au moins sur la clairance du Paclitaxel sur une série de patientes atteintes de cancer de l'ovaire (205). Le variant **CYP2C8\*3**, a été retrouvé associé par *Hertz et al* associé à plus de réponse clinique/radiologique complète chez des patientes recevant une chimiothérapie néoadjuvante à base de Paclitaxel (206). D'autres études ne retrouvent pas cette association entre réponse au Paclitaxel et génotypes de ce cytochrome (CYP2C8), mais aussi de variants d'autres cytochromes (comme ABCB1, ABCG2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5). D'autres polymorphismes de CYB1B1, comme le variant **CYP1B1\*3** à l'état homozygote est retrouvé par *Marsh et al*, associé à une plus longue survie sans progression chez des patientes atteintes de cancer du sein haut risque ou de stade IV et traité par chimiothérapie haute dose par Paclitaxel, doxorubicine, cyclophosphamide (207). Pour les transporteurs d'efflux, certains SNP **de ABCB1**, ABCB1 3435 CT ou 2677GG ont été reliés à l'efficacité du Paclitaxel utilisé en monothérapie (taux de contrôle de la maladie, survie globale) chez des patientes traitées pour un cancer du sein métastatique (173).

Ainsi, de nombreux SNP divers peuvent intervenir dans le processus complexe pharmacodynamique et pharmacocinétique des cytotoxiques. Les SNP pourraient offrir la perspective d'une médecine personnalisée, en proposant la chimiothérapie aux patientes les plus susceptibles d'en tirer un bénéfice. L'idée est donc de combiner tous les paramètres pronostiques décisionnels usuels tumoraux (clinique, anatomopathologiques, moléculaires) aux paramètres de l'hôte, les SNP, pour mieux définir les indications de chimiothérapie adjuvante ainsi que le type de chimiothérapie **(Figure 27.)**



**Figure 27.** Arbre décisionnel thérapeutique combinant les facteurs cliniques, les caractéristiques tumorales anatomopathologiques du cancer du sein, les données moléculaires et les données de pharmacogénétiques définissant le développement d'une médecine personnalisée oncologique (189).

Dans ce contexte, le centre Oscar Lambret de Lille a promu l'étude GENEOM. L'étude GENEOM porte sur la recherche de facteurs **G**énétiques de type SNP prédictifs de réponse à la chimiothérapie et à l'hormonothérapie chez les patientes présentant ou ayant présenté un adénocarcinome mammaire en situation **né**oadjuvante, Adjuvante ou **M**étastatique. Ce travail de thèse s'inscrit dans une des trois parties de cette étude et s'intéresse ainsi spécifiquement à la recherche de facteurs prédictifs de réponse à la chimiothérapie en contexte adjuvant.



## **MATERIELS ET METHODES**

### **I. Objectif principal et caractéristiques de l'étude GENEOM.**

L'objectif dans le cadre de ce travail de thèse est d'identifier des variants constitutionnels de gènes ou polymorphismes nucléotidiques (SNP) associés à des différences de réponse à la chimiothérapie adjuvante à base d'anthracyclines et ou de taxanes. La réponse à la chimiothérapie adjuvante s'évalue sur deux critères de jugement principaux : la survie sans récurrence (PFS) et la survie globale (OS).

Ainsi, l'objectif principal est d'identifier des SNP ou des associations de SNP corrélées à une différence de PFS. L'étude GENEOM-0708 (N°IDRCB : 2007-A00908-45) est une étude monocentrique, promue par le centre Oscar Lambret de Lille dont l'investigateur coordonnateur principal est le Pr Jacques Bonnetterre. Il s'agit d'une étude ouverte, interventionnelle (test sanguin pour le génotypage), de recherche translationnelle avec des données à la fois rétrospectives et prospectives.

### **II. Critère d'évaluation**

Le critère principal d'évaluation pour la partie adjuvante analysée dans ce travail de thèse est la survie sans récurrence ou PFS à 5 ans.

La survie sans récurrence est définie ici comme le temps écoulé entre la chirurgie et la date d'apparition de la première récurrence, locale, régionale et ou à distance.

### III. Critères d'inclusion et d'exclusion

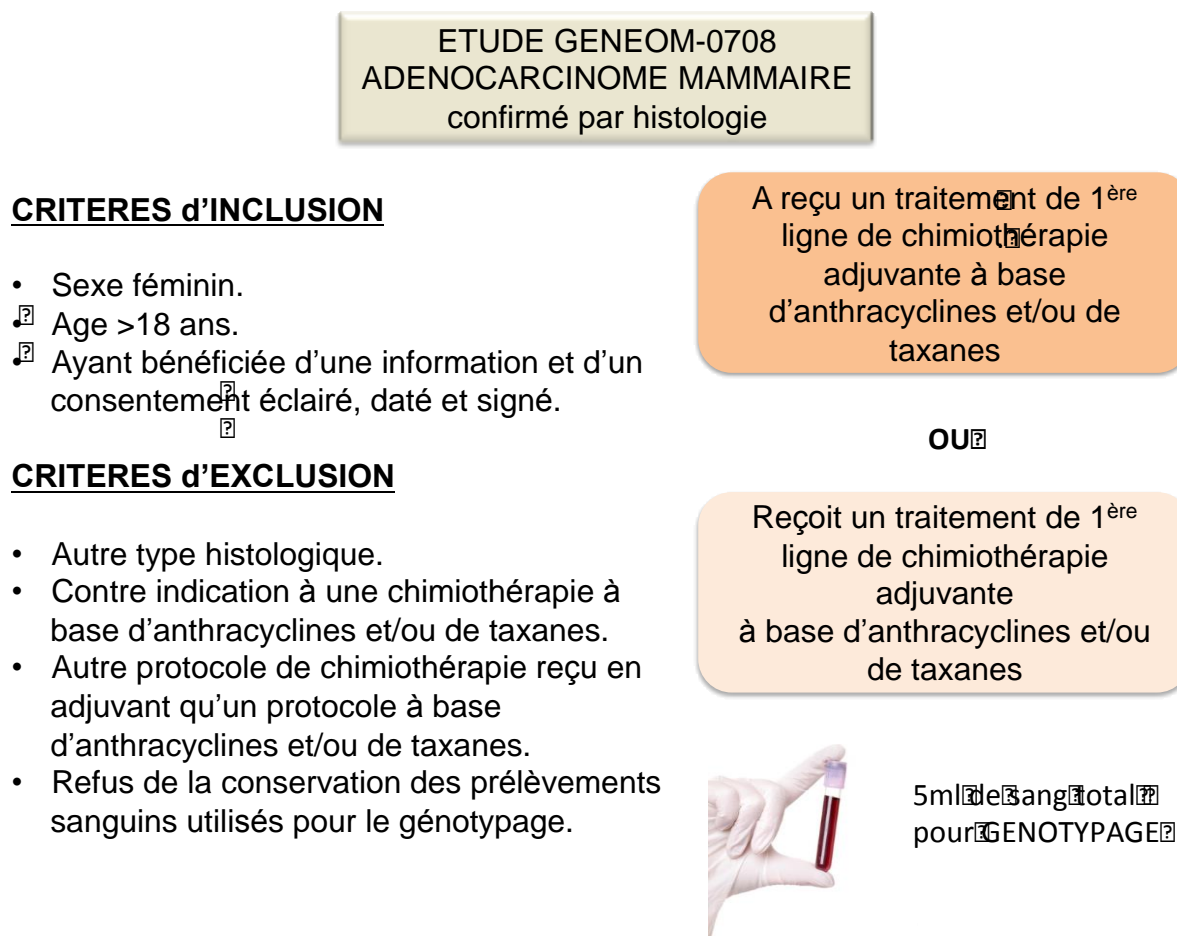
Les patientes étaient incluses dans cette étude au moment du diagnostic de cancer du sein (avant ou pendant la chimiothérapie adjuvante), ou bien pendant la surveillance après leur traitement adjuvant ou chez des patientes ayant rechutées localement ou à distance (traitées ou non par chimiothérapie, hormonothérapie pour la récurrence) mais qui avaient reçu initialement une chimiothérapie adjuvante.

**Les critères d'inclusion étaient les suivants (Figure 28):**

- Patients de sexe féminin (exclusion des cancers du sein de l'homme)
- Un âge >18 ans
- Diagnostic d'adénocarcinome mammaire histologiquement prouvé
- Relevante d'une chimiothérapie adjuvante à base d'anthracyclines et/ou de taxanes dont l'indication a été posée de façon collégiale en réunion de concertation pluridisciplinaire
- ou ayant reçu une chimiothérapie adjuvante à base d'anthracyclines et ou de taxanes dont l'indication a été posée de façon collégiale en réunion de concertation pluridisciplinaire
- ayant bénéficié d'une information et d'un consentement éclairé, daté et signé

**Les critères de non inclusion étaient les suivants (Figure 28) :**

- Autre type histologique qu'un adénocarcinome mammaire
- Contre indication à une chimiothérapie à base d'anthracyclines et/ou de taxanes.
- Autre protocole de chimiothérapie reçu en adjuvant qu'un protocole à base d'anthracyclines et ou de taxanes : exemple CMF
- Refus de la part des patientes de la conservation des prélèvements sanguins utilisés pour le génotypage.



**Figure 28. Schéma de l'étude GENEOM 0-708**

## IV. Protocoles de chimiothérapie adjuvant

Le traitement adjuvant devait comporter une chimiothérapie à base d'anthracyclines et/ou de taxanes. Ainsi, différents protocoles et doses de chimiothérapies reçues en adjuvant ont été validés pour l'inclusion, tout en sachant que la majorité, plus de 80% des patientes ont reçu le protocole séquentiel FEC100-TAXOTERE.

### Schéma séquentiel FEC 100-TAXOTERE : toutes les 3 semaines

- \* 3 cycles de FEC100 :
  - Fluorouracile 500mg/m<sup>2</sup>
  - Endoxan ou Cyclophosphamide 500mg/m<sup>2</sup>
  - Epirubicine 100mg/m<sup>2</sup>
- \* 3 cycles de TAXOTERE 100mg/m<sup>2</sup> ou 12 cycles de TAXOTERE 30mg/m<sup>2</sup>.

**Schéma séquentiel FEC 100- Paclitaxel (TAXOL)**

- \* FEC100 : toutes les 3 semaines
  - Fluorouracile 500mg/m<sup>2</sup>
  - Endoxan ou Cyclophosphamide 500mg/m<sup>2</sup>
  - Epirubicine 100mg/m<sup>2</sup>
- \* Paclitaxel hebdomadaire : 90mg/m<sup>2</sup> (12cycles)

**FEC100 uniquement : toutes les 3 semaines**

- Fluorouracile 500mg/m<sup>2</sup>
- Endoxan ou Cyclophosphamide 500mg/m<sup>2</sup>
- Epirubicine 100mg/m<sup>2</sup>

**FEC50 uniquement: toutes les 3 semaines**

- Fluorouracile 500mg/m<sup>2</sup>
- Endoxan ou Cyclophosphamide 500 mg/m<sup>2</sup>
- Epirubicine 50mg/m<sup>2</sup>

**FEC75 uniquement: toutes les 3 semaines**

- Fluorouracile 500mg/m<sup>2</sup>
- Endoxan ou cyclophosphamide 500 mg/m<sup>2</sup>
- Epirubicine 75mg/m<sup>2</sup>

Différentes combinaisons de dose de FEC étaient ainsi possibles pour l'inclusion de type FEC100-FEC50, FEC100-FEC75, FEC50-FEC75, avec retrait du 5FU parfois de type FEC100-EPIRUBICINE-ENDOXAN et avec les taxanes également selon les protocoles suivants :

- FEC50-TAXOTERE
- EPIRUBICINE SEUL (sans 5FU) -TAXANES (TAXOTERE),
- TAXOTERE-ENDOXAN-ADRIBLASTINE (sans 5FU).

Des protocoles à base de taxanes seul sans anthracyclines comme TAXOTERE seul ou TAXOTERE-ENDOXAN ont également été acceptés et les patientes incluses dans l'étude. Les autres protocoles comprenaient : une autre anthracycline que la doxorubicine ou en association de type FARMORUBICINE-ENDOXAN.

## V. Recueil des données cliniques, anatomopathologiques et de suivi (CRF)

Les informations cliniques, anatomopathologiques et de suivi ont été recueillies à partir du dossier médical des patientes (dossier informatique WebDCR et dossier papier). L'ensemble des données étant colligé sur la base d'un cahier d'observation ou CRF électronique (Case report form) développé spécifiquement pour l'étude GENEOM à l'aide de Capture System (CLINSIGHT).

Les informations ont ainsi été recueillies par les membres de l'Unité intégré de recherche clinique (UIRC) du Centre Oscar Lambret rattachés à cette étude ainsi que par mes soins. Il s'agit ainsi d'un e-CRF dont l'accès était restreint aux personnes habilitées à remplir cette base de données via des codes d'accès.

La saisie finale des données a été vérifiée par une autre personne que celle ayant recueillie les données et rattachée à l'UIRC. Un contrôle final de qualité a été effectué et en l'absence de Query, la base de données a été exportée vers le logiciel de statistique SPSS via une procédure automatisée.

La définition respective des status Ki67+, RE+, RP+, HER2+, triple négatif utilisée dans cette étude est la suivante :

- ❖ Le **KI67** est considéré comme positif si le pourcentage de cellules marquées est supérieure ou égal à 15%.
- ❖ Le **statut HER2** est défini comme positif si :
  - IHC +++ ou
  - IHC ++ et FISH ou CISH +
- ❖ Le **statut RE** est dit positif si le pourcentage de cellules marquées est supérieure ou égal à 10% et le statut RP positif si le pourcentage de cellules marquées est supérieure ou égal à 10%.
- ❖ Le **statut hormonal** est considéré comme positif (RH+) si : RE+ ou RP+ et considéré comme négatif (RH-) si : RE- et RP-.
- ❖ Une **tumeur triple négative** est définie par un status HER2 négatif et RE inférieur à 10% et RP inférieur à 10%.

Les données suivantes ont ainsi été recueillies :

➤ **Description de la tumeur initiale**

- Côté (droit ou gauche), taille en échographie en mm.
- Diagnostic initial : date et nature du prélèvement initial (Ponction biopsique ou chirurgicale).
- Caractéristiques histopathologiques initiales sur la biopsie: type histologique (CCI, CLI, autre), différenciation : bien, moyennement, peu différencié ou inconnu, grade de différenciation selon SBR, récepteurs hormonaux : positif, négatif ou inconnu sur la biopsie initiale, ainsi que le% de cellules marquées, le Ki67, le typage HER2 : technique utilisée (IHC, FISH, CISH), résultat en IHC (0 à +++) et si score 2+ si FISH ou CISH positive ou négative.
- Chirurgie initiale : date de la chirurgie, type de chirurgie (partielle ou totale), si prélèvement du ganglion sentinelle et nombre de ganglions envahis sur le nombre de ganglions prélevés, données éventuelles d'un curage axillaire avec nombre de ganglions envahis sur le nombre de ganglions prélevés.
- Caractéristiques histopathologiques sur la pièce opératoire : type histologique (CCI, CLI, autre), différenciation : bien, moyennement, peu différencié ou inconnu, grade de différenciation selon SBR, récepteurs hormonaux : positif ou négatif ou inconnu sur la biopsie initiale, ainsi que le% de cellules marquées, le Ki67, le typage HER2 : technique utilisée (IHC, FISH, CISH), résultat en IHC (0 à +++) et si score 2+ si FISH ou CISH positive ou négative, présence d'embols péri-tumoraux.

➤ **Description du protocole de chimiothérapie adjuvante**

- Type de chimiothérapie, nombre de cycles du protocole de chimiothérapie reçus, date de début et de fin de chimiothérapie.
- Si traitement adjuvant par Trastuzumab (Herceptin) : nombre de cycles en adjuvant et date de début et de fin de traitement.

➤ **Données d'hormonothérapie adjuvante :**

- Type d'hormonothérapie et date de début et de fin.

➤ **Données de surveillance :**

- Apparition de la 1<sup>ère</sup> progression : si oui ou non, date de la 1<sup>ère</sup> progression
- Nature de la récurrence :
  - \* récurrence locale : type histologique : in situ ou infiltrant, date de la récurrence locale.
  - \* récurrence ganglionnaire : type histologique : in situ ou infiltrant, et localisation : chaîne mammaire interne, sus claviculaire, ou axillaire, avec mention de la date de la récurrence ganglionnaire.
  - \* cancer du sein controlatéral : type histologique : in situ ou infiltrant, date d'apparition, expression ou non des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone, traitement effectué : soit conservateur ou radical.
  - \* Métastases à distance : date d'apparition de la 1<sup>ère</sup> métastase, ainsi que le site métastatique : os, poumon, foie, système nerveux central ou autres.
  - \* Eventuel apparition d'un autre cancer: second cancer : date et type.
- Suivi : Etat de la patiente aux dernières nouvelles : Vivante avec date des dernières nouvelles et si décédée, la date du décès et la cause du décès : progression de la maladie, décès toxique ou d'autres causes en précisant la cause.

## VI. Sérothèque

Le prélèvement sanguin nécessaire à la réalisation du génotypage a été effectué à n'importe quel moment de la prise en charge de la patiente : en post opératoire avant les traitements adjuvants, en cours de chimiothérapie adjuvante, en cours de radiothérapie, en cours d'hormonothérapie, pendant la surveillance ou en cas de récurrence si une chimiothérapie adjuvante a été effectuée antérieurement sur la prise en charge initiale.

Pour la collecte, 5 ml de sang total ont été prélevés sur tube EDTA avec une étiquette d'identification spécifique dédiée, complétée et collée sur le tube. Les tubes sanguins ont été placés dans le réfrigérateur dans une boîte réservée au protocole, à proximité du lieu de prélèvement, et afin de limiter les erreurs une fiche de traçabilité sérothèque a été remplie pour chaque prélèvement effectué.

Les échantillons sanguins ont été regroupés dans le réfrigérateur de l'UIRC et acheminés le jour du prélèvement vers le laboratoire d'Oncologie Moléculaire et Humaine (LOMH) du Pr Peyrat pour réalisation de l'analyse génétique ou génotypage.

## **VII. Formalités administratives-réglementaires : consentement des patientes**

L'avis favorable concernant ce projet a été émis par le CPP Nord Ouest (Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest IV) le 11 septembre 2007 et l'autorisation donnée le 28 septembre 2007 par la DGS (Direction Générale de la Santé). L'étude est enregistrée sous le numéro IDRCB : 2007-A00908-45. Le promoteur de cette étude est le Centre Oscar Lambret de Lille, l'investigateur coordonnateur principal le Pr J. Bonneterre. L'attaché de recherche clinique Moniteur des dossiers est Madame Muriel Chapoutier.

L'étude **GENEOM** a été conduite de façon conforme aux lois et aux principes éthiques suivants :

- déclaration d'Helsinki de 1964 révisée à Edimbourg en 2000.
- Loi n°2004-801 du 6 août 2004 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel et modifiant la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers, aux libertés.
- à la loi n°2004-800 du 9 août 2004 relative à la Bioéthique.
- à la loi de Santé Publique (lois n°2004-806 du 9 août 2004 et 2006-450 du 18 avril 2006).

Une information claire a été donnée aux patientes par les différents médecins les prenant en charge, pouvant s'agir des médecins seniors référents comme des internes de l'hôpital de jour lors de la venue de la patiente pour la réalisation de la chimiothérapie adjuvante. L'information a porté sur les objectifs de l'étude, les modalités pratiques, la nécessité d'un prélèvement sanguin, et la réalisation d'une analyse génétique.



Un formulaire de consentement au protocole de recherche GENEOM-0708 a été signé par les patientes. Celles ci ont le droit de retirer ce consentement à l'étude à tout moment, tout comme de refuser l'utilisation du prélèvement sanguin.

## VIII. Sélection des SNP

Les SNP évalués dans le cadre de cette étude ont été sélectionnés à partir des données de la littérature, sur des études ayant démontrées des variations de la réponse à la chimiothérapie à base d'anthracyclines et ou de taxanes (5FU, cyclophosphamide, epirubicine, doxorubicine, Paclitaxel, Docetaxel) ou aux thérapies ciblées anti-VEGF comme le bevacizumab, ou anti-HER2 comme le Trastuzumab, avec des variations à la fois en terme d'efficacité mais aussi en terme de toxicité.

Il s'agissait d'études portant spécifiquement sur le cancer du sein, mais également dans le cadre d'autres cancers : cancers colorectaux (209), gastriques (210), pulmonaires (211), carcinomes naso-pharyngés (212) avec parfois même des études regroupant des cancers différents (sein et lymphomes, sein et cancers digestifs ...).

Les critères d'évaluation des conséquences des SNP étaient assez variés : survie sans progression (PFS), survie globale (OS), mais aussi des données de pharmacocinétique ou de pharmacodynamie, comme des modifications d'aire sous la courbe (AUC), de clairance du cytotoxique. Enfin, les protocoles de chimiothérapies, même s'ils étaient basés sur certains des cytotoxiques utilisés dans le cancer du sein, pouvaient varier fortement d'une étude à l'autre, avec des monothérapies, ou des combinaisons de cytotoxiques, à des posologies différentes, ou encore avec des cytotoxiques non utilisés en adjuvant dans le cancer du sein (cisplatine), mais aussi avec des rythmicités d'administrations différents.

Dans le cadre du cancer du sein, ces études ont été effectuées dans des contextes différents, en contexte adjuvant (213) (214) néoadjuvant (215) (216) (217) ou encore métastatique (207).

De cette analyse de la littérature, 53 SNP sont ressortis comme potentiellement pouvant impacter sur la réponse à la chimiothérapie adjuvante dans le cadre du cancer du sein. Ils portent sur des gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des cytotoxiques, la réparation et la synthèse de l'ADN.

Sur ces 53 SNP, 1 sonde ne fonctionnait pas (SNP rs1570360) 3 sondes ont été invalidées (rs 2333227, rs3746083, rs7439366).

Les résultats étaient disponibles pour 49 de ces 53 SNP.

Cependant, 3 SNP étaient monomorphiques dans la population GENEOM adjuvant :

- HTR1E rs3828741 (CC)
- MDR1 rs2229109 (GG)
- PARP1 rs1136471 (AA)

Ainsi, un total de 49 variants nucléotidiques sur la population adjuvante était à disposition pour effectuer le génotypage, avec donc 46 SNP analysables dans la population et figurant dans le **tableau 1**.

N°	Gène	SNP	Polymorphisme	Voie d'action	Chimiothérapie	Références
1	ABCC4	rs9561778	NC	Transport	Cyclophosphamide	Low et al, 2009
2	BRCA1	rs799917	Prp871Leu	Réparation ADN	Paclitaxel	Lee et al, 2013, Shim H et al, 2010
3	CCND1	rs9344	Pro241Pr	Cycle Cellulaire	5FU	Absenger et al, 2013
4	CD24	rs52812045	Ala57Val	Adhésion cellulaire	Docetaxel, Anthracyclines	Marmé et al, 2012
5	CES2	rs11075646	-823 C>G	Métabolisme	Capecitabine	Ribelles et al, 2008
6	CYP1B1	rs1056836	Val432Leu	Métabolisme	Paclitaxel	Marsh et al, 2007, Rizzo R et al 2010
7	CYP2B6*4	rs2279343	Lys262Arg	Métabolisme	Cyclophosphamide	Bray et al, 2010
8	CYP2B6	rs2279345	18492 T>C	Métabolisme	Cyclophosphamide	Nakajima et al, 2007
9	CYP2B6*9	rs3745274	Gln172His	Métabolisme	Cyclophosphamide	Bray et al, 2010
10	CYP2B6	rs4802101	-750 T>C	Métabolisme	Cyclophosphamide	Nakajima et al, 2007
11	CYP2B6	rs4803419	15582 C>T	Métabolisme	Cyclophosphamide	Nakajima et al, 2007
12	CYP2B6	rs7254579	-2320 T>C	Métabolisme	Cyclophosphamide	Nakajima et al, 2007
13	CYP2B6*2	rs8192709	Arg22Cys	Métabolisme	Cyclophosphamide	Bray et al, 2010
14	CYP2B6*8	rs12721655	Lys139Glu	Métabolisme	Cyclophosphamide	Bray et al, 2011
15	CYP2D6*4	rs3892097	G>A	Métabolisme	Cyclophosphamide	Gor et al, 2010
16	CYP3A4*1 B	rs2740574	NC	Métabolisme	Cyclophosphamide	Gor et al, 2011
17	DNASE2B	rs3738573	Gln3His	Immunité	Docetaxel	Ha et al, 2011
18	DPD	rs2297595	Met166Val	Synthèse de l'ADN	5FU	Gross et al, 2008
19	ERCC1	rs11615	Asn118Asn	Réparation de l'ADN	Docetaxel	Isla et al, 2004
20	FCGR3A	rs11557632	Val158Phe	Immunité	Trastuzumab	Musolino et al, 2008
21	FGFR4	rs351855	Gly388Arg	RTK	Cyclophosphamide 5FU	Thussbas et al, 2006
22	GSTP1	rs1695	Ile105Val	Métabolisme	Epi/Doxorubicine, Cyclophosphamide	Yao et al, 2010, Oliveira et al 2010, Romero et al 2010
23	HER2	rs1136201	Ile655Val	RTK	Trastuzumab	Beauclair et al, 2007
24	HTR1E	rs3828741	Ala208Thr	Métabolisme	Paclitaxel	Ha et al, 2011
25	IL6	rs1800795	-174 G>C	Immunité	Cyclophosphamide	DeMichele et al, 2009
26	IL6	rs1800797	-597 G>A	Immunité	Cyclophosphamide	DeMichele et al, 2009
27	MDR1	rs1045642	Ile1145Ile/ C3435T	Transport	Anthracyclines	Cizmarikova et al 2010, Fajac et al 2010, Kafka et al 2010 Chew et al, 2011
28	MDR1	rs2032582	Ala893Thr/ G2677T	Transport	Docetaxel	Chew et al, 2011
29	MDR1	rs2229109	Ser400Asn /G1199A	Transport	Doxorubicine /Paclitaxel	Woodahl et al, 2009
30	MTHFR	rs1801131	Glu429/ Ala A1298C	Métabolisme Synthèse de l'ADN	Anthracyclines	Zarate et al, 2007
31	MTHFR	rs1801133	Ala222Val	Métabolisme Synthèse de l'ADN	Cyclophosphamide 5FU	Henriquez-Hernandez et al 2010
32	NOS3	rs1799983	Glu298Asp	Métabolisme	Cyclophosphamide	Choi et al, 2009
33	NOS3	rs2070744	-786 T>C	Métabolisme	Cyclophosphamide	Choi et al, 2010
34	NQO1	rs1800566	Pro149Ser	Métabolisme	Anthracyclines	Fagerholm et al, 2008

35	NQO2	rs1143684	Leu47Phe	Métabolisme	Doxorubicine	Jamieson et al, 2011
36	p53	rs1042522	Arg72Pro	Réparation de l'ADN	Anthracyclines	Xu et al, 2005, Henriquez- Hernandez et al 2010
37	PARP1	rs1136471	Lys940Arg	Réparation de l'ADN	Paclitaxel	Shiraishi et al, 2010
38	SHMT1	rs1979277	C1420T	Synthèse ADN	5FU, Bevacizumab	Budai et al, 2012
39	SLCO1B3	rs11045585	- 567A>G	Transport	Docetaxel	Chew et al, 2011
40	SOD2	rs4880	Val16Ala	Métabolisme	Cyclophosphamide	Glynn et al, 2009
41	VEGFA	rs699947	-2578 C>A	RTK	Bevacizumab	Schneider et al, 2008
42	VEGFA	rs833061	-1498 C>T	RTK	Bevacizumab	Loupakis et al, 2011
43	VEGFA	rs2010963	-634 G>C	RTK	Bevacizumab	Etienne-Grimaldi et al, 2011
44	VEGFA	rs3025039	-936 C>T	RTK	Bevacizumab	Etienne-Grimaldi et al, 2011
45	XPC	rs228001	Lys939Gln A>C	Réparation de l'ADN	Anthracycline	Yang et al, 2012
46	XRCC1	rs25487	Gln399Arg	Réparation de l'ADN	Cyclophosphamide 5FU	Jaremko et al, 2007

### **Tableau 1. SNP testés dans la cadre de l'étude GENEOM.**

Gène siège du SNP, référence SNP selon la SNP database, voie d'action, cytotoxique impliqué et références bibliographiques.

## IX. Génotypage

### A. Extraction de l'ADN

L'ADN génomique est extrait de manière automatisé via l'appareil MagNA Pure Compact System (Roche) à partir du tube de sang total puis quantifié par spectrophotométrie (densité optique : DO) pour s'assurer de la qualité de l'extraction. Il est ensuite conservé à 4 °C (**Figure 29.**)



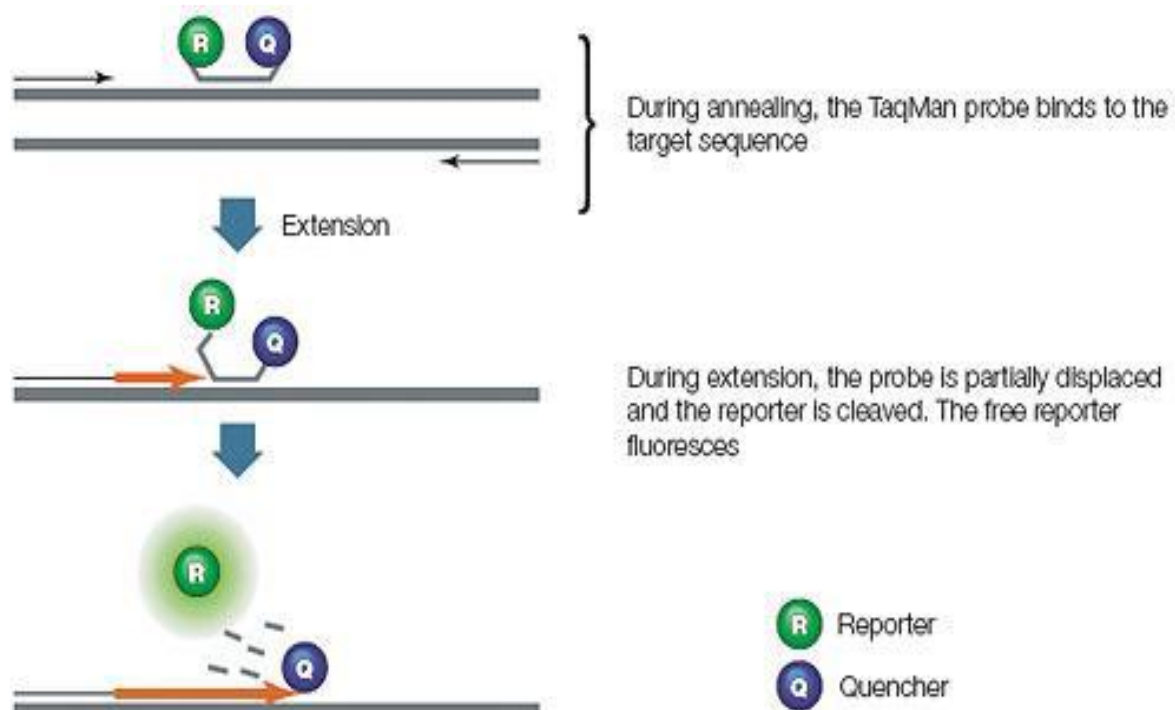
**Figure 29.** Méthodes d'extraction de l'ADN génomique.

### B. Principe du Génotypage

Le génotypage consiste à identifier une variation génétique à une position spécifique d'un gène contrairement au séquençage qui consiste en une analyse complète du gène. Dans le cas des SNP, il permet d'identifier des variants nucléotidiques. Il existe plusieurs techniques de génotypage des SNP, celle utilisée au LOMH dans le cadre de l'étude GENEOM est fondée sur la PCR en temps réel et notamment sur le principe de discrimination allélique avec l'appareil BioMark (Société Fluidigm). Deux types de sondes sont utilisées avec cet appareil dans le cadre de l'étude: les sondes Taqman (Life Technologies) et les sondes SNPtype (Fluidigm).

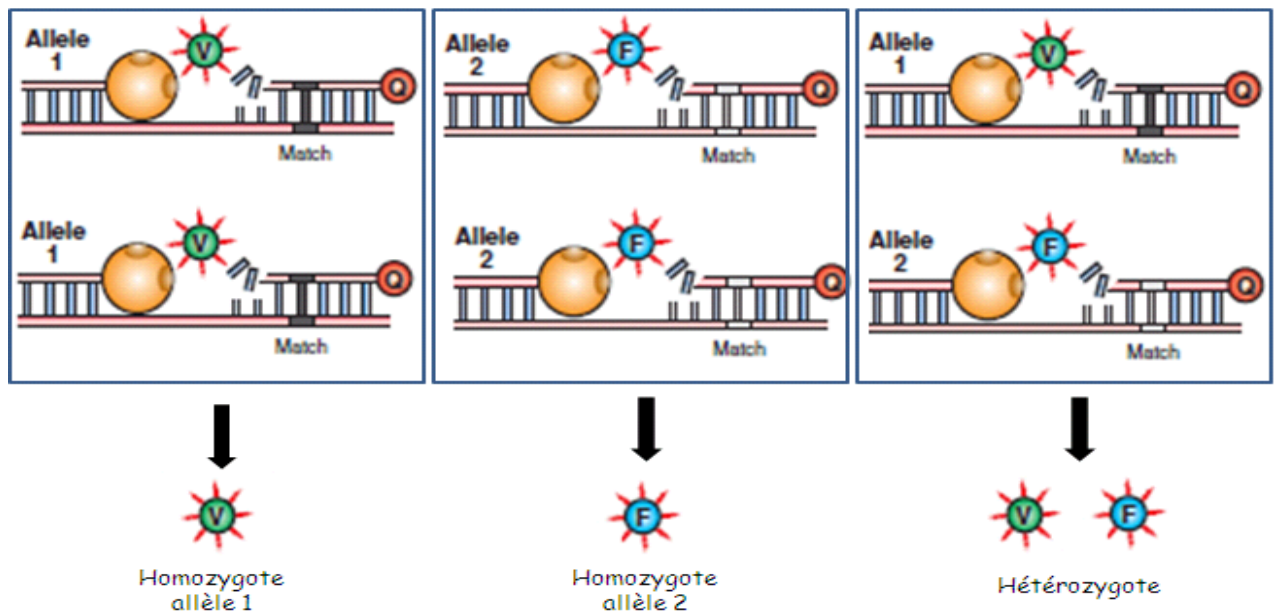
## 1. Sonde Taqman (Principe du FRET)

Il s'agit d'une sonde oligo-nucléotidique complémentaire de la séquence contenant le SNP qui est marquée par un reporter fluorescent lié à l'extrémité 5' et un quencher lié à l'extrémité 3'. Lorsque la sonde est intacte, le quencher limite la fluorescence du reporter. Lors de la PCR, après dénaturation de l'ADN, il y a hybridation de la sonde avec la séquence cible qui s'effectue entre les amorces de PCR. Lors de la phase d'élongation, la sonde est clivée par la Taqpolymérase qui possède une activité exonucléasique, entraînant la dissociation du couple quencher-reporter ce qui entraîne l'émission de fluorescence, et ôte la sonde du brin cible, permettant à la Taqpolymérase de poursuivre la réplication. Ainsi à chaque cycle de PCR, pour chaque amplicon, on assiste à l'émission de fluorescence qui augmente d'intensité au fur et à mesure des cycles **(Figure 30.)**



**Figure 30.** Principe général des sondes Taqman.

Pour le génotypage, on utilise deux sondes avec des reporters différents : une sonde complémentaire de l'allèle 1 avec un fluorophore **VIC** en 5' terminal, une autre complémentaire de l'allèle 2 avec un fluorophore **FAM** en 5' terminal. La mesure de la fluorescence émise permet de déduire les allèles portés par l'individu : homozygote pour l'allèle 1 si l'on ne mesure que la fluorescence VIC, homozygote pour l'allèle 2 si on mesure que la fluorescence FAM et hétérozygote si on mesure les deux fluorescences (**Figure 31**).

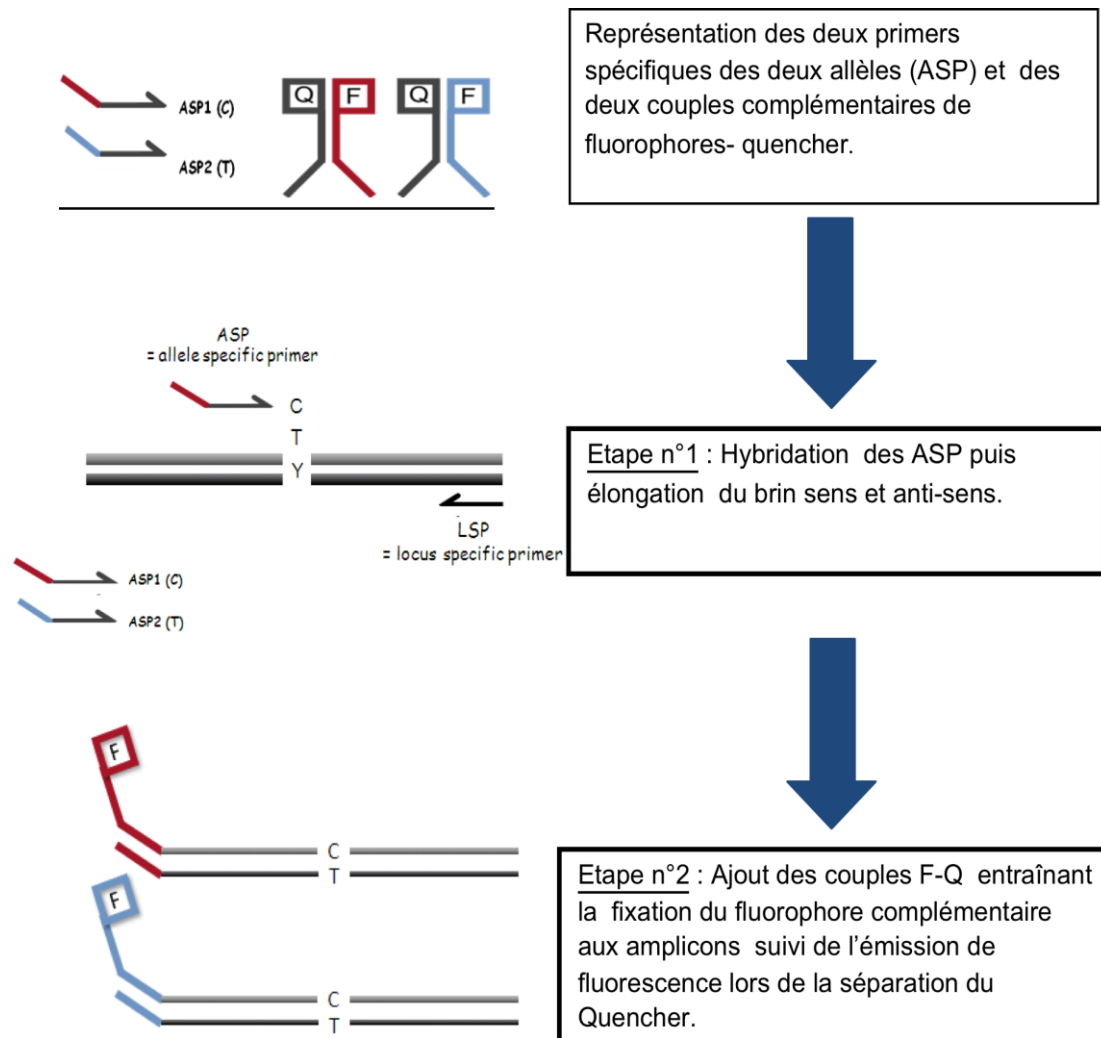


**Figure 31.** Principes des sondes Taqman pour le génotypage.

## 2. Sondes SNP type

La méthode SNPtype diffère de la méthode Taqman car ce sont les amorces (primers) qui servent de sondes : il s'agit de primers spécifiques de l'allèle ou du SNP dénommé ASP, alors que dans le cas des sondes Taqman, les primers utilisés pour la PCR sont spécifiques de la séquence cible mais pas du SNP (**Figure 32**). Deux primers ASP sont utilisés pour discriminer les allèles et un primer spécifique de la séquence (LSP) anti sens qui permet l'amplification dans les deux sens. L'ASP dont la séquence s'interrompt en 3' juste au niveau de la base responsable du polymorphisme porte à son extrémité 5' une séquence complémentaire du fluorophore. Le fluorophore est couplé à un quencher qui l'empêche d'émettre de la fluorescence. Après hybridation

du primer spécifique ASP et amplification par PCR, les amplicons produits possèdent une séquence complémentaire de celle du fluorophore et déplacent ainsi la liaison fluorophore-quencher. Le couple fluorophore-quencher complémentaire va se dissocier car le fluorophore a une affinité supérieure pour sa séquence complémentaire amplifiée par rapport au quencher.



**Figure 32.** Principe des sondes SNP Type.

Dans cette étude, les SNP ont été testés majoritairement avec les sondes SNPtype, le reste avec les sondes Taqman. En effet, il s'agit de sondes dont le coût est dix fois moindre que les sondes Taqman (40 vs 400 €), mais les sondes Taqman sont validées alors que les sondes SNP type, de commercialisation plus récente et désignées par la société Fluidigm à la demande du LOMH, doivent faire l'objet d'une validation (notamment sur une population de sujets non malades, ici de l'établissement français

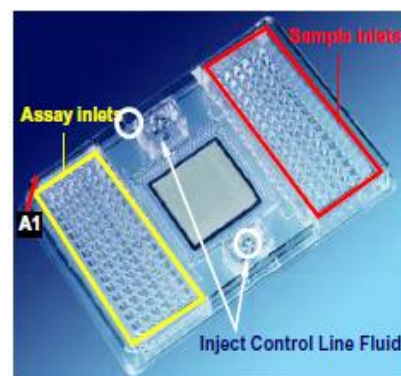


du sang ou EFS), avant leur utilisation sur les échantillons de malades. En effet, les sondes SNP type sont systématiquement testées sur une population non malade (200 échantillons de l'établissement français du sang) et les fréquences alléliques retrouvées sont comparées à la base de données dbSNP. En cas de discordance, la sonde SNP type n'a pas été validée et le SNP a été testé en utilisant une sonde Taqman. De même, il a été nécessaire de recourir aux sondes Taqman quand certaines sondes SNPtype ne peuvent être désignées par le fournisseur.

### C. Réaction de génotypage : Exemple pour les sondes SNPtype.

Nous détaillerons dans cette partie le principe de la réaction de génotypage uniquement pour les sondes SNPtype, celles ayant été majoritairement utilisées dans le cadre de ce travail de génotypage.

La réaction de génotypage est effectuée sur l'appareil Biomark Fluidigm (**Figure 33. partie gauche**) qui réalise des réactions de PCR en temps réel, miniaturisées sous forme d'une puce 96X96 (**Figure 33. partie droite**) permettant de tester 96 SNP sur 95 échantillons + 1 contrôle NTC (No Template control) générant 9216 données.



**Figure 33.** A gauche, photographie de l'appareil Biomark Fluidigm et à droite d'une puce ou micro-array: SNP Dynamic array 96X96.

## 1. Pré amplification spécifique de cibles ou Specific Target Amplification (STA).

Une étape de pré amplification des séquences comportant les SNP a été réalisée pour chaque prélèvement d'ADN afin de disposer d'une quantité importante de séquences cibles, ce qui améliore la détection de la fluorescence au cours de la PCR lors de la phase de génotypage. Cette étape n'est pas obligatoire mais a été réalisée par le laboratoire. Celle-ci est réalisée en utilisant un kit de pré-amplification. Elle se fait en trois étapes.

### a) Préparation des Primers

Dans une plaque 96 puits a été ajouté dans chaque puit : les 2 primers sens et anti sens spécifiques de la séquence contenant le SNP et nommés respectivement STA (Specific Target Amplification primer) et LSP (Locus Specific primer), le tampon de suspension formant le **10XSNPtype STA primer Pool** (**Figure 34, tableau a**).

### b) Ajout de l'ADN génomique et du matériel nécessaire à la PCR

**0.5 µl du 10XSNPtype STA primer pool** sont prélevés auquel on ajoute le Master Mix (Polymérase, bases A, T, G, C, magnésium), de l'eau pour PCR, l'ensemble constituant **le STA premix**, puis on additionne 1,25µl de chacun des ADN génomique (60 ng/µl), soit un volume final par puit de 5 µl. (**Figure 34, tableau b**). Un puit reste vierge en ADN servant de contrôle (NTC).

### c) Insertion de la plaque dans le thermocycleur

18 cycles de PCR de pré amplification sont réalisés selon un protocole de cycle de température déterminé (95°C-15s ; 60°C - 4min). Les produits de pré amplifications sont ensuite dilués au 1/100 avec un tampon de suspension d'ADN puis conservés à -20 ° si la réaction de PCR est effectuée plus tard.

Tableau a)

Composants	Volume (µL)
100µM SNPtype Assay STA Primer	2(x44=88 total)
100µM SNPtype Assay LSP	2(x44=88 total)
Tampon de suspension de l'ADN	224

10XSNPtype  
STA Primer  
Pool

Tableau b)

Composants	Volume (µL)	STA Premix pour 1 puce 96.96 (µL)
10XSNPtype STA Primer Pool	0.5	60
Master Mix (Qiagen, PN206143)	2.5	300
Eau pour PCR	0.75	90
ADN génomique	1.25	
<b>Total</b>	<b>5.0</b>	<b>450.0</b>

Prélèvement de **0.5µl** de **10XSNPtype STA primer Pool** puis ajout de l'eau et du master mix ce qui forme le **STA Premix** auquel on ajoute de l'ADN génomique.

STA  
premix

### **Figure 34. Etapes de pré amplification de cibles.**

Tableau a) Préparation des amorces ou primers pour la pré amplification spécifique de cible ou STA, Tableau b) Adjonction de l'ADN génomique et du matériel nécessaire à la PCR aux amorces.

## **2. Réaction de génotypage : Préparation de la puce en 2 étapes**

### **a) Préparation des sondes SNP type.**

Dans une plaque 96 puits, chaque puit correspondant à un SNP étudié, on réalise un mélange comportant : 3 µl d'ASP1/ASP2, 8µl de LSP, 29 µl de tampon de suspension d'ADN pour un volume total de 40 µl constituant le **SNPtype assay mix (Figure 35, tableau c)**. On prélève 1 µl de ce mix auquel est associé **2.5 µl de tampon de chargement** et **1.5 µl d'eau** pour PCR soit un volume final pour chaque sonde SNP type de 5µl **(Figure 35, tableau d)**.

Tableau c)

Composants	Volume (µL)	Concentration finale
SNPtype Assay ASP1/ASP2 (100 µM)	3.0	7.5µM
SNPtype Assay LSP (100 µM)	8.0	20µM
Tampon suspension ADN	29.0	
<b>Total</b>	<b>40.0</b>	



SNPtype Assay Mix

On prélève 1 µl de SNPtype Assay mix puis ajout de l'eau et du tampon de chargement.

Tableau d)

Composants	Volume (µL)	Volume pour 96 puits (µL)
SNPtype Assay Mix	1.0	
Eau pour PCR	1.5	180
Tampon de Chargement 2X PN 85000736	2.5	300
<b>Total</b>	<b>5</b>	

### **Figure 35. Préparation des sondes SNPType.**

Tableau c) Préparation des sondes SNPType avec mélange des 2ASP1/ASP2, du LSP et du tampon de suspension de l'ADN. Tableau d) prélèvement de 1µl du mix du tableau c) avec adjonction de l'eau pour PCR et du tampon de chargement.

#### **b) Préparation des échantillons**

Dans une plaque 96 puits, 2.5 µl d'ADN génomique préalablement amplifié ont été déposés avec 3.5 µl de Sample Pré mix (contient le tampon de chargement, les 2 fluorophores couplés à leur Quencher, l'eau pour PCR, du ROX qui est un fluorophore qui va servir de normalisateur interne pour les résultats, du master mix qui contient la polymérase, les bases, le magnésium) **(Figure 36. Tableau e)**. Un puits servant de contrôle NTC ne contient pas d'ADN.

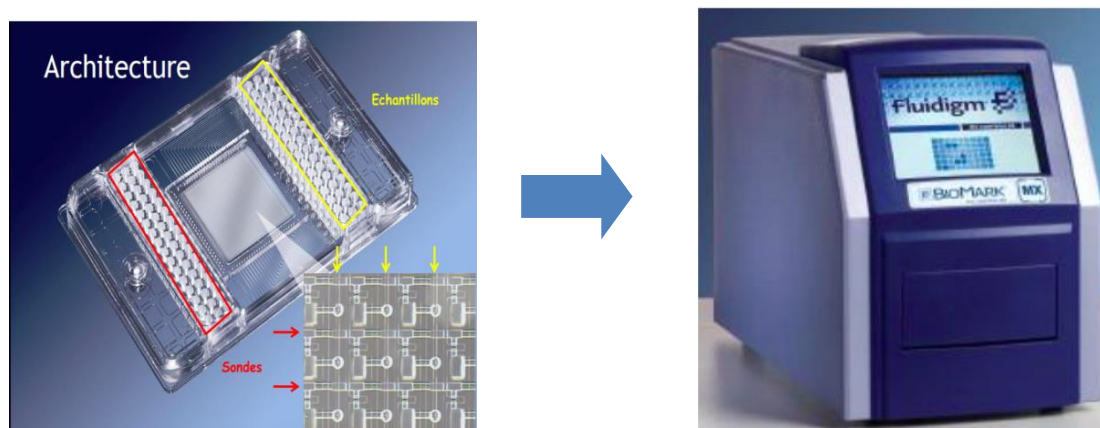
Composants	Volume par puit (µL)	Volume pour 96 puits (µL)
Master Mix 2X (Biotum, PN31005)	3	360
Tampon de chargement 20X (Fluidigm, PN100-3425)	0.3	36
Fluorophore-Quencher (Fluidigm, PN100-3402)	0.1	12
ROX (50 X) (Invitrogen, PN12223-012)	0.036	4.3
Eau pour PCR	0.064	7.7
ADN génomique	2.5	
Volume total	6	420

### **Figure 36. Préparation des échantillons.**

Tableau e) adjonction de l'ADN génomique préalablement amplifié lors de l'étape précédente avec différents éléments nécessaire pour la PCR (Sample Pré mix).

#### **c) Géotypage**

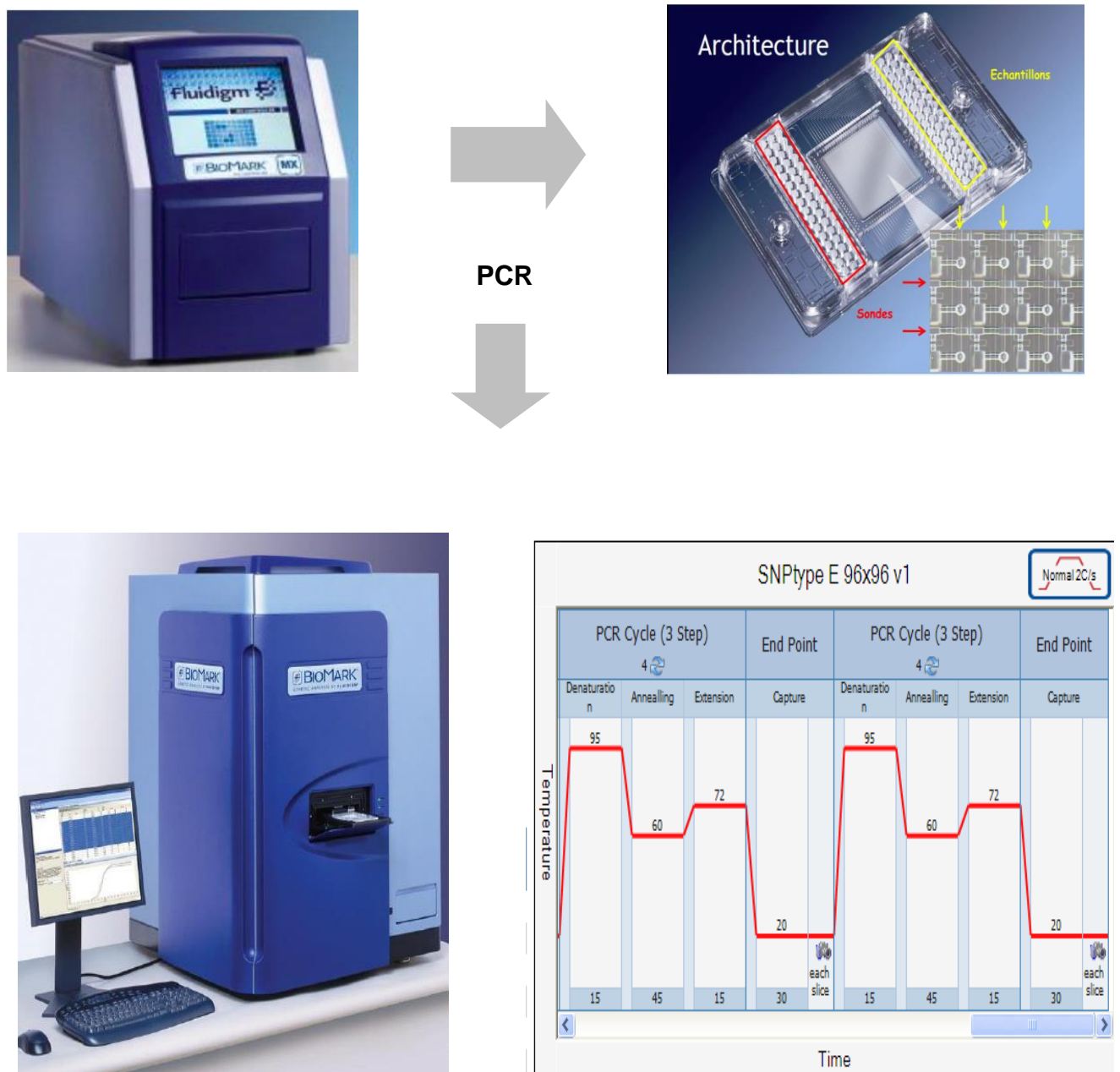
Chaque sonde (4µL, **Figure 35, Tableau d**) est déposée dans la partie gauche de la puce et chaque échantillon est réparti (5µL, **Figure 36, Tableau e**) dans la partie droite de la puce (**Figure 37a**). L'IFC Controller (**Figure 37b**) permet d'acheminer chacun des 96 SNP et 96 échantillons dans les 9216 cellules de réaction via un système de canaux de fluides fait d'élastomères (technologie NanoFlex). Des valves fonctionnant par pression permettent d'individualiser les chambres réactionnelles. Cette réaction dure 50 minutes environ.



### **Figure 37. Représentation d'une puce et Appareil IFC Controller.**

a) Représentation d'une puce ou micro-array : à gauche en rouge, les sondes SNP et à droite en jaune, les échantillons comprenant les ADN génomiques des patientes préalablement amplifiées. b) Chargement des échantillons dans l'IFC Controller permettant d'amener chacun des SNP et chacun des ADN des patientes dans une cellule de réaction.

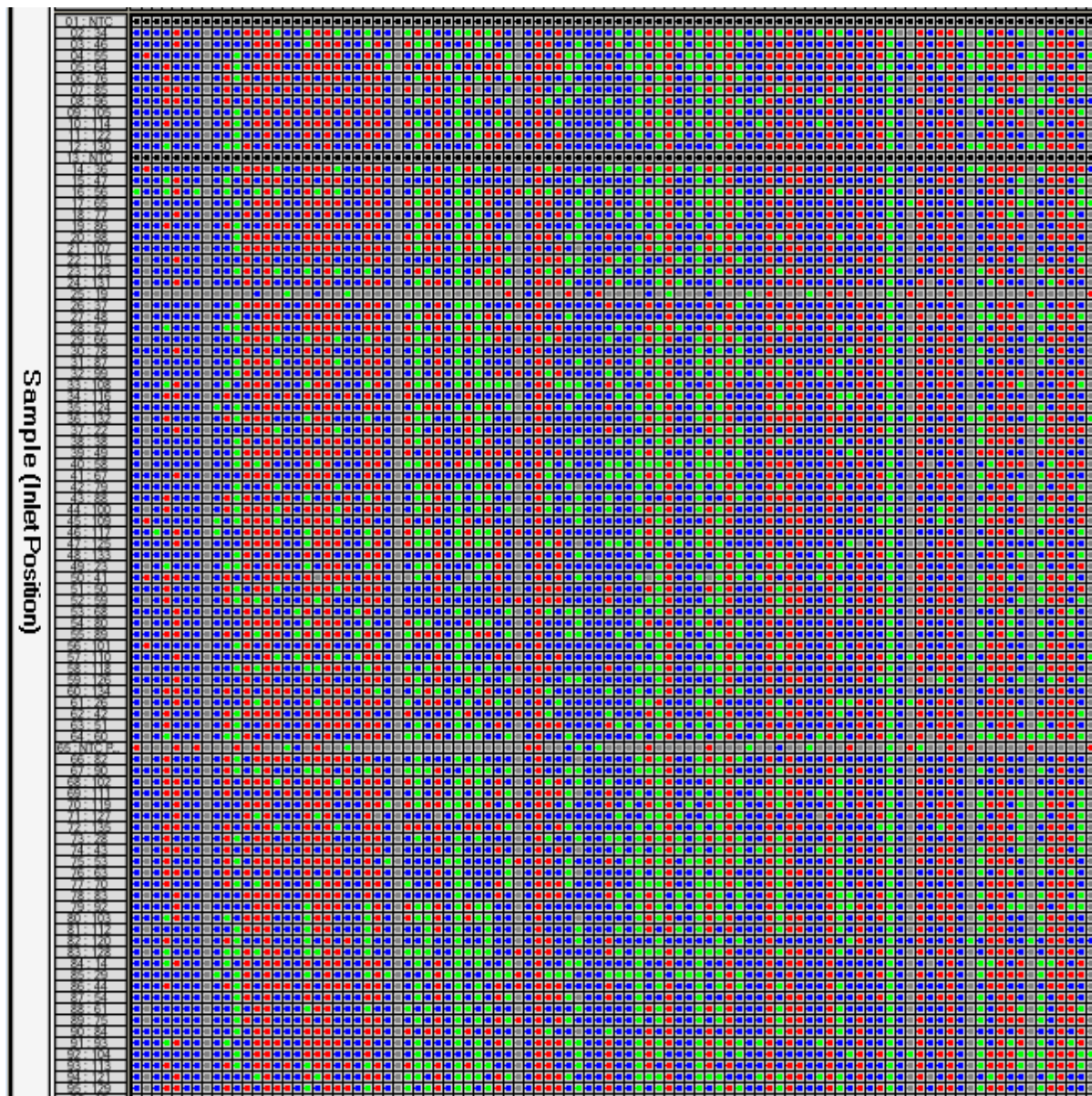
La puce chargée en échantillons et sondes (**Figure 38**) est sortie de l'IFC controller puis placée dans l'appareil Fluidigm. Celui-ci comporte un thermocycleur permettant de réaliser les cycles de températures pour les réactions de PCR (durée 2 H). L'appareil détecte la fluorescence émise lors des cycles en temps réel pour les sondes Taqman, mais pour les sondes SNP type, la liaison fluorophore-amplicons n'a lieu qu'à 20 °, ce qui nécessite d'abaisser la température lors des cycles de PCR. Les captures de fluorescence sont réalisées tous les 4 cycles à partir du 26<sup>ème</sup> cycle, jusqu'au 42<sup>ème</sup> cycle soit 5 captures (**Figure 38**).



**Figure 38.** Représentation de l'IFC Controller, de la puce et du thermocycleur Fluidigm permettant les réactions de PCR.

Figure 38 : Sortie de la puce de l'IFC controller après un cycle de 50 minutes ayant permis de répartir chacune des sondes et des échantillons dans une chambre de réaction, puis la puce est placée dans le thermocycleur Fluidigm où ont lieu les réactions de PCR.

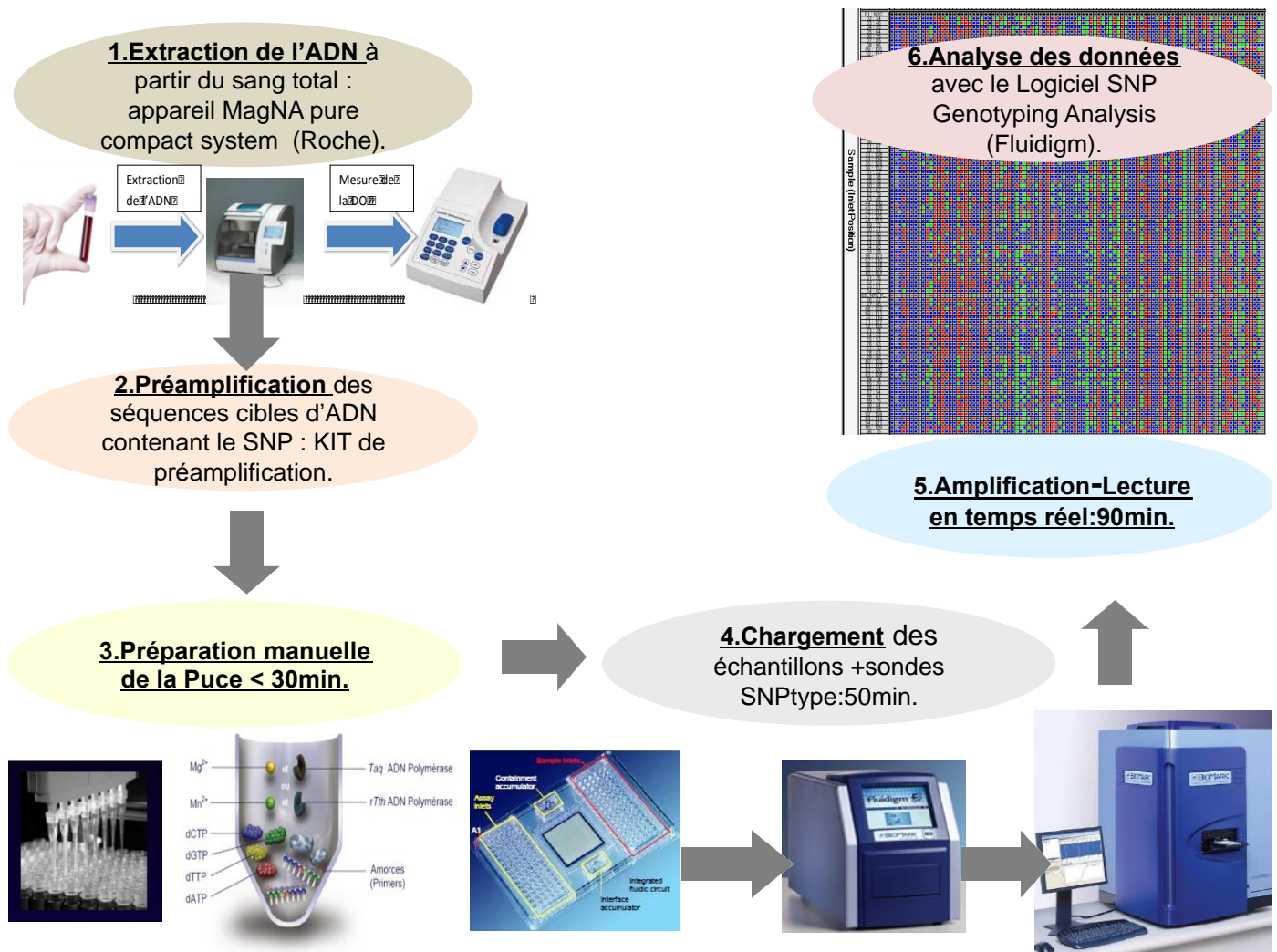
Les captures de fluorescence effectuées offrent ainsi une image sous forme d'une Call Map viewer de la puce de Génotypage **(Figure 39)**.



**Figure 39.** Call Map Viewer pour une puce de SNP 96x96.

Chaque colonne correspond à un SNP, chaque ligne à un échantillon d'ADN d'une patiente. Chaque carré définit le statut allélique d'un patient pour un SNP donné : homozygote XX si rouge, homozygote YY si vert, hétérozygote XY si bleu

Un résumé des différentes étapes de la réaction de génotypage est donnée dans la figure suivante (**Figure 40**).



**Figure 40.** Représentation schématique des différentes étapes du génotypage.

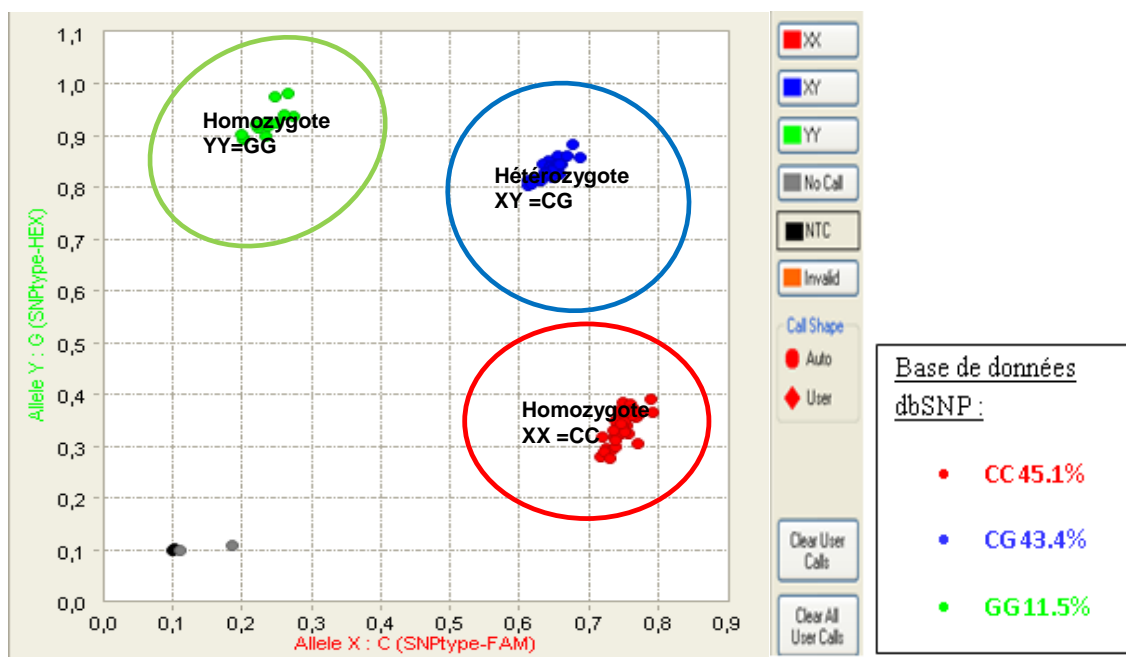
### D. Analyse des données

L'acquisition et l'analyse des données sont effectuées par le Logiciel SNP Genotyping Analysis (Fluidigm).



## 1. Validation des sondes sur la population non malade de l'EFS et comparaison des fréquences alléliques avec la base de données dbSNP

Pour chaque SNP, on obtient un diagramme d'intensité de fluorescence pour les deux fluorophores VIC et FAM qui permet de séparer les échantillons testés en 1, 2, ou 3 populations : homozygotes XX, ou YY, hétérozygotes XY (**Figure 41**). L'intensité de fluorescence doit être supérieure au minimum à 0.5 (unités arbitraires de fluorescence, après normalisation par le ROX). Chaque point correspond à un échantillon (n=96). Le point noir correspond au contrôle NTC. Le puit NTC (No Template control) ne contient pas d'ADN, l'amplification ne doit pas avoir lieu et aucune fluorescence ne doit être détectée. On observe alors une ligne grise sur la call Map Viewer de la puce. La fluorescence du VIC et du FAM est normalisée par rapport à un témoin interne fluorescent le ROX, et au contrôle NTC.



**Figure 41.** A gauche : Exemple de diagramme d'intensité de fluorescence pour une sonde SNP type donnée, la sonde n° 15 (rs3738573) testée sur un échantillon de non malades (EFS) et à droite comparaison des fréquences alléliques obtenues à la base de données dbSNP.

Deux scores sont déterminés : (**Figure 42**)

- le call rate
- le score d'auto confiance

Le call rate correspond à la certitude avec laquelle le logiciel donne les résultats, en relation directe avec l'intensité de fluorescence, tandis que l'auto confiance correspond à la dispersion au sein des populations. En effet, chacun des groupes doit être séparé car en cas de dispersion importante, cela signifie que certains échantillons sont positionnés à la limite entre deux groupes, et donc que le génotype ne peut être affirmé avec certitude. Ces deux scores doivent être supérieures à 95%. Ils permettent par ailleurs de choisir la meilleure capture parmi les 5 captures au cours des cycles de PCR. Dans le cadre de l'étude, le laboratoire a déterminé que le meilleur temps de capture pour la plupart des sondes était le temps X=2.

Experiment Information				Call Summary							
SNP	SNP Assay and Allele Names			Overall		Categorized Calls					
ID	Assay	Allele X	Allele Y	Call Rate %	Auto Confi...	# of XX	# of XY	# of YY	# of NTC	# of No Call	# of Invalid
SNP13	rs2032582	G	T	100,00	99,84	43	40	11	2	0	0
SNP14	rs12721655	A	G	97,87	100,00	92	0	0	2	2	0
▶ SNP15	rs3738573	C	G	97,87	99,97	38	40	14	2	2	0

**Figure 42. Score d'auto confiance et call rate pour le SNP testé n°15 ou rs3738573 dans la population EFS.**

Ici les deux scores sont bien supérieures à 95% ce qui garanti la validité des résultats. Dans l'exemple, on retrouve des fréquences génotypiques identiques à la base de données dbSNP : Allèle X = C Allèle Y =G, sur 92 échantillons :

**-38XX=CC soit 38/92=41% versus 45.1% dans la dbSNP.**

**-40XY=40CG soit 40/92=43% versus 43.4%**

**-14YY=14GG soit 14/92=15% versus 11.5%**

Cela permet de valider chaque sonde SNP type, en l'occurrence la sonde SNPtype 15 (rs3738573) dans l'exemple et d'effectuer le génotypage sur la population de malades de l'étude GENEOM.

## 2. Testing des SNP sur la population GENEOM

Une fois validée sur la population non malades de l'EFS, chaque sonde SNPtype, ici la sonde SNPtype 15 ou rs3738573 peut être testée sur la population de malades atteintes cancers du sein et traitées par chimiothérapie adjuvante. Le diagramme de fluorescence (**Figure 44**) met en évidence les 3 génotypes possibles avec des scores d'auto confiance et de call rate satisfaisant et valide car supérieure à 95% (**Figure 43**).

Experiment Information				Call Summary							
SNP	SNP Assay and Allele Names			Overall		Categorized Calls					
ID	Assay	Allele X	Allele Y	Call Rate %	Auto Confi...	# of XX	# of XY	# of YY	# of NTC	# of No Call	# of Invalid
SNP13	rs2032582	G	T	98,95	98,84	36	41	17	1	1	0
SNP14	rs12721655	A	G	98,95	99,94	94	0	0	1	1	0
▶ SNP15	rs3738573	C	G	98,95	99,92	47	44	3	1	1	0

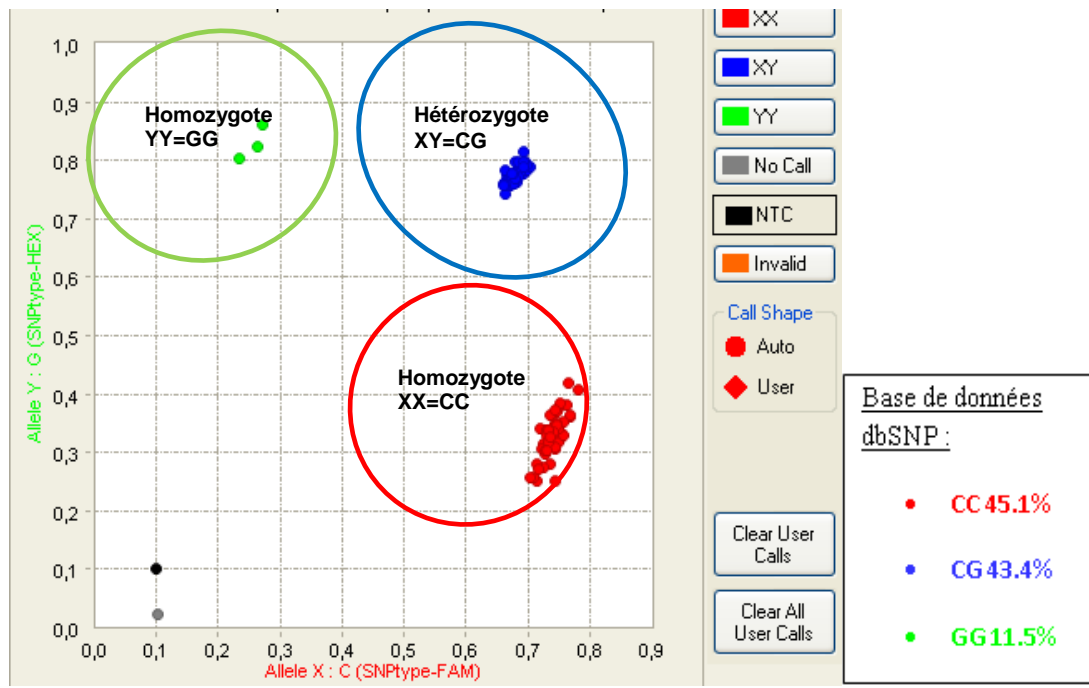
**Figure 43. Score d'auto confiance et call rate dans la population de patientes malades de l'étude GENEOM.**

Comme dans l'exemple précédent sur la population de non malades de l'EFS, les 3 populations sont clairement séparées avec une faible dispersion au sein de chaque population permettant de valider le génotypage effectué pour ce SNP rs3738573.

On détermine la fréquence de chaque génotype dans la population malades de 94 patientes de la façon suivante : le nombre de patients XX est de 47, XY : 44 et YY : 3 :

Fréquence des génotypes :

- Génotype XX :  $XX / (XX+XY+YY) = 50\%$
- Génotype XY:  $XY / (XY+YY+XX) = 47\%$
- Génotype YY:  $YY / (YY+XY+XX) = 3\%$



**Figure 44.** A gauche : diagramme d'intensité de fluorescence pour la sonde SNP type donnée, la sonde n°15 (rs3738573) testée sur un échantillon de patientes de l'étude GENEOM et à droite comparaison des fréquences alléliques obtenues à la base de données dbSNP.

Les différences de fréquences parfois observées entre les populations saines de l'EFS et celle de malades de l'étude GENEOM peuvent s'expliquer par une taille différente des échantillons de populations et un éventuel SNP associé au risque car il s'agit d'une comparaison d'une population malade et d'une population non malade.

## X. Analyse statistique

- **Concernant les dates**, certaines approximations ont été faites si nécessaire afin de pouvoir calculer des délais entre 2 dates. Lorsque le mois était inconnu, le mois de juin (situé au milieu d'une année) est choisi. Lorsque le jour est inconnu, le 15 (situé au milieu du mois) est choisi. Lorsque « début 2001 » par exemple est indiqué, le 15/01/2001 est choisi. Lorsque « fin 2001 » par exemple est indiqué, le 15/12/2001 est choisi.
- Les **caractéristiques des patients** sont présentées avec les méthodes classiques de la statistique descriptive : fréquences et pourcentage pour les variables catégorielles ; médianes, valeurs extrêmes, moyennes et écart-types pour les variables continues.
- La **survie sans récurrence (PFS)/(MFS)** est estimée par la méthode de Kaplan-Meier en tenant compte des délais depuis la date de chirurgie. La survie sans récurrence est calculée en considérant le temps jusqu'à la récurrence, les patients vivants sans récurrence sont censurés à la date des dernières nouvelles.
- **L'association entre la survie et les caractéristiques des patients** est étudiée à l'aide du test du log- Rank.
- **La recherche de facteurs pronostiques** sur la survie sans récurrence a été étudiée avec le modèle de Cox uni varié dans un premier temps. Ensuite, tous les facteurs significatifs en univarié ont été étudiés à l'aide d'un modèle de Cox multivarié. Pour les analyses multivariées, ont été incluses les variables significatives en univarié au seuil de 5% ( $p < 0.05$ ) mais aussi les variables non significatives uni variées au seuil de 10% ( $p < 0.10$ ).
- **Le génotype des SNP tout d'abord isolément (ex : AA vs AG vs GG) puis de façon combiné :**

- **AA vs AG vs GG**
- **GG vs AA-AG**
- **AG vs AA-AG**

**a été corrélée au délai à la récurrence (PFS et MFS) en utilisant le même modèle de régression logistique de Cox univarié puis pas à pas multivarié (après vérification que l'équilibre de Hardy-Weinberg était respecté).**

Prenons l'exemple d'un allèle A sauvage et d'un allèle variant G. Pour chaque génotype A versus le génotype G, il est ainsi estimé ainsi le hazard ratio de rechute associé au génotype A (PFS ou MFS) en prenant comme référence le génotype G. Par exemple pour AG vs AA-GG, l'HR correspond au risque de rechute associé au génotype AG par rapport aux AA-AG. Un HR <1 signifie que les AA ont un risque de rechute moindre et si >1 un risque de rechute augmentée.

**Un score pronostique** sur la PFS/MFS a été construit à partir de l'analyse multivariée.

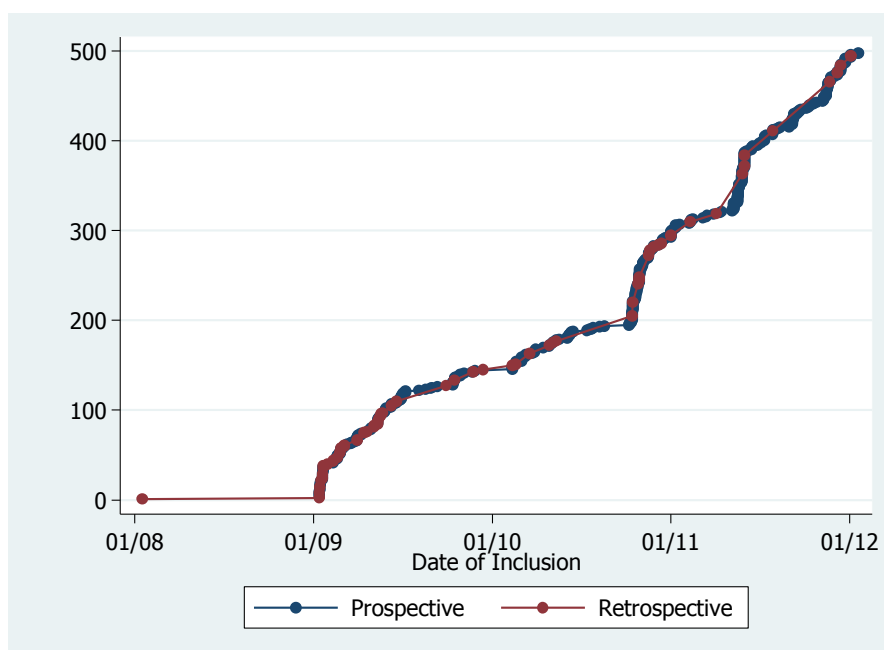
- **Le logiciel utilisé était Stata v13.1 (StataCorp. 2013. Stata Statistical Software: Release 13. College Station, TX: StataCorp LP).**

## RESULTATS

### I. Disposition des patientes : Population totale

#### A. Patientes incluses dans l'étude GENEOM adjuvant

Au total, 498 patientes éligibles en adjuvant ont été incluses dans l'étude entre janvier 2008 et janvier 2012. Parmi elles se trouvent, deux cohortes, une **cohorte rétrospective** (70 patientes) et **une prospective** (428 patientes). La cohorte rétrospective correspond aux patientes qui ont été incluses à postériori, après leur chimiothérapie adjuvante, au décours des consultations de surveillance ou au moment de leur récurrence. La cohorte prospective correspond aux patientes pour qui le génotypage a été effectué pendant la chimiothérapie adjuvante. La **figure 45** illustre les courbes d'inclusion pour chacune des deux cohortes.



**Figure 45 : Courbes d'inclusions des deux cohortes de patientes. Rétrospective (rouge) et Prospective (bleu).**

Concernant les chimiothérapies adjuvantes reçues, sur l'ensemble de la population, 309 sont traitées par FEC100 + TAXOTERE (62%), 33 patientes sont traitées par anthracyclines seules de type FEC100 uniquement (6.6%) et 109 patientes ont reçu du FEC 100+ TAXOTERE + Herceptin (22%). Le **tableau 2** donne la répartition des chimiothérapies adjuvantes reçues dans cette étude.

Chimiothérapie adjuvante		N=498	
Protocoles, n (%)			
<b>FEC 100 + Taxotere</b>	<b>309</b>	<b>(62%)</b>	
<b>FEC 100 + Taxotere + Herceptin</b>	<b>109</b>	<b>(21.9%)</b>	
FEC 100	33	(6.6%)	
Autres*	47	(9.4%)	

**Tableau 2. Répartition dans la population totale des protocoles de chimiothérapie adjuvante reçus.**

Les chimiothérapies dites autres\* correspondent aux chimiothérapies suivantes et le nombre de patientes concernées est indiqué entre parenthèses.

- CMF (1)
- FARMORUBICINE ENDOXAN (1)
- FARMORUBICINE HEBDOMADAIRE (1)
- FEC 100 EPIRUBICINE ENDOXAN (1)
- FEC 100 FEC 50 (3)
- FEC 100 FEC 75 (1)
- FEC100 HERCEPTIN (3)
- FEC 100 TAXOL (1)
- FEC 100 TAXOTERE 30 mg/m<sup>2</sup> (1)
- FEC 50 (15)
- FEC 50 FEC 75 (2)
- FEC 50 TAXOTERE (2)
- FEC 50 TAXOTERE HERCEPTIN (1)
- FEC 75 (1)
- HERCEPTIN TAXANE+EPIRUBICINE (1)
- HERCEPTIN TAXOTERE ENDOXAN (2)
- HERCEPTIN TAXOTERE EPIRUBICINE (1)
- PROTOCOLE FNC : 5FU NOVANTRONE CYCLOPHOSPHAMIDE (1)
- TAXOTERE ADRIAMYCINE + CYCLOPHOSPHAMIDE (1)
- TAXOTERE ENDOXAN (4)
- TAXOTERE ENDOXAN ADRIBLASTINE (1)
- TAXOTERE HERCEPTIN (1)



La population traitée par FEC 100 + Taxotère (309 patientes) a été appelée **population n°1** et la population traitée par FEC 100 + Taxotère + Herceptin (n=109 patientes) représente la **population n°2**. Les résultats de l'étude sont présentés séparément pour chacune des populations étudiées.

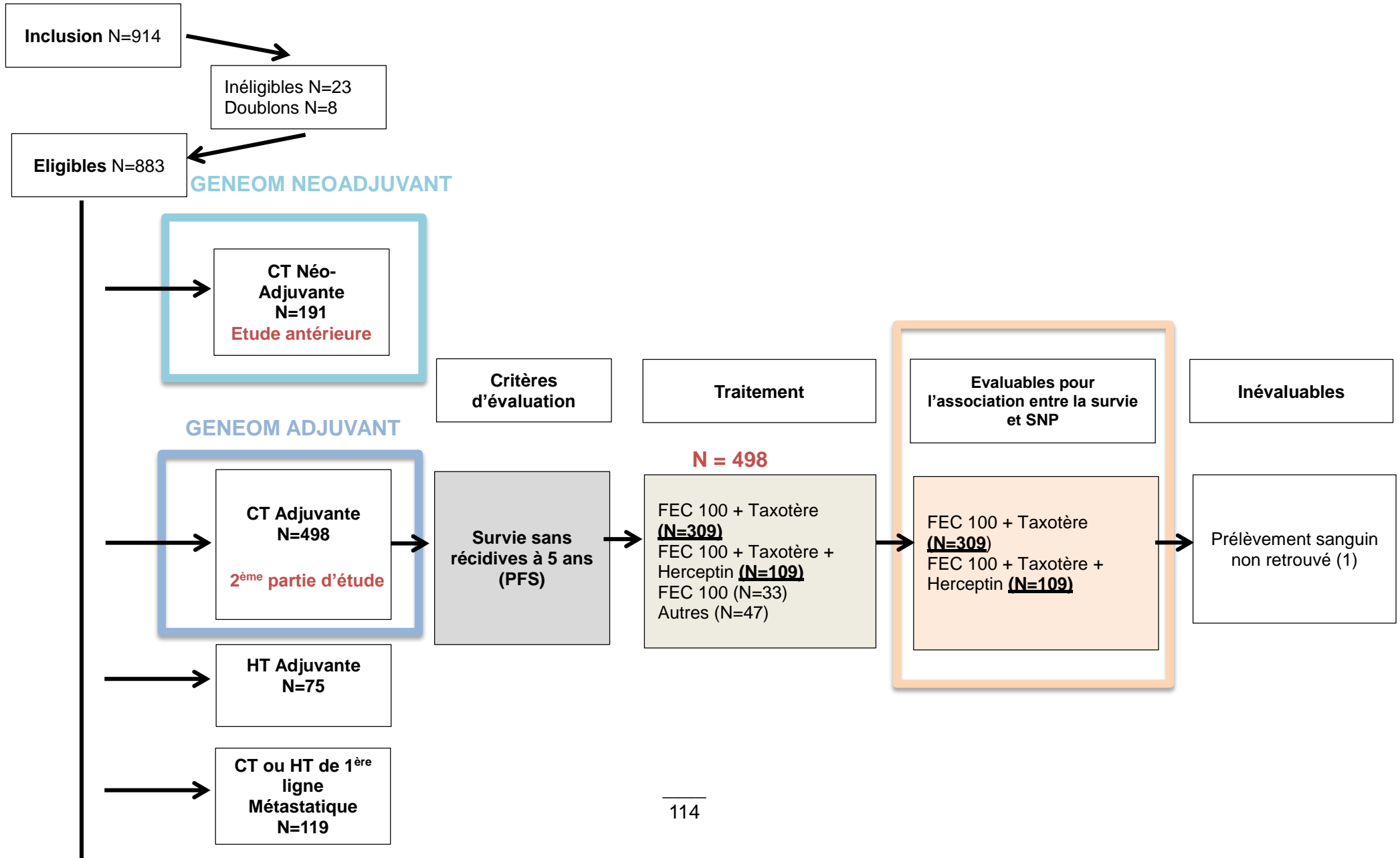
**Nous avons choisi d'étudier l'association des SNP avec le délai à la récurrence uniquement pour la population n°1 et n°2, ceci afin d'avoir une population homogène, en écartant les patientes ayant certes reçues des anthracyclines et ou des taxanes, mais avec des protocoles différents que le FEC 100-Docetaxel.**

## **B. Patientes évaluables : Flow Chart GENEOM adjuvant**

En situation adjuvante, sur les 498 patientes incluses :

- 497 patientes sont évaluables
- 1 patiente est non évaluable : prélèvement sanguin pour l'analyse génomique non retrouvé : patiente **#241**, mais patiente traitée par FEC 100 uniquement, non incluse donc dans la population n°1 ou n°2)

**Figure 46 : Flow Chart de l'étude GENEOM**



## II. Population traitée par FEC100-Docetaxel (population n°1).

### A. Caractéristiques démographiques et tumorales initiales.

Pour rappel, la définition respective des status Ki67+, RE+, RP+, HER2+, triples négatives utilisés dans cette étude est la suivante :

- Le **KI67** est considéré comme positif si le pourcentage de cellules marquées est supérieure ou égal à 15%.
- Le **statut HER2** est défini comme positif si :
  - IHC +++ ou
  - IHC ++ et FISH ou CISH +
- Le **statut RE ou RP** est dit positif si le pourcentage de cellules marquées est supérieure ou égal à 10%
- Le **statut hormonal** est considéré comme positif (RH+) si : RE + ou RP + et considéré comme négatif (RH-) si : RE - et RP -.
- Une **tumeur triple négative** est définie par un status HER2 négatif et RE inférieur à 10% et RP inférieur à 10%.

#### 1. Caractéristiques démographiques des patientes

Au total, 309 patientes sont traitées par FEC 100 + Taxotere. Sur le plan des caractéristiques démographiques, l'âge médian au diagnostic est de **51 ans** (21-74 ans) et le délai médian entre l'histologie et l'inclusion est de 5.8 mois (0.7-150.6 mois). Le [tableau 3](#) montre la répartition des patientes par tranche d'âge.

Age	Patientes N=307	Pourcentage
< 35 ans	16	5.2%
35 - 44 ans	60	19.5%
45 - 54 ans	112	36.5%
≥ 55 ans	119	38.8%
<i>Missing</i>	2	

**Tableau 3.** Distribution des âges dans la population n°1.

## 2. Caractéristiques tumorales initiales.

### a) Stade tumoral TNM initial.

La taille tumorale médiane est de **18 mm** avec la plus petite tumeur mesurant 2 mm et la plus volumineuse 80 mm. Sur le plan de la classification TNM, la majorité des tumeurs sont de stade inférieur à 5cm soit des tumeurs <T3 avec respectivement 38.8% et 33.3% de tumeurs **T1 et T2**. Une très faible proportion de la population traitée par FEC100-TAXOTERE présentent des tumeurs volumineuses de plus de 5 cm avec 5.2% de tumeurs classée T3. Seul 5 patientes (1.6%) avait un cancer du sein dit localement avancé, dont 4 avec une atteinte de la paroi thoracique T4a et 1 patiente avec des nodules de perméations T4b. Une partie des patientes présentaient des tumeurs initialement non mesurables ou non palpables dites infra cliniques, avec 17.2% de stade T0.

Sur le plan ganglionnaire, suite à l'évaluation clinique ou iconographique initiale, la grande majorité de la population, soit 80.5% présentait aucun signe d'envahissement ganglionnaire axillaire. Moins de 15% avaient dès le diagnostic initial une atteinte ganglionnaire de type N1. Les atteintes tumorales ganglionnaires massives avec une forte « maladie » régionale ganglionnaire étaient rares : seule 2 patientes présentaient une atteinte ganglionnaire importante avec 1 patiente N2 et 1 patiente N3. Le statut ganglionnaire initiale était inconnu, Nx dans moins de 5% des cas (4.2%). Les caractéristiques tumorales sont résumées dans le **tableau 4.**

### b) Caractéristiques anatomopathologiques initiales sur biopsies.

Les caractéristiques anatomopathologiques sont disponibles sur biopsie et sur pièce opératoire. Les données sur biopsie dans la population 1 ont été analysées pour 302 des 309 patientes mais afin de simplifier les résultats, nous ne présentons que les résultats finaux histopathologiques sur la pièce opératoire de mastectomie et de ganglion sentinelle +/- curage. Cependant, à souligner une bonne concordance globale entre la biopsie initiale et les résultats finaux après chirurgie, notamment

pour le type histologique, la différenciation et le grade SBR, le statut hormonal, le statut triple négatif.

**4.**

<b>Caractéristiques de la tumeur initiale</b>		<b>N = 309</b>	
Dimensions (mm)		N =290	
Médiane (range)		<b>18</b> (2 – 80)	
<i>Missing</i>		19	
<b>Coté</b>		<b>N = 308</b>	<b>Pourcentage</b>
Droit		137	44.3%
Gauche		163	52.8%
Bilatéral		8	2.6%
<i>Missing</i>		1	
<b>Classification UICC</b>		<b>N = 308</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>T, n (%)</b>			
T0		53	17.2%
T1		120	<b>38.8%</b>
T2		103	<b>33.3%</b>
T3		16	5.2%
T4		5	1.6%
TX		7	2.3%
Tis		4	1.3%
<i>Missing</i>		1	
<b>N, n (%)</b>			
N0		248	<b>80.5%</b>
N1		45	<b>14.6%</b>
N2		1	<1%
N3		1	<1%
NX		13	4.2%
<i>Missing</i>		1	

**Tableau**

### **Caractéristiques des tumeurs initiales dans la population FEC100-**

#### **Docetaxel.**

##### \*Détail T1 (n=120):

- T1 (sans précision) (55)
- T1a (1)
- T1b (12)
- T1c (52)

##### \*Détail T4 (n=5):

- T4a (4)
- T4b (1)

## B. Caractéristiques de la chirurgie.

Au total, environ 60% des patientes ont bénéficié d'une mastectomie partielle et 40.4% d'une mastectomie totale. Une évaluation sentinelle axillaire a concerné les 2/3 (59.6%) de la population (initialement considérée pour rappel à plus de 80% N0 clinique/échographique). Un curage axillaire a quant à lui été effectué dans 80.3% des cas, soit d'emblée ou suite aux résultats du ganglion sentinelle. En prenant les patientes avec un ganglion sentinelle ou un curage positif, on retrouve 59.2% des patientes indemne d'atteinte ganglionnaire et 40.8% avec un envahissement prouvé donc N+. L'évaluation initiale évaluait le taux de cN+ à 15.2%, et au final suite à la chirurgie axillaire ganglionnaire, le taux de N+ presque trois fois plus élevé à 40.8% **(Tableau 5).**

<b>Chirurgie (N=309)</b>		<b>N (%)</b>
Mastectomie partielle	184	<b>59.6%</b>
Mastectomie totale	125	<b>40.4%</b>
Curage axillaire	248	<b>80.3%</b>
GAS	187	<b>60.5%</b>
<b>Type de chirurgie</b>		
Mastectomie partielle + curage	40	12.9%
Mastectomie partielle + GAS	47	15.2%
Mastectomie partielle + curage + GAS	97	31.4%
Mastectomie totale + GAS	14	4.6%
Mastectomie totale + Curage	82	26.5%
Mastectomie totale + GAS + curage	29	9.4%
<b>Classification UICC (Curage axillaire + GAS)</b>		
N –	183	<b>59.2%</b>
N +	126	<b>40.8%</b>

**Tableau 5. Type de chirurgie réalisée dans la population n°1.**

mastectomie partielle, mastectomie totale, curage ganglionnaire axillaire, ganglion sentinelle (GAS).

### C. Caractéristiques anatomopathologiques.

Au total, 245 patientes (**79.3%**) présentent un **carcinome canalaire infiltrant (CCI)** et 29 patients (9.4%) un carcinome lobulaire infiltrant (CLI) représentant ainsi environ 90% des histologies tumorales retrouvées. Dans 11.3% des cas (35/309), un autre type histologique (CCI-CLI exclus) a été retrouvé dont la liste descriptive est donnée dans le **tableau 6**.

Dans la majorité des cas, il s'agit de tumeurs moyennement (24.9%), ou **peu différenciées (71.6%)** corrélées avec le grade de Sarff Bloom Richardson puisque 47.2% des tumeurs sont de grade II et 46.3% de grade III (**tableau 7**). Concernant le statut hormonal (RH), **77.5%** des tumeurs traitées dans cette population par FEC100-Taxotere sont des **tumeurs hormonosensibles** dont 64.7% doublement positif RE+ et RP+. Les tumeurs RE+ isolées sans positivité des RP représentent 11.4% de la population totale. Les tumeurs **RH négatives concernent 22.5%** des patientes traitées par FEC100-Docetaxel. Quatre patientes sur 303 évaluables pour le statut HER2 soit 1.3% présentent une surexpression de HER2 mais ont été traitées par FEC100-Docetaxel seul sans Trastuzumab. Ainsi le statut triple négatif concerne 64/286 patientes soit 22.4% de la population totale. L'index de prolifération, le, **Ki67** est largement positif dans **86.5%** des cas. Concernant la présence des **embols péritumoraux**, ceux ci ont été retrouvés dans **40.7%** des cas.

Autres histologies	Fréquence(n=35)
Adénocarcinome	3
Adénocarcinome tubuleux papillaire	1
Apocrine	2
Mixte ductulo-lobulaire	7
Indifférencié	1
Médullaire	2
Micro-papillaire	11
Mucineux	4
Neuroendocrine	2
Papillaire	2

**Tableau 6. Variants histologiques (autres que CCI ou CLI) sur l'analyse de pièce de mastectomie.**

<b>Caractéristiques histologiques</b>	<b>N (pourcentage)</b>	
<b>Histologie (N= 309)</b>		
Carcinome canalaire infiltrant	245	<b>79.3%</b>
Lobulaire infiltrant	29	<b>9.4%</b>
Autres*	35	11.3%
<b>Différenciation (N= 289)</b>		
Bonne	10	3.5%
Moyenne	72	<b>24.9%</b>
Peu différencié ou pas	207	<b>71.6%</b>
<b>SBR (N= 307)</b>		
SBRI	20	6.5%
SBRII	145	<b>47.2%</b>
SBRIII	142	<b>46.3%</b>
<b>Récepteurs Hormonaux (N= 289)</b>		
RH+	224	<b>77.5%</b>
RE+ RP+	187	
RE+ RP-	33	
RE- RP+	3	
RE+ RP NK	1	
RH-	65	22.5%
<b>Typage HER2 (N= 303)</b>		
HER +	4	1.3%
HER -	299	98.7%
<b>Triple négatif (N= 286)</b>		
Oui	64	<b>22.4%</b>
Non	222	<b>77.6%</b>
<b>KI67 (N= 251)</b>		
Négatif (<15%)	34	<b>13.5%</b>
Positif	217	<b>86.5%</b>
<b>Emboles péri-tumoraux (N=307)</b>		
Oui	125	<b>40.7%</b>
Non	182	<b>59.3%</b>

**Tableau 7.** Caractéristiques anatomopathologiques sur pièce opératoire des tumeurs de la population traitée par FEC100-Docetaxel.



## D. Chimiothérapie adjuvante.

Les patientes ont reçu en médiane 6 cycles de traitement. Au total, 298 sur les 309 patientes soit 96% ont reçu de façon « conforme » le protocole 3 cycles de FEC 100 et 3 cycles de Taxotère. Les « variants » sont donc peu nombreux (3.6%) et concernaient le plus souvent un nombre de cycles de chimiothérapie inférieur à 6 pour (n=6 patientes) soit 1.9%, avec absence d'administration des 3 cycles complets de Docetaxel dans ces 6 situations (2 patientes avec un seul cycle de Docetaxel et 4 patientes avec 2 cycles, le 3<sup>ème</sup> ayant été non effectué, le plus souvent pour des raisons de toxicité. Une patiente a bien reçu le nombre défini de 6 cures, mais 1 seul cycle d'anthracyclines par FEC100 et le complément par 5 cycles de Docetaxel.

Quatre patientes, soit 1.3% ont reçu plus de six cycles de chimiothérapie, trois d'entre elles avec un ajout de Docetaxel (2 cycles additionnels pour 1 patiente et 4 cycles additionnels pour une autre), le plus souvent pour des raisons de progressions découvertes en cours de chimiothérapie adjuvante avec poursuite du protocole de chimiothérapie, les taxanes étant un standard de prise en charge du cancer du sein métastatique en 1<sup>ère</sup> ligne, notamment en cas de métastases viscérales évolutives. Les caractéristiques de la chimiothérapie adjuvante sont résumées dans le **tableau 8**.

Chimiothérapie adjuvante		N=309	
Nombre de cycles de CT			
médiane (range)	6	(4-10)	
n(%)			
<6 cycles	6	1.9%	
6 cycles	299	96.8%	
>6 cycles	4	1.3%	
Type de CT			
3 FEC 100 + 3 Taxotère	298	96.4%	
1 FEC 100 + 5 Taxotère	1	<1%	
3 FEC 100 + 1 Taxotère	2	<1%	
3 FEC 100 + 2 Taxotère	4	1.3%	
3 FEC 100 + 5 Taxotère	2	<1%	
3 FEC 100 + 7 Taxotère	1	<1%	
4 FEC 100 + 6 Taxotère	1	<1%	

**Tableau 8.** Caractéristiques de la chimiothérapie adjuvante dans la population FEC100-Docetaxel.

## E. Données de suivi.

### 1. Progression et statut vital de la cohorte.

Au total, 44 patientes sur 309 ont progressé (14.2%) et 20 patientes sont décédées (6.5%). La cause de décès est la progression pour 18 d'entre-elles. Les deux autres patientes sont décédées d'une leucémie aiguë myéloïde (patiente n°128) et d'une mort inconnue (patiente n°713). Les données sur la progression et le statut vital des patientes sont résumées dans le **tableau 9**.

**Parmi les patientes en progression, 30 patientes ont présenté des métastases à distance (9.8%). Dix patientes** une récurrence locale (3.2%), **deux patientes** un cancer du sein **controlatéral**, **5 une récurrence ganglionnaire** et 3 patientes ont présenté un **second cancer**.

Il faut savoir qu'une patiente peut avoir plusieurs types de progressions possibles simultanément par exemple une rechute locale et régionale (ganglionnaire) ou encore locale et métastatique.

De plus, avec le suivi, la première progression était annotée mais également les suivantes : par exemple, la récurrence locale puis l'apparition secondaire de métastases. Dans le cadre de l'étude, ce qui est retenu pour l'analyse, est la nature de la 1<sup>ère</sup> progression pour analyser le lien avec des SNP, même si des progressions d'autres types apparaissent au décours du suivi de la patiente.

Ainsi, pour l'analyse de la 1<sup>ère</sup> progression, la liste suivante montre le nombre des **1<sup>ères</sup> progressions** identifiées chez les 309 patientes : Sur les 44 progressions, les 1<sup>ères</sup> progressions étaient :

- Métastatiques : 28 patientes ont eu une 1<sup>ère</sup> progression métastatique
- Rechute locale : 9 patientes ont eu une 1<sup>ère</sup> progression locale
- Rechute locorégionale : 1 patiente a eu une 1<sup>ère</sup> progression locorégionale
- Rechute ganglionnaire : 1 patiente a eu une 1<sup>ère</sup> progression ganglionnaire
- Rechute controlatérale: 2 patientes ont eu une 1<sup>ère</sup> progression controlatérale
- Rechute second cancer : 3 patientes ont eu un 2<sup>nd</sup> cancer

- Les localisations métastatiques les plus fréquentes étaient osseuses (25 patientes), hépatiques (14), pulmonaires (12), et médiastinales (3), cérébrales (2). Les autres sites métastatiques étaient les suivants : carcinose rétro-péritonéale (1), cérébrale et méningée (1), péritoine (1), surrénale lymphatiques (1), pleural (1,) et pleuro-médiastinale (1).
- Concernant les récurrences locales (n=10), l'histologie correspondait à 8 cancers du sein infiltrants et pour 2 patientes, l'histologie était de type in situ.
- Concernant la récurrence sous forme de controlatéralisation (n=2), les histologies étaient de types infiltrants pour les 2 cas, avec expression des récepteurs hormonaux de type RE+ RP+. Ces récurrences ont été traitées par chirurgie conservatrice.
- Concernant les récurrences ganglionnaires (n=5), les localisations étaient axillaires pour 4 d'entre elles et 2 avec des métastases ganglionnaires sus-claviculaires. De la même façon, les patientes pouvaient avoir une récurrence axillaire et sus claviculaire associées.
- Dans le suivi, un second cancer a été diagnostiqué chez 3 des 309 patientes Il s'agissait d'un adénocarcinome du sigmoïde, d'un carcinome épidermoïde du col utérin et pour une patiente d'un sarcome pré-sternal gauche à cellules fusiformes en territoire irradié.

Suivi (N= 309)		N (pourcentage)
Progression (N= 309)	44	14.2%
<i>Métastases à distance</i>	30	
Os	25	
Poumon	12	
Foie	14	
SNC	2	
Médiastin	3	
Epanchement pleural	2	
Autres*	5	
<i>Récidive locale</i>	10	
<i>Cancer du sein controlatéral</i>	2	
<i>Récidive ganglionnaire</i>	5	
<i>Second cancer</i>	3	
Statut vital (N= 309)		
Vivants	288	93.2%
Décédés	20	6.5%
Perdus de vue	1	<1%
Causes de décès (N=20)		
Progression	18	90%
Leucémie aigüe myéloïde	1	<1%
Inconnue	1	<1%

**Tableau 9.** Données de progression et de statut vital des patientes de la population FEC100-Docetaxel.

\*Autres métastases:

- carcinose rétro-péritonéale (1), cérébrale et méningée (1), péritoine (1) surrénale lymphatiques (1), plèvre (1), pleuro-médiastinale (1)

\*Détails sur les récurrences:

-Récidive locale (N=10) : histologie : 8 infiltrants, 2 in situ.

-Cancer controlatéral (N=2): histologie : 2 infiltrants; 2 RE+ RP+;

-Récidive ganglionnaire (N=5): localisation : 4 axillaires et 2 sus-claviculaires ; histologie : 5 infiltrants.

- Second cancer (N=3) : Adénocarcinome du sigmoïde, carcinome épidermoïde du col utérin et sarcome pré-sternal gauche a cellules fusiformes en territoire irradié.

## 2. Survie sans progression (PFS), survie sans progression métastatique (MFS) et survie globale (OS).

La survie globale et la survie sans récurrence sont estimées par la méthode de Kaplan-Meier en tenant compte des délais depuis la date de chirurgie. **Le suivi médian des patientes est de 3.4 ans (IC95% : 3.3 -3.5).**

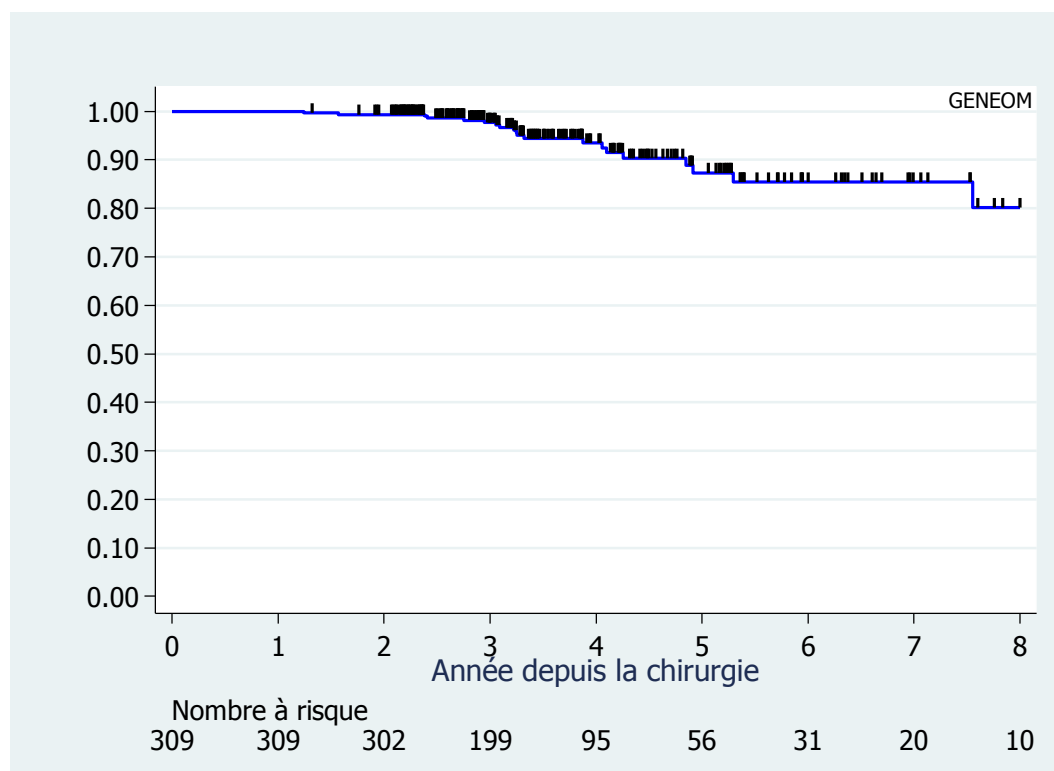
- La survie sans récurrence (PFS) est calculée en considérant le temps jusqu'à la récurrence (locale / locorégionale / métastatique) ou jusqu'au décès quelle qu'en soit la cause, les patientes vivantes sans récurrences sont censurées à la date des dernières nouvelles.
- La survie sans récurrence métastatique (MFS) est calculée en considérant le temps jusqu'à la récurrence métastatique uniquement ou jusqu'au décès quelle qu'en soit la cause, les patientes vivantes sans récurrences sont censurées à la date des dernières nouvelles.
- La survie globale (OS) est calculée en considérant le temps jusqu'au décès quelle qu'en soit la cause, les patientes en vie sont censurées à la date des dernières nouvelles.
- La comparaison des taux de survie sans récurrences en fonction de paramètres tels que l'âge, le typage HER2, SBR et les récepteurs hormonaux, est faite à l'aide du test du Log Rank.

### a) Survie globale de la cohorte (OS).

Dans l'analyse, 20 patientes sont décédées (6.5%). La médiane de survie est non atteinte même après huit années suivant la chirurgie **(tableau10) (Figure 47)**. Les taux de survie à 1, 2 ans, 5 ans sont respectivement de **100%, 99.4%, et 87.3%**.

Survie globale	N=309	
Nombre d'événement	20	
Médiane (année) (IC95%)	Non atteinte	
1 an: taux de survie (IC95%)	100%	
2 ans : taux de survie (IC95%)	99.4%	(97.4 – 99.8)
5 ans : taux de survie (IC95%)	87.3%	(79.4 – 92.4)

**Tableau 10.** Taux de survie globale (OS) à 1, 2 et 5 ans de la population FEC100-Docetaxel.



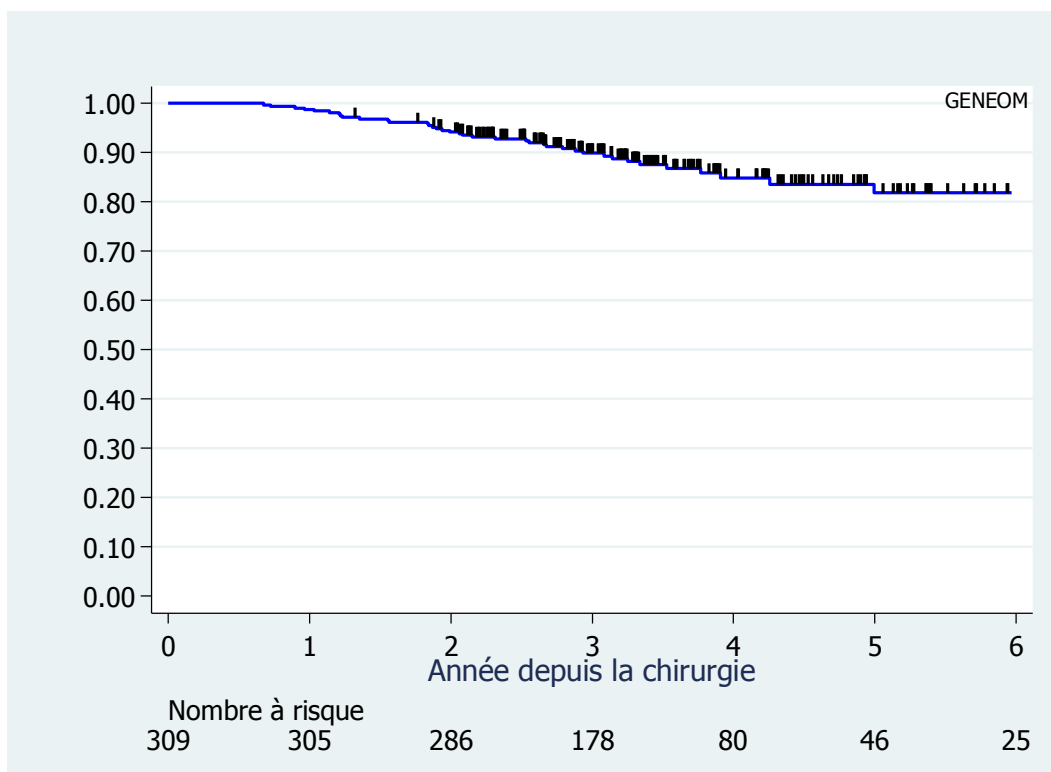
**Figure 47.** Courbe de survie globale (OS) de la cohorte de patientes traitées par FEC100-Docetaxel.

**b) Survie sans progression (toutes progressions confondues : PFS)**

Dans cette analyse de la PFS, seule sont prises en compte les progressions métastatiques, locales et régionales (ganglionnaires). Ne sont pas incluses les second cancers et les controlatéralisations. Dans l'analyse, 41 patientes ont progressé ou sont décédées (13.3%). La médiane de survie sans récurrences n'est pas atteinte (**tableau 11**) (**Figure 48**). Les taux de survies sans récurrences à 1 et 2 ans sont respectivement de 98.7% et de 94.2%

Survie sans récurrences	N=309	
Nombre d'évènement	41	
Médiane (année) (IC95%)	Non atteinte	
1 an: taux de survie (IC95%)	98.7%	(96.6 – 99.5)
2 ans : taux de survie (IC95%)	94.2%	(90.9 – 96.3)
5 ans : taux de survie (IC95%)	81.8%	(74.3 – 87.3)

**Tableau 11.** Taux de survie sans récurrence (PFS) à 1, 2 et 5 ans de la population FEC100-Docetaxel.



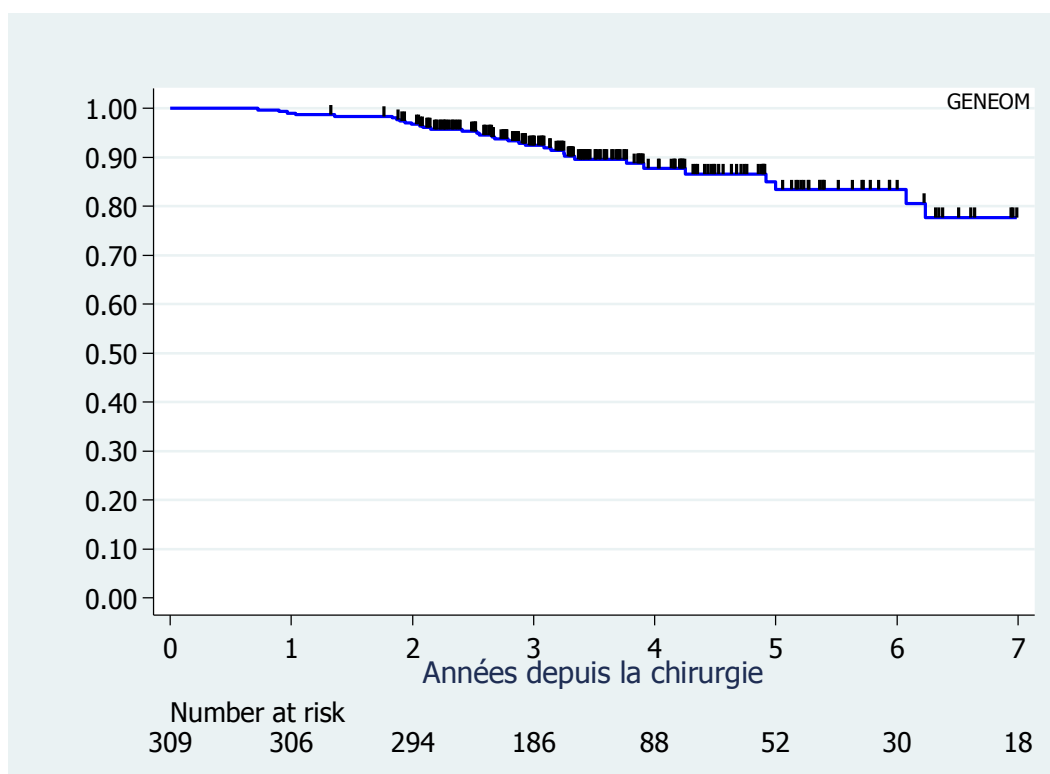
**Figure 48.** Courbe de survie sans progression (PFS) de la cohorte de patientes traitées par FEC100-Docetaxel.

### c) Survie sans progressions métastatiques (MFS).

La survie sans progression métastatique (MFS) a été étudiée à part de la PFS, le but de la chimiothérapie adjuvante était essentiellement de réduire le risque de métastase à distance. Il était donc intéressant d'analyser la survie sans progression métastatique. Dans l'analyse des premières progressions métastatiques, 34 patientes ont progressé ou sont décédées (11%). La médiane de survie sans récurrences métastatiques n'est pas atteinte. Les taux de survie sans récurrences métastatiques à 1 et 2 ans sont respectivement de 99.0% et de 96.7% (**Tableau 12**) (**Figure 49**).

Survie sans récurrences	N=309	
Nombre d'évènement	34	
Médiane (année) (IC95%)	Non atteinte	
1 an: taux de survie (IC95%)	99.0%	(97.0 – 99.7)
2 ans : taux de survie (IC95%)	96.7%	(94.0 – 98.2)
5 ans : taux de survie (IC95%)	83.4%	(75.6 – 88.9)

**Tableau 12.** Taux de survie sans récurrence métastatique (MFS) à 1, 2 et 5 ans de la population FEC100- Docetaxel.



**Figure 49.** Courbe de survie sans progression métastatique (MFS) de la cohorte de patientes traitées par FEC100-Docetaxel.

## F. Facteurs associés à la survie.

Afin d'évaluer l'impact des SNP sur le délai à la récurrence toutes récurrences confondues (PFS) et la récurrence métastatique (MFS), nous avons comparé (Test du Log Rank) la survie selon les variables pronostiques classiques (âge, type histologique, taille T, atteinte ganglionnaire N, donc la classification TNM UICC, les statuts RH, RE, HER2+, triples négatives, les embols vasculaires. Ceci afin d'obtenir le « poids » éventuel de ces variables sur le pronostic des patientes de notre cohorte et de l'intégrer avec les SNP dans l'analyse multivariée finale.

Une analyse a été effectuée de façon séparée pour la PFS et la MFS, les SNP étant eux mêmes analysées pour chacune de ces deux survies.



## 1. Facteurs associées à la survie toutes progressions confondues (PFS)

La comparaison entre les différents groupes sur le délai de survie sans récurrences PFS (métastatiques et/ou locales et/ou locorégionales) retrouve une différence significative entre le taux de survie sans récurrences pour les patientes :

**-ayant une tumeur RH positive : HR : 0.49 (0.25-0.99) p=0.04**

**-triples négatives : HR : 2.1 (1.05-4.21) p= 0.03**

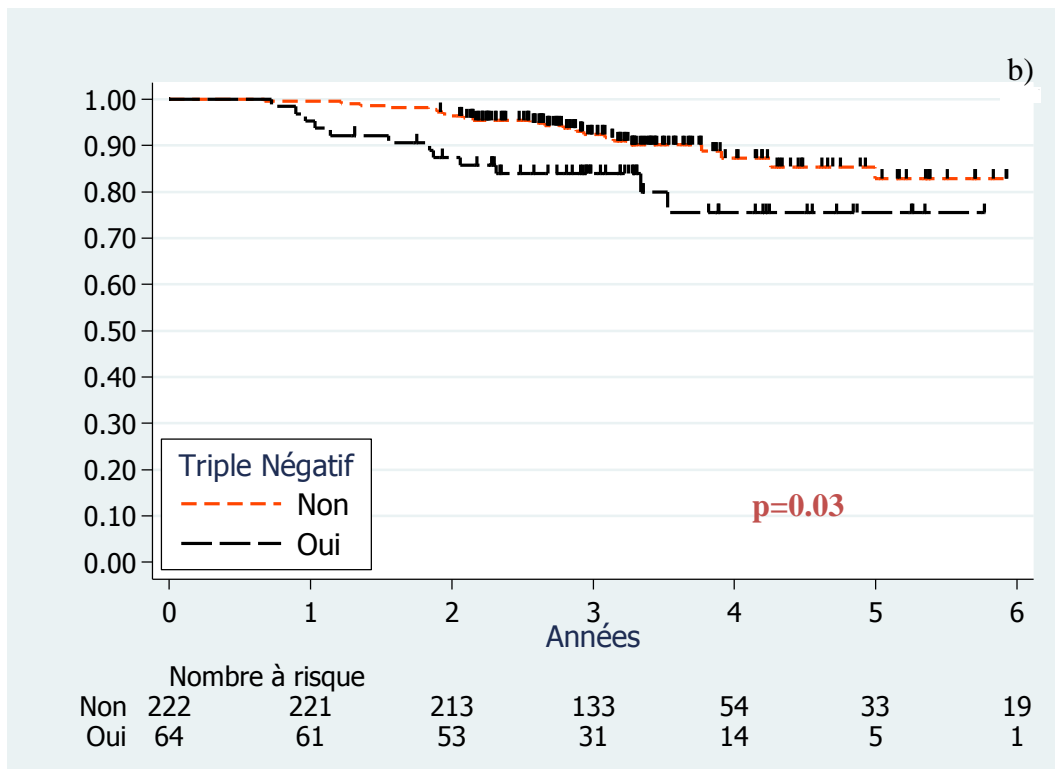
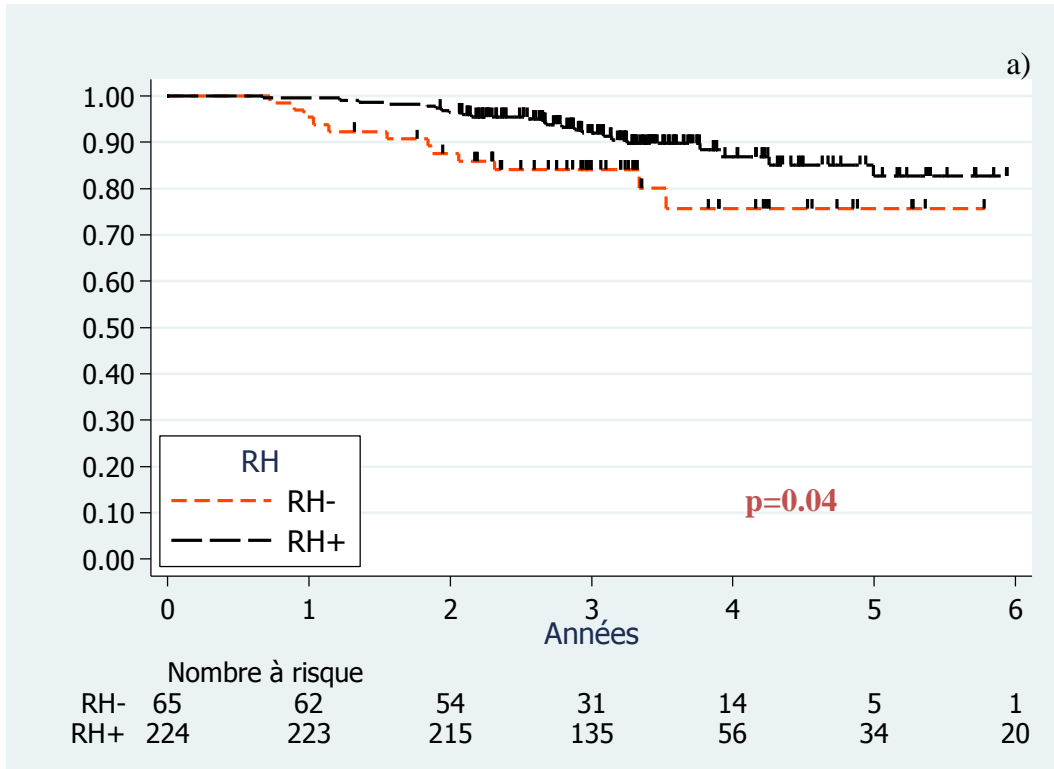
**-avec la présence d'embolies péritumorales HR : 2.43 (1.28-4.62) p=0.005**

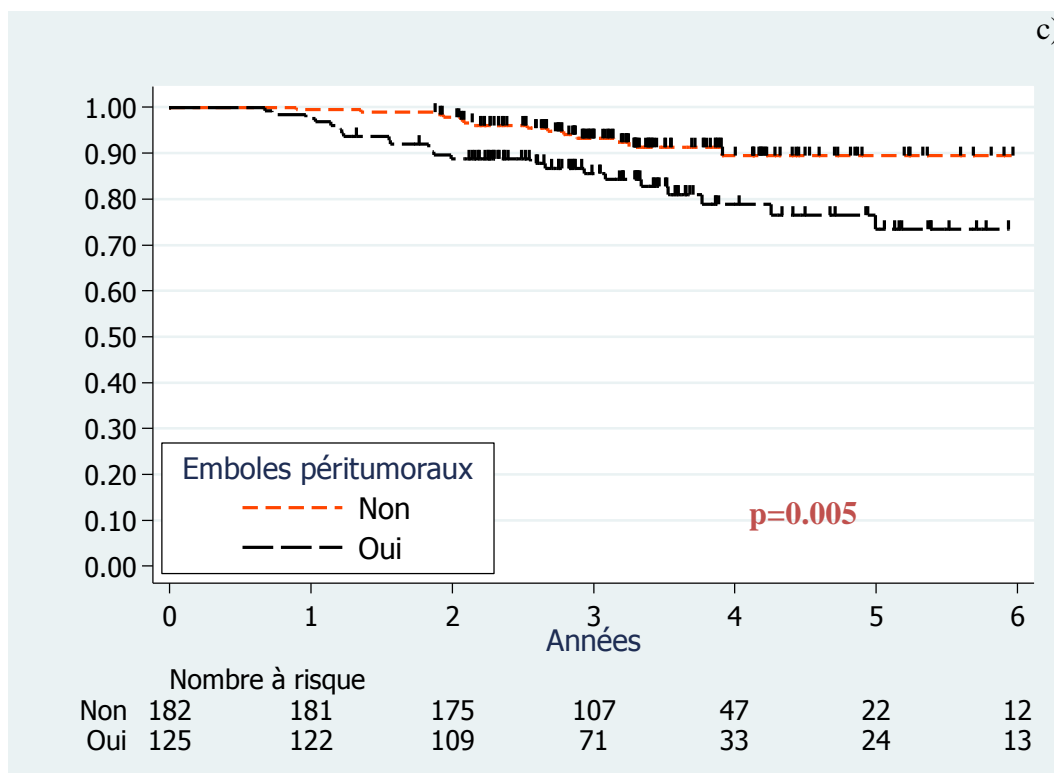
**(Tableau 13) (Figure 50).**

Aucune différence n'a été retrouvée pour l'âge, le statut TNM, le type histologique, le grade SBR, le statut HER2, le RE, le Ki67 **(Tableau 13)**

Caractéristiques	Patient es	Evènements	Médiane (années)	HR (95%CI)	p Log- Rank
<b>Age</b>					0.31
≤ 44 ans	76	8	-	1	
45 - 54 ans	112	19	-	1.68 (0.73 – 3.84)	
≥ 55 ans	119	13	-	1.06 (0.44 – 2.57)	
<b>Typage HER2</b>					NA
HER2+	4	0	-		
HER2-	299	39	-		
<b>*Attention cette comparaison ne sera pas faite au vue du nombre de patiente avec une tumeur HER2+</b>					
<b>SBR*</b>					0.15
SBRI	20	<b>0</b>	-	1	
SBRII	145	<b>20</b>	-	5.35e+08	
SBRIII	142	<b>21</b>	-	5.91e+08 (3.20e+08 - 1.09e+09)	
<b>*Attention à prendre les résultats avec précaution car il n'y a que 20 patientes dans la classe SBRI comparée au deux autres classes SBRII et SBRIII avec respectivement 145 et 142 patientes</b>					
<b>Récepteurs Hormonaux</b>					<b>0.04</b>
RH+	224	26	-	0.49 (0.25 – 0.99)	
RH-	65	12	-	1	
<b>Récepteurs Œstrogènes</b>					0.08
RE+	221	26	-	0.55 (0.28 – 1.09)	
RE-	68	12	-	1	
<b>Triple négatif</b>					<b>0.03</b>
Oui	64	12	-	2.1 (1.05 – 4.21)	
Non	222	25	-	1	
<b>Coté tumeur</b>					0.68
Droit	137	16	-	1	
Gauche	163	24	-	1.14 (0.60 – 2.17)	
<b>Types histologiques</b>					0.80
Carcinome canalaire infiltrant	245	33	-	1	
Lobulaire infiltrant	29	4	-	1.06 (0.38 – 3.00)	
Autres*	35	4	-	0.72 (0.25 – 2.03)	
<b>Emboles péritumoraux</b>					<b>0.005</b>
Oui	125	25	-	2.43 (1.28 – 4.62)	
Non	182	15	-	1	
<b>KI67</b>					0.56
Négatif (<15%)	34	3	-	1	
Positif	217	26	-	1.42 (0.43 – 4.72)	
<b>Classification UICC</b>					
<b>T (initiale)</b>					0.90
T0	53	7	-	1	
T1	120	13	-	0.74 (0.29 – 1.86)	
T2	103	15	-	0.92 (0.37 – 2.30)	
T3 +	21	2	-	0.75 (0.15 – 3.61)	
<b>N (post-op)</b>					0.14
N -	183	19	-	1	
N +	126	22	-	1.59 (0.86 – 2.94)	

**Tableau 13. Survie sans récurrences (PFS) suivant différentes caractéristiques.**





**Figure 50.** Comparaison par test du Log Rank des courbes de survie sans progressions (PFS) en fonction du statut RH (a), triple négatif (b), et des embols (c).

## 2. Facteurs associés à la survie sans progression métastatique (MFS)

Dans notre cohorte de patiente, aucune différence statistiquement significative n'a été retrouvée parmi les différentes caractéristiques cliniques et anatomopathologiques classiquement pronostiques (âge, TNM, grade, RH...etc.) et la survie sans progression métastatique (MFS) (**Tableau 14**).

Caractéristiques	Pts	Evts	Médiane (années)	HR (95%CI)	P Log rank
<b>Age</b>					0.58
≤ 44 ans	76	7	-	1	
45 - 54 ans	112	15	-	1.44 (0.59 – 3.53)	
≥ 55 ans	119	11	-	1.00 (0.39 – 2.58)	
<b>Typage HER2</b>					NA
HER2+	4	0	-	-	
HER2-	299	32	-	-	
<b>*Attention cette comparaison ne sera pas faite au vue du nombre de patiente avec une tumeur HER2+</b>					
<b>SBR*</b>					0.2
SBRI	20	0	-	1	
SBRII	145	17	-	5.47e+08	
SBRIII	142	17	-	5.67e+08 (2.89e+08 - 1.11e+09)	
<b>*Attention à prendre les résultats avec précaution car il n'y a que 20 patientes dans la classe SBRI comparée au deux autres classes SBRII et SBRIII avec respectivement 145 et 142 patientes</b>					
<b>Récepteurs Hormonaux</b>					0.5
RH+	224	24	-	0.76 (0.34 – 1.70)	
RH-	65	8	-	1	
<b>Récepteurs Œstrogènes</b>					0.66
RE+	221	24	-	0.84 (0.38 – 1.86)	
RE-	68	8	-	1	
<b>Triple négatif</b>					0.45
Oui	64	8	-	1.36 (0.61 3.04)	
Non	222	23	-	1	
<b>Coté tumeur</b>					0.60
Droit	137	13	-	1	
Gauche	163	20	-	0.20 (0.60 2.43)	
<b>Types histologiques</b>					0.73
Carcinome canalaire infiltrant	245	28	-	1	
Lobulaire infiltrant	29	3	-	0.94 (0.29 – 3.10)	
Autres*	35	3	-	0.62 (0.19 – 2.04)	
<b>Emboles péricitumoraux</b>					0.16
Oui	125	19	-	1.62 (0.82 – 3.22)	
Non	182	15	-	1	
<b>KI67</b>					0.40
Négatif (<15%)	34	2	-	1	
Positif	217	22	-	1.86 (0.44 – 7.91)	
<b>Classification UICC</b>					
<b>T (initiale)</b>					0.84
T0	53	6	-	1	
T1	120	10	-	0.65 (0.23 – 1.78)	
T2	103	12	-	0.82 (0.30 – 2.21)	
T3 +	21	2	-	0.98 (0.20 – 4.87)	
<b>N (post-op)</b>					0.28
N0	183		-	1	
N +	126		-	1.44 (0.73 – 2.84)	

**Tableau 14.** Survie sans récurrences métastatique (MFS) suivant différentes caractéristiques.

## G. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) et délai de survie.

### 1. Analyse des SNP.

53 SNP sont testés sur les données de la littérature. Cependant, trois d'entre eux n'ont pas été retenus pour effectuer le génotypage de la population.

- 1 sonde ne fonctionnait pas: **rs1570360**
- 3 sondes ont été invalidées: **rs2333227**, **rs7439366** et **rs3746083**

Le génotypage a donc pu être effectué pour 49 SNP. Cependant, 3 SNP étaient monomorphiques dans la population.

- HTR1E **rs3828741 (CC)**

- MDR1 **rs2229109 (GG)**

- PARP1 **rs1136471 (AA)**.

Un total de **46 SNP** sur les 53 initiaux sélectionnés était donc disponible pour l'analyse avec le délai à la récurrence (**Tableau 15**). Concernant les patientes, le génotypage n'a pas été réalisé pour 8 patientes de la population FEC100-Docetaxel (**n°188, 487, 772, 831, 842, 892, 898, 899**) (problème de classement initial des patientes dans les groupes adjuvants, néo adjuvants, métastatique). L'association entre le délai de survie sans récurrences et SNP est donc évaluable pour **301 patientes**.

XRCC1	rs25487	NOS3	rs2070744	FCYR2A	rs1801274	CXCL12	rs1801157
XPC	rs2228001	NOS3	rs1799983	ERCC1	rs11615	CES2	rs11075646
VEGFA	rs3025039	MTHFR	rs1801133	DPD	rs2297595	CD24	rs52812045
VEGFA	rs2010963	MTHFR	rs1801131	DNASE2B	rs3738573	CCND1	rs9344
VEGFA	rs833061	<b>MDR1</b>	<b>rs2229109</b>	CYP2D6	rs3892097	BRCA1	rs799917
VEGFA	rs699947	MDR1	rs2032582	CYP3A4	rs2740574	ABCC4	rs9561778
SOD2	rs4880	MDR1	rs1045642	CYP2B6	rs12721655	CYP1B1	rs1056836
SLCO1B3	rs11045585	IL6	rs1800797	CYP2B6	rs8192709		
SHMT1	rs1979277	IL6	rs1800795	CYP2B6	rs7254579		
RRM1	rs1042858	<b>HTR1E</b>	<b>rs3828741</b>	CYP2B6	rs4803419		
<b>PARP1</b>	<b>rs1136471</b>	HER2	rs1136201	CYP2B6	rs4802101		
P53	rs1042522	GSTP1	rs1695	CYP2B6	rs3745274		
NQO2	rs1143684	FGFR4	rs351855	CYP2B6	rs2279345		
NQO1	rs1800566	FCYR3A	rs396991	CYP2B6	rs2279343		

**Tableau 15.** SNP disponibles pour l'analyse avec le délai à la récurrence.

## 2. Relation entre SNP et délai de récurrence

### a) Relation SNP et délai toutes récurrences (PFS).

Au total, 38 patientes sur 301 ont progressé ou sont décédées. Les 301 patientes correspondent à celles dont le génotypage a été effectué et disponible. L'association entre la PFS et les SNP est analysée (ex. pour un SNP de génotype AA/AC/CC) :

- parmi les 3 groupes : AA vs AC vs CC
- parmi les 2 groupes : AA vs (AC + CC)
- parmi les 2 groupes : (AA + AC) vs CC
- parmi les 2 groupes : (AA + CC) vs AC

#### ❖ SNP associé à la PFS

**La PFS est associée significativement au génotype de 2 SNP sur les 46 analysés (tableau 16) :**

1. SLCO1B3-rs11045585 : La répartition des génotypes dans la population traitée par FEC100-Docetaxel est la suivante : 223 AA (74.1%), 74 AG (24.6%), 4 GG (1.3%). La survie diffère entre les 2 groupes AA-AG et GG avec respectivement 36 et 2 des événements (progression ou mort) et un HR de rechute de **6.44** en cas de génotype **GG versus AA-AG** mais aussi entre les trois groupes AA (25 événements), AG (11 événements) et GG (2 événements).

**Ce résultat est à prendre avec grande précaution au vu du nombre de patientes dans le groupe GG et n'a pas été inclus dans l'analyse multivariée.**

2. CCND1-rs9344 : La répartition dans la population est 65 AA (21.6%), 155 AG (51.5%), 81 GG (26.9%). La survie diffère entre les 2 groupes AA-AG et GG avec respectivement 22 et 16 des événements (progression ou mort), avec un HR de rechute de **2.13** en cas de génotype **GG versus AA-AG**

SNP	Patientes	Evènement	HR (IC 95%)	Modèle	p
<b><u>SLCO1B3-rs11045585</u></b>					
AA	223	25	1	AA vs AG vs GG	<b>0.01</b>
AG	74	11	0.53 (0.29 – 0.97)		
<b>GG**</b>	4	2	0.29 (0.04 – 2.12)		
AA – AG	297	36	6.44 (1.54 – 26.94)	<u>(AA – AG)</u> vs GG	<b>0.003</b>
AA – GG	227	27	1.22 (0.61 – 2.47)	<u>(AA – GG)</u> vs AG	0.57
AG – GG	78	13	0.67 (0.34 – 1.31)	<u>(AG – GG)</u> vs AA	0.24
<b><u>CCND1-rs9344</u></b>					
AA	65	6	1	AA vs AG vs GG	0.06
AG	155	16	1.05 (0.41 – 2.70)		
GG	81	16	2.21 (0.87 – 5.67)		
AA – AG	220	22	2.13 (1.12 – 4.06)	<u>(AA – AG)</u> vs GG	<b>0.02</b>
AA – GG	146	22	0.63 (0.33 – 1.21)	<u>(AA – GG)</u> vs AG	0.16
AG – GG	236	32	0.70 (0.29 – 1.68)	<u>(AG – GG)</u> vs AA	0.42

\*La référence dans chaque modèle correspond au groupe souligné

### **Tableau 16. SNP associé à la survie sans récurrences (PFS).**

#### ❖ Analyse des SNP associés à la PFS dans un modèle multivarié

Le modèle de Cox permet une estimation de l'effet d'une ou plusieurs variables de données de survie censurées. Dans la construction de modèles multivariés, une régression pas à pas a été utilisée pour sélectionner les variables parmi celles jugées statistiquement significative à **p = 0.10** dans l'analyse univariée. Dans cette analyse, il est utilisé pour construire un score pronostique de combinaisons de variables importantes. Selon les résultats des analyses multivariées, un score pronostique a été obtenu pour la survie sans récurrences.

Le seul SNP qui a été sélectionné pour l'analyse multivariée pour la PFS est : CCND1-rs9344 [(AA-AG) vs GG]. Dans l'analyse univariée, les variables « récepteurs hormonaux », « triple négatifs », « emboles péri-tumoraux » et « récepteurs œstrogènes » sont significatives (**tableau 13**). Néanmoins les trois variables récepteurs hormonaux, triple négatif et récepteurs aux œstrogènes sont corrélées du fait de leur définition et une seule a donc été utilisée dans le modèle multivarié. La variable « récepteurs hormonaux » est celle sélectionnée car elle a permis la construction du meilleur modèle. Le tableau résume les valeurs des poids associées à chacun des variables significatives dans l'analyse multivariée (**Tableau 17**).



Progression sans récurrences	Hazard Ratio	P	Score
<b>Emboles péritumoraux</b>		<b>0.006</b>	
Non	1		0
Oui	2.84 (1.36 – 5.95)		+1
<b>Récepteurs hormonaux</b>		<b>0.04</b>	
RH-	2.36 (1.04 – 5.37)		+1
RH+	1		0
<b>Score survie sans récurrences</b>		<b>Médiane</b>	<b>Taux (2 ans)</b>
Survie haute: 0 (n=121)	1	-	<b>97.5%</b>
Survie modérée: 1 (n=142)	0.92 (0.42 – 1.99)	-	<b>96.5%</b>
Faible survie: 2* (n=17)	11.12 (4.42 – 27.97)	3.5	<b>56.1%</b>

\*Trop faible nombre de patientes pour une bonne interprétation du score 2

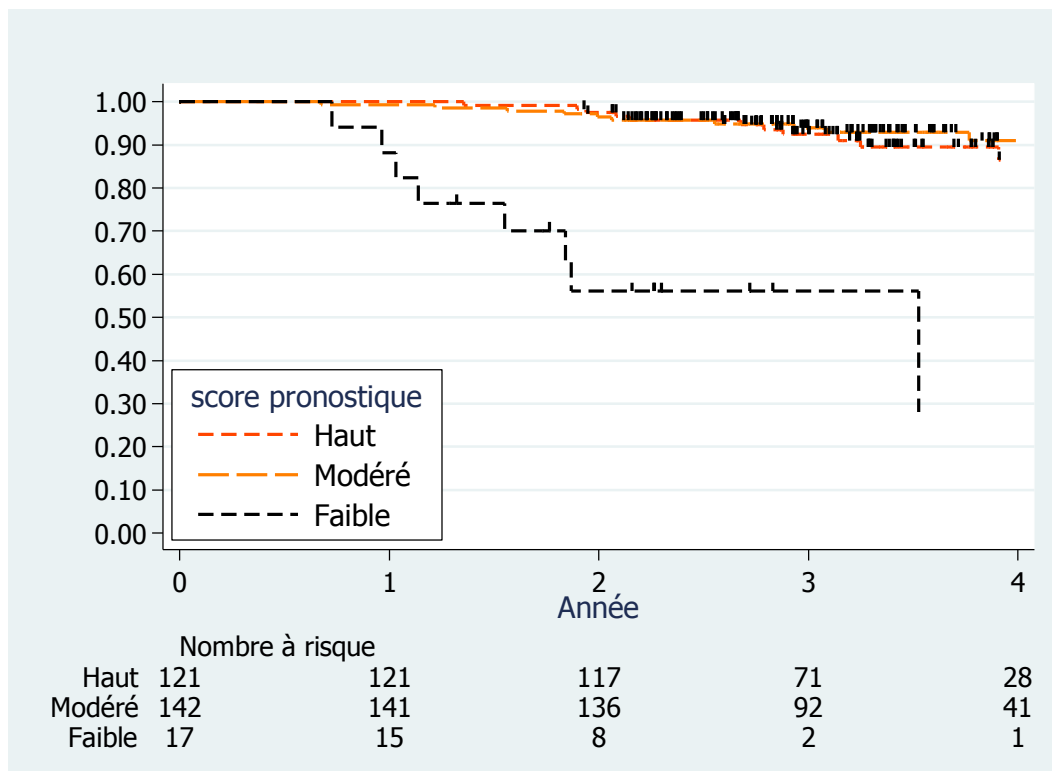
### **Tableau 17. Modèle multivarié sur la survie sans récurrence (PFS).**

Seul la présence d'embols, le statut RH sont associés à la survie sans récurrence (PFS). Le seul SNP significatif en univariée (CCDN1) n'est pas associé à la PFS dans ce modèle multivarié construit avec les autres paramètres qui ont été retrouvés significatifs dans l'analyse univariée.

→ Au total, aucun des 46 SNP genotypés n'est retrouvé associé à la PFS.

Un score pronostique (**Figure 51**) de combinaisons de variables de poids importantes pour la PFS a été construit. Ce score pronostique n'inclut ainsi que des paramètres anatomopathologiques et aucun des 46 SNP.

Le taux de survie sans récurrences à 2 ans est de 56% pour les patientes ayant un score de 2 contrairement aux patientes ayant un score de 0 qui ont un taux de survie sans récurrences de 97.5%. Cependant, le **nombre de patientes avec un score de 2 est faible (17 patientes), ce résultat est donc à prendre avec grande précaution.**



**Figure 51. Score pronostique sur la survie sans récurrence (PFS).**

#### b) Relation SNP et délai à la récurrence métastatique (MFS).

Nous avons analysé la relation entre les SNP et la PFS. Le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante étant surtout sur la rechute métastatique, il nous est apparu important d'analyser le lien entre SNP et de façon plus spécifique la survie sans rechute métastatique.

##### ❖ SNP associé à la MFS

Au total, 31 patientes sur 301 ont eu une 1<sup>ère</sup> progression métastatique ou sont décédées. Les 301 patientes correspondent à celles dont le génotypage est présent. **La survie sans récurrences métastatiques est associée significativement au génotype de 5 SNP sur les 46 évalués (tableau 18) :**

**-CYP2B6-rs2279345 :** la répartition des génotypes dans la population traitée par FEC100-Docetaxel est la suivante : 123 CC (40.9%), 132 CT (43.8%), 46 TT (15.3%). La survie diffère entre les 3 groupes CC, CT et TT avec respectivement 15, 8 et 8 des

événements (progression métastatique ou mort) mais également entre les 2 groupes CC-CT et TT avec respectivement 23 et 8 des événements. En cas de **génotype TT** versus **CC-CT** le HR de rechute métastatique est multiplié par **2.29**.

**-NOS3-rs1799983** : La répartition dans la population est de 133 patientes de génotype GG (44.2%), 136 GT (45.2%), 31 TT (10.3%). La survie diffère entre les 3 groupes GG, TT et GT avec respectivement 18, 7 et 6 des événements (progression ou mort), entre les 2 groupes TT et GG-GT avec respectivement 6 et 25 des événements et entre les deux groupes GG-TT et GT avec respectivement 24 et 7 des événements. En cas de **génotype TT**, le HR de rechute métastatique est multiplié par **2.62** et en cas de **génotype GT** le HR de rechute métastatique est diminué à **0.32** avec un effet « protecteur » de ce génotype par rapport à TT-GG.

**-SLCO1B3-rs11045585** : La répartition dans la population est de 223 patientes de génotype AA (74.1%), 74 AG (24.6%), 4 GG (1.3%). La survie diffère entre les 3 groupes AA, AG et GG avec respectivement 20, 9 et 2 des événements (progression ou mort) mais également entre les 2 groupes AA-AG et GG avec respectivement 29 et 2 des événements. Le HR de rechute métastatique est alors augmenté de **7.73** en cas de **génotype GG**. **Ce résultat, comme pour la PFS, est à prendre avec précaution au vu du nombre de patientes dans le groupe GG et ne sera donc pas inclus dans l'analyse multivariée.**

**-BRCA1-rs799917** : la répartition dans la population est 129 patientes de génotype CC (42.8%), 145 CT (48.2%), 27 TT (9%). La survie diffère entre les 2 groupes CC-TT et CT avec respectivement 22 et 9 des événements (progression métastatique ou mort). En cas de **génotype CT**, le HR de rechute métastatique est diminué à **0.41** avec un effet protecteur de ce génotype par rapport au double homozygote soit TT ou CC.

**-CYP2D6-rs3892097** : la répartition dans la population est 14 patientes de génotype AA (4.6%), 77 AG (25.6%), 210 GG (69.8%). La survie diffère entre les 2 groupes AA-GG et AG avec respectivement 18 et 13 des événements (progression métastatique ou mort). Le HR de rechute métastatique est alors augmentée de **2.14** en cas de génotype **homozygote AA** versus les double homozygote GG et les hétérozygotes AG

SNP	Patientes	Evènement	HR (IC 95%)	Modèle	p
<b><u>CYP2B6-rs2279345</u></b>					
CC	123	15	1	CC vs TT vs CT	<b>0.049</b>
CT	132	8	0.54 (0.23 – 1.28)		
TT	46	8	1.77 (0.75 – 4.19)		
CC – CT	255	23	2.29 (1.02 – 5.13)	<u>(CC – CT)</u> vs TT	<b>0.04</b>
CC – TT	169	23	0.46 (0.21 – 1.03)	<u>(CC – TT)</u> vs CT	0.05
CT – TT	178	16	1.21 (0.60 – 2.44)	<u>(CT – TT)</u> vs CC	0.60
<b><u>NOS3-rs1799983</u></b>					
GG	133	18	1	GG vs TT vs GT	<b>0.008</b>
GT	136	7	0.36 (0.15 – 0.87)		
TT	31	6	1.77 (0.70 – 4.48)		
GG – GT	269	25	2.62 (1.07 – 6.43)	<u>(GG – GT)</u> vs TT	<b>0.03</b>
GG – TT	164	24	0.32 (0.14 – 0.76)	<u>(GG – TT)</u> vs GT	<b>0.006</b>
GT – TT	167	13	1.74 (0.84 – 3.55)	<u>(GT – TT)</u> vs GG	0.13
<b><u>SLCO1B3-rs11045585</u></b>					
AA	223	20	1	AA vs AG vs GG	<b>0.004</b>
AG	74	9	1.31 (0.60 – 2.88)		
<b>GG**</b>	4	2	8.35 (1.93 – 36.10)		
AA – AG	297	29	7.73 (1.83 – 32.7)	<u>(AA – AG)</u> vs GG	<b>0.001</b>
AA – GG	227	22	1.20 (0.55 – 2.62)	<u>(AA – GG)</u> vs AG	0.64
AG – GG	78	11	0.65 (0.31 – 1.35)	<u>(AG – GG)</u> vs AA	0.24
<b><u>BRCA1-rs799917</u></b>					
CC	129	18	1	CC vs TT vs CT	0.07
CT	145	9	0.41 (0.19 – 0.92)		
TT	27	4	1.04 (0.35 – 3.07)		
CC – CT	274	27	1.52 (0.53 – 4.36)	<u>(CC – CT)</u> vs TT	0.43
CC – TT	156	22	0.41 (0.19 – 0.89)	<u>(CC – TT)</u> vs CT	<b>0.02</b>
CT – TT	169	13	1.97 (0.96 – 4.02)	<u>(CT – TT)</u> vs CC	0.06
<b><u>CYP2D6-rs3892097</u></b>					
AA	14	1	1	AA vs AG vs GG	0.10
AG	77	13	3.06 (0.40 – 23.5)		
GG	210	17	1.47 (0.19 – 11.1)		
AA – AG	91	14	0.55 (0.27 – 1.12)	<u>(AA – AG)</u> vs GG	0.10
AA – GG	224	18	2.14 (1.05 – 4.36)	<u>(AA – GG)</u> vs AG	<b>0.03</b>
AG – GG	287	30	0.53 (0.07 – 3.87)	<u>(AG – GG)</u> vs AA	0.52

\*La référence dans chaque modèle correspond au groupe souligné

**Tableau 18. SNP associés à la survie sans récurrence métastatique (MFS).**

### ❖ Analyse des SNP associés à la MFS dans un modèle multivarié.

Comme pour la PFS, une analyse multivariée a été effectuée pour la MFS. Pour rappel, aucun des paramètres cliniques et anatomopathologiques usuels habituellement pronostiques testés en analyse univariée n'était associé à la MFS. De ce fait, seul les SNP retrouvés associés à la MFS ont été testés dans le modèle multivarié, sauf le SNP SLCO1B3 qui n'a pas été intégré dans cette analyse multivariée en raison du faible nombre d'événement (**Tableau 18**).

Le **tableau 19** résume les SNP restants associés à la MFS en analyse multivariée avec les HR respectifs du risque de rechute métastatique en cas de génotype défavorable. Ainsi, en cas de génotype homozygote de type **GG-TT** versus les hétérozygotes GT pour le SNP **NOS3**-rs1799983, le HR de rechute métastatique est multiplié par **3.11** (1.33-7.27) ( $p=0.0009$ ). En cas de génotype double homozygote **II** versus les CC-CT du SNP **CYP2B6**-rs 2279345, le HR de rechute métastatique est multiplié d'un facteur **2.38** (1.05-5.41) ( $p=0.038$ ). En cas de génotype double homozygote **CC-TT** versus les hétérozygotes CT pour le SNP **BRCA1**-rs799917, le HR de rechute métastatique est multiplié d'un facteur de **2.21** (1.01-4.85) ( $p=0.047$ ). Enfin, pour le 4<sup>ème</sup> cytochrome, **CYP2D6**-rs3892097, le HR de rechute métastatique est augmenté à **2.14** (1.04-4.40)  $p=0.039$  en cas de génotype **AG**.

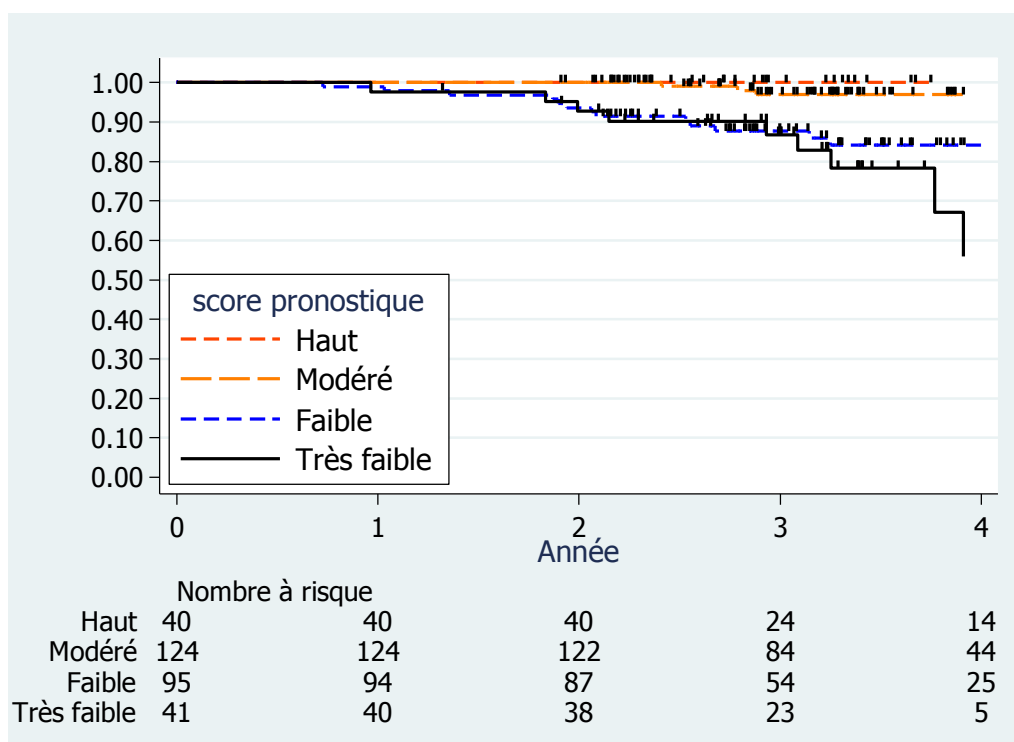
**→Au total, 4 des 46 SNP genotypés sont retrouvés associés de façon statistiquement significative à la MFS.**

Un score pronostique (**Figure 52**) de combinaisons de variables de poids importantes pour la MFS a également été construit. Ce score pronostique, contrairement à la PFS n'inclue aucun paramètre anatomopathologique (tous non significatifs en analyse univariée) mais les 4 SNP significatifs en univarié (contrairement à la PFS).

**Le taux de survie sans récurrences à 2 ans est de 93% pour les patientes ayant un score de 3 et 4 contrairement aux patientes ayant un score de 0 qui ont un taux de survie sans récurrences métastatiques de 100%.**

Progression sans récurrences métastatiques	Hazard Ratio	P	Score
<b>NOS3-rs1799983</b>		<b>0.009</b>	
GT	1		0
GG -TT	3.11 (1.33 – 7.27)		+1
<b>CYP2B6-rs2279345</b>		<b>0.038</b>	
TT	2.38 (1.05 – 5.41)		+1
CC -CT	1		0
<b>BRCA1-rs799917</b>		<b>0.047</b>	
CT	1		0
CC -TT	2.21 (1.01 – 4.85)		+1
<b>CYP2D6-rs3892097</b>		<b>0.039</b>	
AG	2.14 (1.04 – 4.40)		+1
AA - GG	1		0
<b>Score survie sans récurrences métastatiques</b>		<b>Médiane</b>	<b>Taux (2 ans)</b>
Survie haute: 0 (n=40)	1	-	<b>100%</b>
Survie modérée: 1 (n=124)	1.10 (0.12 – 9.91)	-	<b>100%</b>
Faible survie: 2 (n=95)	7.11 (0.94 – 53.67)	-	<b>93.63%</b>
Très faible survie : 3-4 (n=41)	10.25 (1.29 – 81.31)	-	<b>92.68%</b>

**Tableau 19.** SNP associés à la MFS en analyse multivariée.



**Figure 52.** Score pronostique sur la survie sans récurrence métastatique (MFS) dans la population n°1.

### III. Population traitée par FEC100-Docetaxel- Trastuzumab (HERCEPTIN) (Population n°2).

#### A. Caractéristiques démographiques et tumorales initiales.

##### 1. Caractéristiques démographiques des patientes.

Au total, 309 patientes sont traitées par FEC 100 + Taxotere + Trastuzumab (HERCEPTIN). Sur le plan des caractéristiques démographiques, l'âge médian au diagnostic est de **53 ans** (26-74 ans) et le délai médian entre l'histologie et l'inclusion est de 8.6 mois (0.1-47.2 mois). Le **tableau 20** montre la répartition des patientes par tranche d'âge.

Age	Patientes N= 109	Pourcentage
< 35 ans	9	8.2%
35 - 44 ans	22	20.2%
45 - 54 ans	27	24.8%
≥ 55 ans	51	46.8%

**Tableau 20.** Distribution des âges dans la population n°2.

##### 2. Caractéristiques tumorales initiales.

###### a) Stade tumoral TNM initial.

La taille tumorale médiane est de **17.5 mm** avec la plus petite tumeur mesurant 3 mm et la plus volumineuse 85 mm. La plupart des cancers du sein sont unilatéraux (43.1% de cancer du sein droit-55.1% de cancer du sein gauche), seul 2 patientes (1.8%) ont présenté un cancer du sein bilatéral. Sur le plan de la classification TNM, la plupart des tumeurs sont de stade inférieur à 5 cm soit des tumeurs inférieure à un stade T3 avec respectivement **42.2% et 27.5% de tumeurs T1 et T2**. Une très faible proportion de la population traitée par FEC100-TAXOTERE-HERCEPTIN présente des tumeurs volumineuses de plus de 5 cm avec 5.5% de tumeurs classées T3. Dans la population n°2, aucune patiente ne présentait un cancer du sein localement avancé. Une partie des patientes présentaient des tumeurs initialement non mesurables ou palpables dites infra cliniques, avec 17.4% de stade T0.

Sur le plan ganglionnaire, suite à l'évaluation clinique ou iconographique initiale, la grande majorité de la population, soit **78%** ne présentait aucun signe d'envahissement ganglionnaire axillaire. Au diagnostic initial, **18.4%** des patientes présentaient une atteinte ganglionnaire de type N1. Aucune patiente ne présentait une atteinte tumorale ganglionnaire massive avec une forte « maladie » régionale ganglionnaire de type N2 ou N3. Les caractéristiques tumorales sont résumées dans le **tableau 21**.

Caractéristiques de la tumeur initiale		N = 109	
Dimensions (mm)		N = 100	
Médiane (range)		17.5	
<i>Missing</i>		(3 – 85)	
		9	
Coté		N = 109	Pourcentage
Droit		47	43.1%
Gauche		60	55.1%
Bilatéral		2	1.8%
Classification UICC		N = 109	Pourcentage
T, n (%)			
T0		19	17.4%
T1		46	42.2%
T2		30	27.5%
T3		6	5.5%
T4		-	-
TX		4	3.7%
Tis		4	3.7%
N, n (%)			
N0		85	78%
N1		20	18.4%
NX		4	3.6%

**Tableau 21. Caractéristiques de la tumeur initiale dans la population FEC100-Docetaxel-Trastuzumab.**

\*Détail T1 (n=46):

- T1 (sans précision) (19)
- T1a (1)
- T1b (3)
- T1c (21)
- T1mic (2)



### **b) Caractéristiques anatomopathologiques initiales sur biopsies.**

Les caractéristiques anatomopathologiques sont disponibles sur biopsie et sur pièce opératoire. Les données sur biopsie dans la population 1 ont été analysées pour 107 des 109 patientes mais afin de simplifier les résultats, comme pour la population n°1, nous ne présentons que les résultats finaux histopathologiques sur la pièce opératoire de mastectomie et de ganglion sentinelle +/- curage. Cependant, à souligner également une bonne concordance globale entre la biopsie initiale et les résultats finaux après chirurgie, notamment pour le type histologique, la différenciation et le grade SBR, le statut hormonal, le statut triple négatif.

### **B. Caractéristique de la chirurgie.**

Au total, **56.9%** des patientes ont bénéficié d'une mastectomie partielle et **43.41%** d'une mastectomie totale (**Tableau 22**). Une évaluation sentinelle axillaire a concerné les 3/4 (67%) de la population (initialement considérée à **78% NO** (clinique/échographique).

**Un curage axillaire** a quant à lui été effectué dans **67%** des cas, soit d'emblée ou suite aux résultats du ganglion sentinelle.

En prenant les patientes avec un ganglion sentinelle ou un curage positif, on retrouve **65.1%** des patientes sans atteinte ganglionnaire et **34.9%** avec un envahissement prouvée donc N+.

L'évaluation initiale retrouvait un taux de cN+ à 18.4%, et au fine suite à la chirurgie axillaire ganglionnaire, **le taux de N+** est environ deux fois plus élevé à **34.9%**.

<b>Chirurgie (N=109)</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Mastectomie partielle	62	56.9%
Mastectomie totale	47	43.1%
Curage axillaire	73	67.0%
GAS	73	67.0%
<b>Type de chirurgie</b>		
Mastectomie partielle + curage	12	11.0%
Mastectomie partielle	1	<1%
Mastectomie partielle + GAS	27	24.8%
Mastectomie partielle + curage + GAS	22	20.2%
Mastectomie totale + GAS	8	7.3%
Mastectomie totale + Curage	23	21.1%
Mastectomie totale + GAS + curage	16	14.7%
<b>Classification UICC (Curage axillaire + GAS)</b>		
N –	71	65.1%
N +	38	34.9%

**Tableau 22.** Type de chirurgie effectuée dans la population n°2 : mastectomie partielle, mastectomie totale, curage ganglionnaire axillaire, ganglion sentinelle (GAS).

### C. Caractéristiques anatomopathologiques.

Au total, 89 patientes (**82%**) présentent un carcinome canalaire infiltrant (**CCI**) et 2 patientes (1.8%) un carcinome lobulaire infiltrant (CLI) représentant ainsi environ 83.5% des histologies tumorales retrouvées (**tableau 23**). Dans 16.5% des cas (18/09), un autre type histologique (CCI-CLI exclus) a été retrouvé dont la liste descriptive est donnée dans le **tableau 24**. Dans la majorité des cas, il s'agit de **tumeurs peu ou non différenciées (83.5%)** corrélées avec le grade de Sarff Bloom Richardson puisque 43.4% des tumeurs sont de grade II et 56.6% des tumeurs sont de grade III. Concernant le statut hormonal (RH), **58.1%** des tumeurs traitées dans cette population par FEC100-Taxotere-HERCEPTIN sont des tumeurs hormonosensibles dont 28.6% doublement positif RE + et RP+. Les tumeurs RE+ isolée sans positivité des RP représente au total 27.6% de la population totale. Les tumeurs RH négatives concernent 41.9% des patientes traitées par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab. Sur 105 patientes évaluables pour le statut HER2, 104 ont bien été retrouvées de statut HER2 soit 99.1%. L'index de

prolifération, le, **Ki67** est largement positif dans **93.9%** des cas. Concernant la présence des embols **péritumoraux**, ceux ci ont été retrouvés dans **38.5%** des cas.

Caractéristiques histologiques	N (pourcentage)	
<b>Histologie (N = 109)</b>		
Carcinome canalaire infiltrant	89	<b>81.7%</b>
Lobulaire infiltrant	2	1.8%
Autres*	18	16.5%
<b>Différenciation (N = 103)</b>		
Bonne	1	<1%
Moyenne	16	<b>15.5%</b>
Peu différencié ou pas	86	<b>83.5%</b>
<b>SBR (N= 106)</b>		
SBRI	-	-
SBRII	46	<b>43.4%</b>
SBRIII	60	<b>56.6%</b>
<b>Récepteurs Hormonaux (N = 105)</b>		
RH+	61	58.1%
RE+ RP+	30	
RE+ RP-	29	
RE- RP+	2	
RH -	44	<b>41.9%</b>
<b>Typage HER2 (N= 105)</b>		
HER +	104	<b>99.1%</b>
HER - (patientes : #717)	1	<1%
<b>Triple négatif (N= 103)</b>		
Oui	-	-
Non	103	100%
<b>KI67 (N= 82)</b>		
Négatif (<15%)	5	6.1%
Positif	77	<b>93.9%</b>
<b>Embols péritumoraux (N= 109)</b>		
Oui	42	<b>38.5%</b>
Non	67	61.5%

**Tableau 23.** Caractéristiques anatomopathologiques sur pièce opératoire des tumeurs de la population traitée par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab.

Autres histologies	Fréquence(n=18)
Lobulaire+métaplasique	1
Apocrine	7
Mixte ductulo-lobulaire	3
Médullaire	1
Micro-papillaire	5
Mucineux	1

\*Plusieurs patientes peuvent présenter la même caractéristique histopathologiques.

**Tableau 24. Variants histologiques (autres que CCI ou CLI ou mixtes) sur l'analyse de pièce de mastectomie.**

#### D. Chimiothérapie adjuvante

Les patientes ont reçu en médiane 24 cycles de traitement : 6 cycles de chimiothérapie et 18 injections de Trastuzumab. Au total, 64 sur les 109 patientes soit 58.7% ont reçu de façon « conforme » le protocole 3 cycles de FEC 100-3 cycles de Taxotère et 18 injections d'HERCEPTIN. Les « variants » sont plus nombreux que dans la population n°1 traitée par chimiothérapie seule. En effet, 36.7% soit 40/109 patientes ont reçu un nombre de cycle<24 essentiellement par non réalisation complète du protocole d'HERCEPTIN (nombre d'injections <18) dans 29.4% (32/109) des cas plus qu'à une insuffisance du nombre de cycles de chimiothérapie du protocole séquentiel.

Quatre patientes, soit 3.7% ont reçues plus de 24 cycles de traitement, dont deux (1.8%) en raisons d'une injection additionnelle de Trastuzumab (25 cycles), une avec une poursuite du trasztuzumab jusqu'à 32 cycles, probablement pour une poursuite évolutive métastatique en cours de traitement adjuvant et la dernière pour un protocole de type 6 FEC100 et une seule injection de Taxotere avec 18 cycles d'Herceptin.

Les caractéristiques des chimiothérapies adjuvantes sont résumées dans le **tableau 25.**

<b>Chimiothérapie adjuvante</b>		<b>N=109</b>	
<b>Nombre de cycles de CT</b>			
médiane (range)	24	(5 – 38)	
n(%)			
<24 cycles	40	36.7%	
24 cycles	65	<b>59.6%</b>	
>24 cycles	4	3.7%	
<b>Type de CT</b>			
3 FEC 100 + 1 Taxotère + 17 Herceptin	1	<1%	
3 FEC 100 + 1 Taxotère + 18 Herceptin	1	<1%	
3 FEC 100 + 2 Taxotère + Herceptin	1	<1%	
3 FEC 100 + 2 Taxotère + 18 Herceptin	2	1.8%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + Herceptin	2	1.8%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 4 Herceptin	4	3.7%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 5 Herceptin	1	<1%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 9 Herceptin	3	2.8%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 10 Herceptin	1	<1%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 11 Herceptin	1	<1%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 12 Herceptin	1	<1%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 13 Herceptin	2	1.8%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 14 Herceptin	2	1.8%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 15 Herceptin	4	3.7%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 16 Herceptin	3	2.8%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 17 Herceptin	10	9.2%	
<b>3 FEC 100 + 3 Taxotère + 18 Herceptin</b>	<b>64</b>	<b>58.7%</b>	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 19 Herceptin	2	1.8%	
3 FEC 100 + 3 Taxotère + 32 Herceptin	1	<1%	
3 FEC 100 + 4 Taxotère + 13 Herceptin	1	<1%	
5 FEC 100 + 1 Taxotère + 18 Herceptin	1	<1%	
6 FEC 100 + 1 Taxotère + 18 Herceptin	1	<1%	

**Tableau 25.** Caractéristiques de la chimiothérapie adjuvante dans la population n°2 traitée par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab.

## E. Données de suivi.

### 1. Progression et statut vital de la cohorte.

Au total, 15 patientes sur 309 sont en progression (13.8%) et 7 patientes sont décédées (6.4%). La cause de décès est la progression pour chacune d'elles. Les données sur la progression et le statut vital des patientes sont résumées dans le **tableau 26**.

**Parmi les patientes en progression, 10 patientes ont des métastases à distance (9.2%). Trois patientes ont une récurrence locale (2.8%), une patiente à un cancer du sein controlatéral, une a présenté une récurrence ganglionnaire et 4 patientes ont un second cancer.**

Pour rappel, comme mentionné précédemment, une patiente peut avoir plusieurs types de progressions possibles simultanément par exemple une rechute locale et régionale (ganglionnaire) ou encore locale et métastatique. De plus, avec le suivi, la première progression était annoté mais également les suivantes : par exemple, la récurrence locale puis l'apparition secondaire de métastases. Dans le cadre de l'étude, ce qui est retenu pour l'analyse est la nature de la 1<sup>ère</sup> progression pour analyser le lien avec des SNP, même si des progressions d'autres types apparaissent au décours du suivi de la patiente.

Ainsi, pour l'analyse de la 1<sup>ère</sup> progression, la liste suivante montre le nombre des 1<sup>ères</sup> progressions identifiées chez les 109 patientes : Sur les 15 progressions, les 1<sup>ères</sup> progressions étaient :

- Métastatiques : 7 patientes ont eu une 1<sup>ère</sup> progression métastatique
  - Rechute locale : 2 patientes ont eu une 1<sup>ère</sup> progression locale
  - Rechute locorégionale et métastatique : 1 patiente
  - Rechute ganglionnaire seule: 0
  - Rechute controlatérale: 1 patiente
  - Rechute second cancer : 4 patientes
- 
- Les localisations métastatiques les plus fréquentes sont hépatiques (6), pulmonaires (6), osseuses (5 patientes), cérébrale (1), médiastinale (1). Un autre sites métastatique a été le suivant : ganglionnaire sus claviculaire controlatéral pour une patiente.
  - Concernant les récurrences locales (n=3), l'histologie correspondait pour les 3 récurrences à une histologie infiltrante.
  - Concernant la récurrence sous forme de controlatéralisation (n=1), l' histologie était de type infiltrante, avec expression des récepteurs hormonaux de type RE+ RP+. Cette récurrence a été prise en charge par chirurgie conservatrice.
  - Concernant la récurrence ganglionnaire (n=1), la localisation était axillaire et ganglionnaire sus-claviculaire de type infiltrante.

- Dans le suivi, un second cancer a été diagnostiqué chez 4 des 109 patientes Il s'agissait d'un adénocarcinome rectal, d'un carcinome basocellulaire latérocervical, d'un cancer du poumon et d'un cancer rénal.

Suivi (N= 109)		N (pourcentage)
Progression (N= 109)	15	13.8%
<i>Métastases à distance</i>	10	
Os	5	
Poumon	6	
Foie	6	
SNC	1	
Médiastin	1	
Epanchement pleural	1	
Autres*	1	
<i>Récidive locale</i>	3	
<i>Cancer du sein controlatéral</i>	1	
<i>Récidive ganglionnaire</i>	1	
<i>Second cancer</i>	4	
Statut vital (N= 109)		
Vivants	102	93.6%
Décédés	7	6.4%
Perdus de vue	-	-
Causes de décès (N=20)		
Progression	7	6.4%

**\*Autres métastases:**

- Sus-claviculaire controlatéral (1)

**\*Détails sur les récidives:**

Récidive locale (n=3) : histologie : 3 infiltrants.

Cancer controlatéral (n=1): histologie 1 infiltrant ;RE+RP+ ; conservateur.

Récidive ganglionnaire (n=1): axillaire et 1 sus-claviculaire ; histologie : 1 infiltrant.

Second cancer (n=4) : adénocarcinome rectal, baso-cellulaire latéro-cervical, cancer du poumon et carcinome rénal

**Tableau 26.** Données de progression et du statut vital des patientes de la population FEC100-Docetaxel.

## 2. Survie sans progression (PFS), survie sans progression métastatique (MFS) et survie globale (OS).

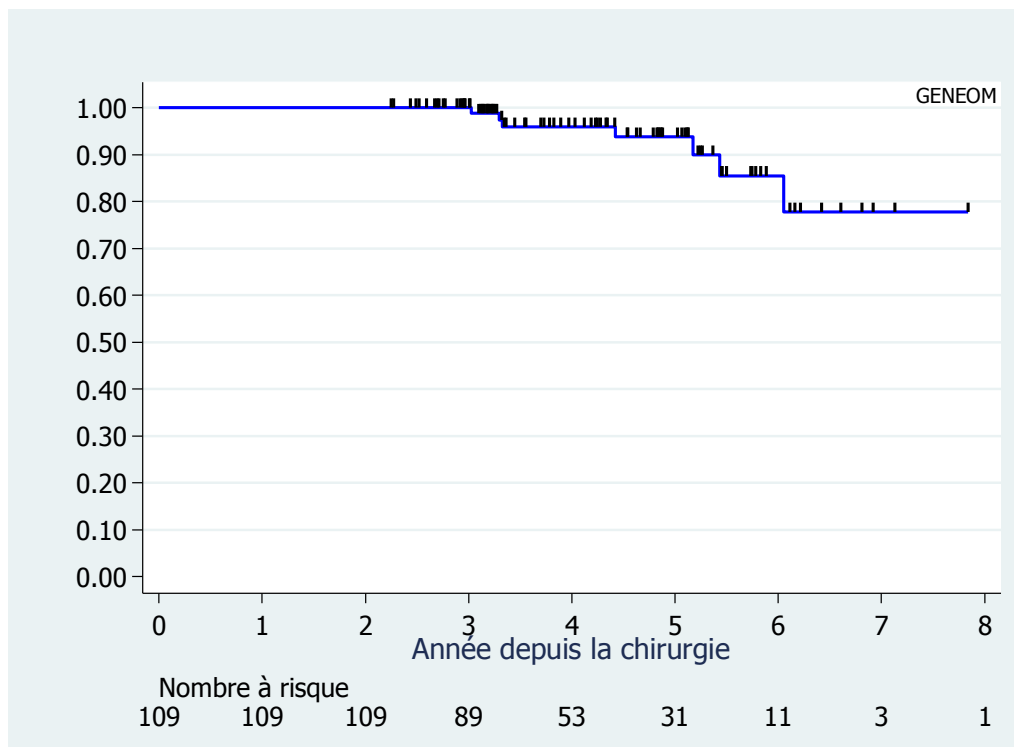
La survie globale et la survie sans récurrence sont estimées par la méthode de Kaplan-Meier en tenant compte des délais depuis la date de chirurgie. **Le suivi médian des patientes est de 4 ans (IC95% : 3.3 -4.5).**

### a) Survie globale de la cohorte

Dans l'analyse, 7 patientes sont décédées (6.4%). La médiane de survie est non atteinte même après huit années suivant la chirurgie (**tableau 27) (Figure 53).** Les taux de survie à 1 et 5 ans sont respectivement de 100% et de 93.8%.

Survie globale	N=109	
Nombre d'évènement	7	
Médiane (année) (IC95%)	Non atteinte	
1 an: taux de survie (IC95%)	100%	
2 ans : taux de survie (IC95%)	100%	
5 ans : taux de survie (IC95%)	93.8%	(83.7-97.7)

**Tableau 27.** Taux de survie globale (OS) à 1, 2 et 5 ans de la population n°2.



**Figure 53.** Courbe de survie globale de la population n°2.

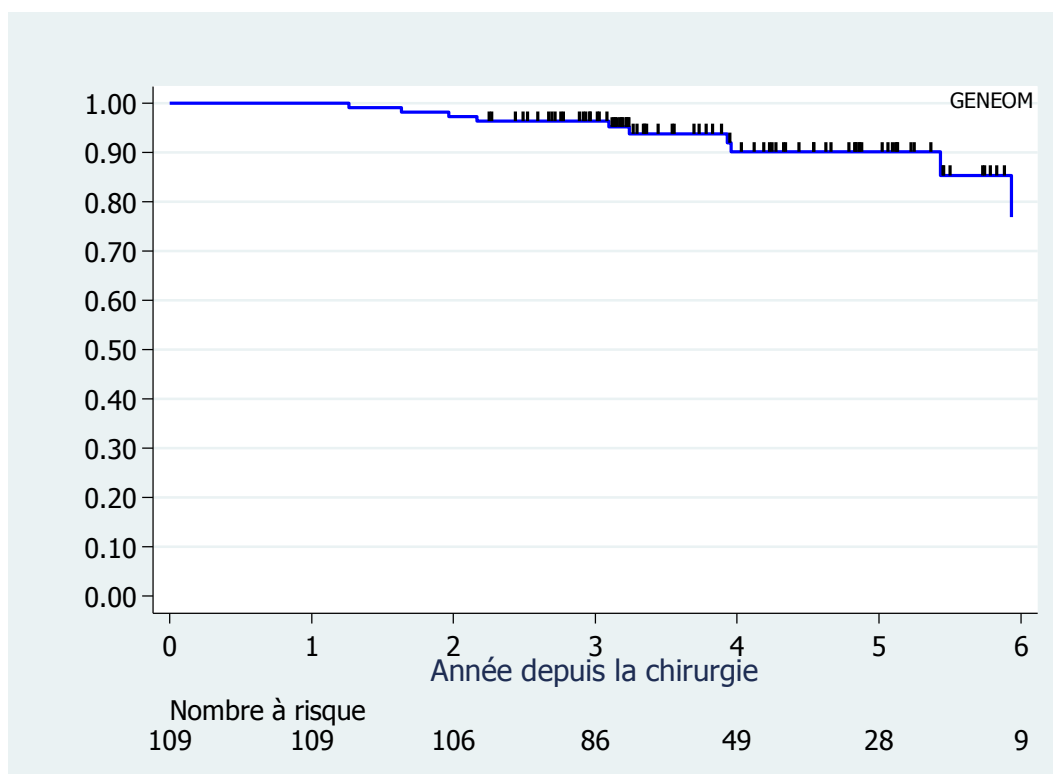


### b) Survie sans progression (toutes progressions confondues : PFS)

Dans cette analyse de PFS, seule sont prises en compte les progressions métastatiques, locales et régionales (ganglionnaires). Ne sont pas incluses les second cancers et les contrôlatéralisations. Dans l'analyse, 10 patientes ont progressé ou sont décédées (9.2%). La médiane de survie sans récidives n'est pas atteinte (**tableau 28**) (**Figure 54**). Les taux de survies sans récidives à 1, 2 et 5 ans sont respectivement de 98.7%, 94.2%, 90.1%

Survie sans récidives	N=109	
Nombre d'évènement	10	
Médiane (année) (IC95%)	Non atteinte	
1 an: taux de survie (IC95%)	100%	
2 ans : taux de survie (IC95%)	97.3%	(91.7 – 99.1)
5 ans : taux de survie (IC95%)	90.1%	(80.6 – 95.1)

**Tableau 28.** Taux de survie sans récidive (PFS) à 1, 2 et 5 ans de la population FEC100- Docetaxel-Trastuzumab.



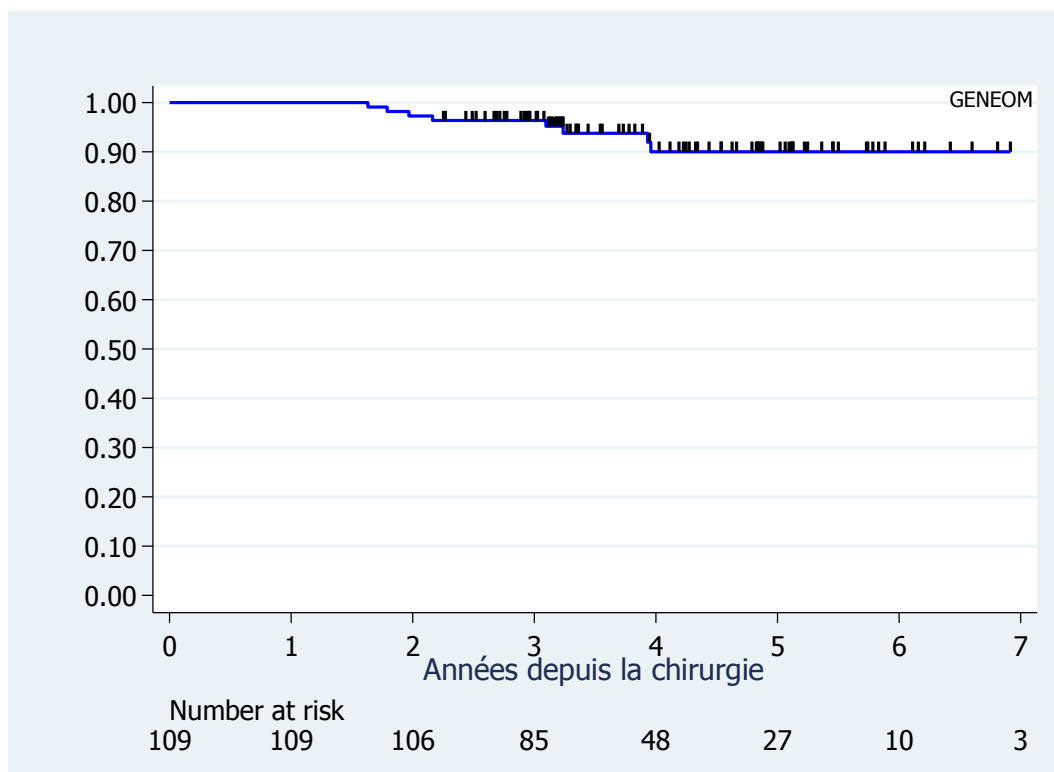
**Figure 54.** Courbe de survie sans progression (PFS) de la population n°2.

### c) Survie sans progressions métastatiques (MFS).

Dans l'analyse des premières progressions métastatiques, **8 patientes** seulement ont progressé ou sont décédées (7.3%). La médiane de survie sans récidives métastatiques n'est pas atteinte. Les taux de survie sans récidives métastatiques à 1, 2 ans et 3 ans sont respectivement de 100%, 97.3% et 90%. **(Tableau 29) (Figure 55).** Le nombre de progression métastatique et/ou décès est trop faible (10 évènements) pour étudier le taux de survie sans récidives métastatiques correctement suivant différentes variables prédictives comme l'âge, les récepteurs hormonaux et **n'a pas été effectuée comme pour la population n°1.**

Survie sans récidives	N=109	
Nombre d'évènement	8	
Médiane (année) (IC95%)	Non atteinte	
1 an: taux de survie (IC95%)	100%	
2 ans : taux de survie (IC95%)	97.3%	(91.7 – 99.1)
5 ans : taux de survie (IC95%)	90.0%	(80.4 – 95.1)

**Tableau 29.** Taux de survie sans récidive métastatique (MFS) à 1, 2 et 5 ans de la population FEC100-Docetaxel-Trastuzumab.



**Figure 55.** Courbe de survie sans progression métastatique (MFS) de la population n°2.

## F. Facteurs associées à la survie.

Afin d'évaluer l'impact des SNP sur le délai à la récurrence toutes récurrences confondues (PFS) et la récurrence métastatique (MFS), nous avons comparé comme pour la population n°1 (Test du Log Rank), les survies selon les variables pronostiques classiques. Ceci afin d'obtenir le « poids » éventuel de ces variables sur le pronostic des patientes de notre cohorte et de l'intégrer avec les SNP dans l'analyse multivariée finale. Une analyse a été effectuée de façon séparée pour la PFS et la MFS, les SNP étant eux mêmes analysées pour chacun des ces deux survies.

**La principale limite pour cette analyse dans la population n°2 est le nombre assez faible d'évènements (10) pour la PFS et (8) pour la MFS.**

### 1. Facteurs associées à la survie toutes progressions confondues (PFS)

La comparaison entre les différents groupes sur le délai de survie sans récurrences PFS (métastatiques et/ou locales et/ou locorégionales) retrouve une différence statistiquement significative entre les taux de survie sans rechute pour les patientes avec :

-un âge  $\geq 55$  ans avec un HR : 0.19 (0.04-0.91)  $p=0.03$

-une tumeur RH positive HR : 4.09 (0.86-19.57)  $p=0.06$

-des RE positifs HR : 4.24 (0.89-20.20)  $p=0.05$

-la présence d'embols péricarcinomaux HR : 5.30 (1.58-35.26  $p=0.02$

-et une tumeur de stade  $\geq T2$  (HR : 7.46 (0.36-4.62  $p=0.003$  Tableau 30) (Figure 56, 57, 58).

Nous retrouvons de façon inverse à la population n°1 et non habituelle que le statut RH ou RE est associé dans notre étude à une tendance à une moins bonne PFS. En effet, dans la population n°2, nous avons moins de tumeurs RH positives que

dans la population n°1 et constatons que pour les RH+, 8 évènements surviennent sur 61 patientes RH+ contre 2 sur 46 patientes RH-. De la même façon, pour RE+, 8 évènements surviennent sur les 59 patientes RE+ contre 2 sur les 46 RE négatives. Cette différence s'expliquerait pas des durées de suivi éventuellement différentes inhomogènes, puisque pour rappel deux cohortes existent au sein de cette étude une cohorte prospective avec des patientes pas encore en récurrence au moment de l'inclusion et une cohorte rétrospective qui ont été incluse une fois ayant rechuté. De plus, le recul médian est suivi est bref de 4 ans.

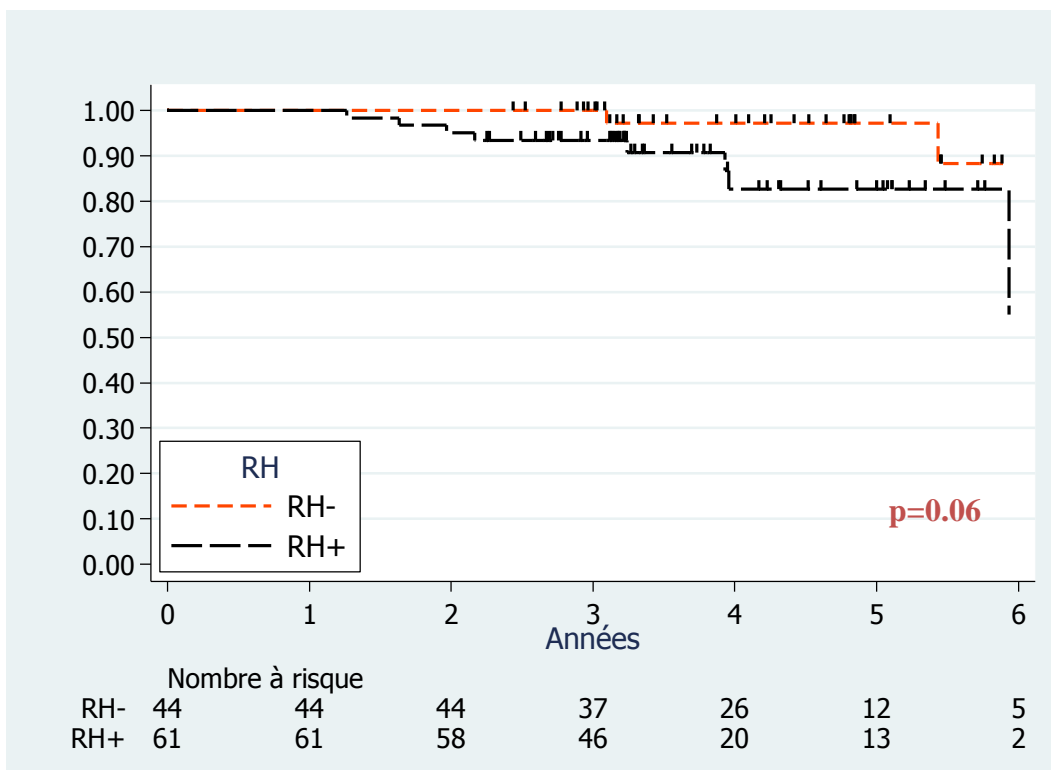
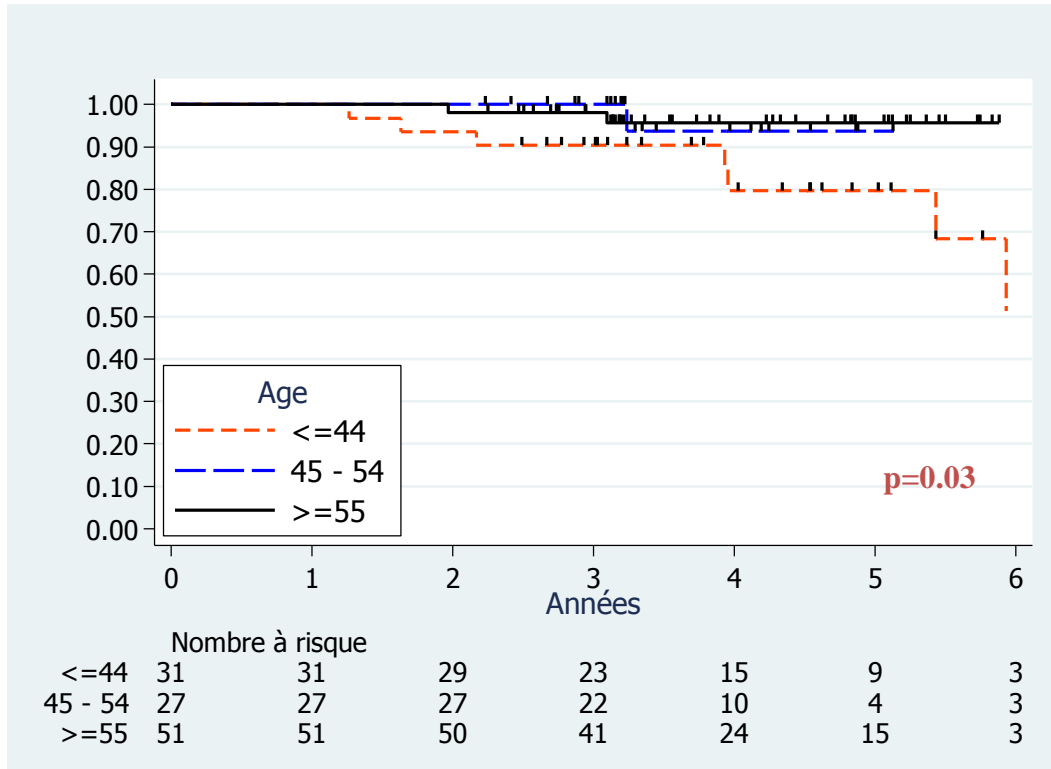
Aucune différence n'a été retrouvée pour le type histologique, le grade SBR, le statut HER2, le Ki67, le statut N. **Tableau 30**

**De plus, tous ces résultats sont à prendre avec précaution car le nombre d'évènements est trop faible pour une bonne interprétation.**

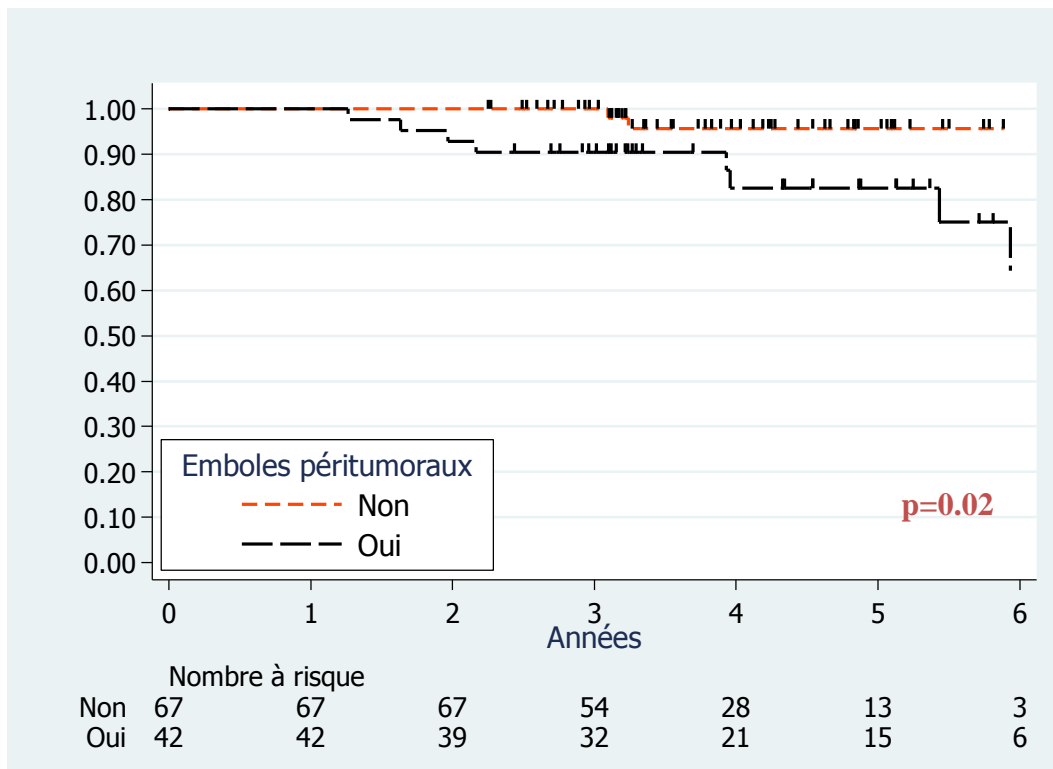
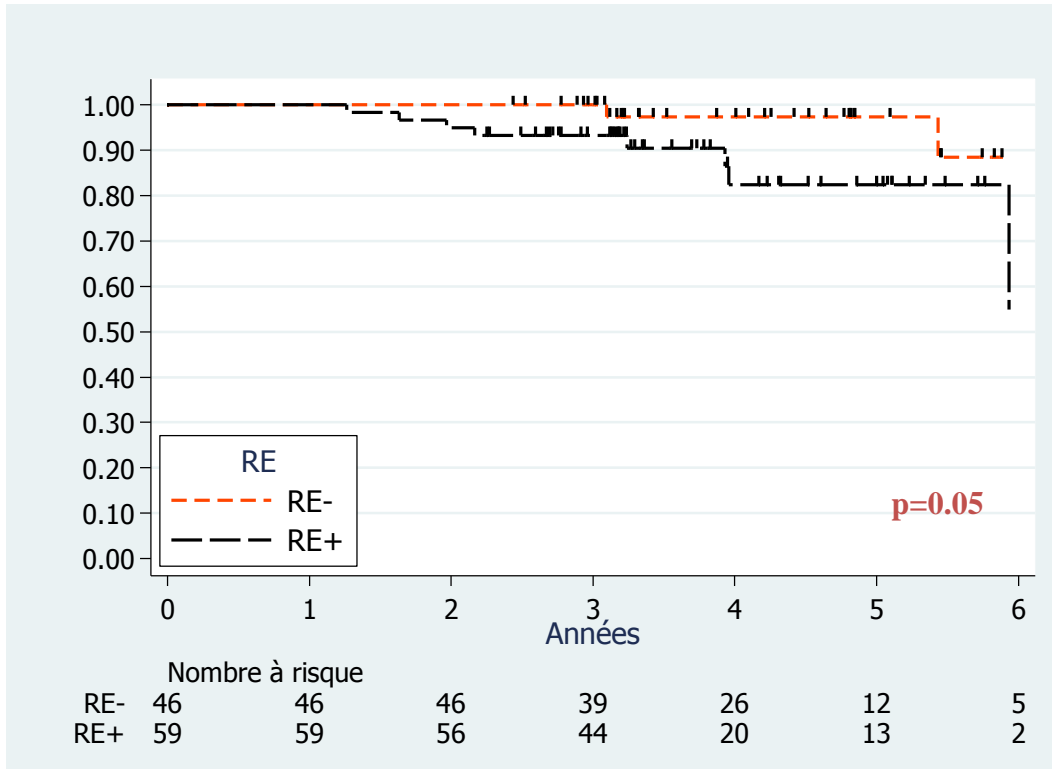
Caractéristiques	Patientes	Evènements	Médiane (années)	HR (95%CI)	P Log-Rank
<b>Age</b>					<b>0.03</b>
≤ 44 ans	31	7	-	1	
45 - 54 ans	27	1	-	0.18 (0.02 – 1.49)	
≥ 55 ans	51	2	-	0.19 (0.04 – 0.91)	
<b>Typage HER2</b>					<b>NA</b>
HER2+	104	10	-		
HER2-	1	0	-		
<b>*Attention cette comparaison ne sera pas faite au vue du nombre de patiente avec une tumeur HER2+</b>					
<b>SBR</b>					0.16
SBRII	46	2	-	1	
SBRIII	60	8	-	2.91 (0.61 – 13.95)	
<b>Récepteurs Hormonaux</b>					<b>0.06</b>
RH+	61	8	-	4.09 (0.86 – 19.57)	
RH-	44	2	-	1	
<b>Récepteurs Œstrogènes</b>					<b>0.05</b>
RE+	59	8	-	4.24 (0.89 – 20.20)	
RE-	46	2	-	1	
<b>Coté tumeur</b>					0.96
Droit	47	5	-	1	
Gauche	60	5	-	0.97 (0.28 – 3.37)	
<b>Types histologiques</b>					0.86
Carcinome canalaire infiltrant	89	9	-	1	
Lobulaire infiltrant	2	0	-	4.27e-15 (0 -.)	
Autres*	18	1	-	0.66 (0.08 – 5.26)	
<b>Emboles péritumoraux</b>					<b>0.02</b>
Oui	42	8	-	5.30 (1.11 – 25.33)	
Non	67	2	-	1	
<b>KI67</b>					<b>NA</b>
Négatif (<15%)	5	0	-		
Positif	77	6	-		
<b>*Attention cette comparaison ne sera pas faite au vue du nombre de patiente dans KI67 négatif</b>					
<b>Classification UICC</b>					
<b>T (initiale)</b>					<b>0.003</b>
T0-T1	65	2	-	1	
T2+	46	8	-	7.46 (1.58 – 35.26)	
<b>N (post-op)</b>					0.69
N -	71	6	-	1	
N +	38	4	-	1.30 (0.36 – 4.62)	

**Tableau 30. Survie sans récives (PFS) suivant différentes caractéristiques.**

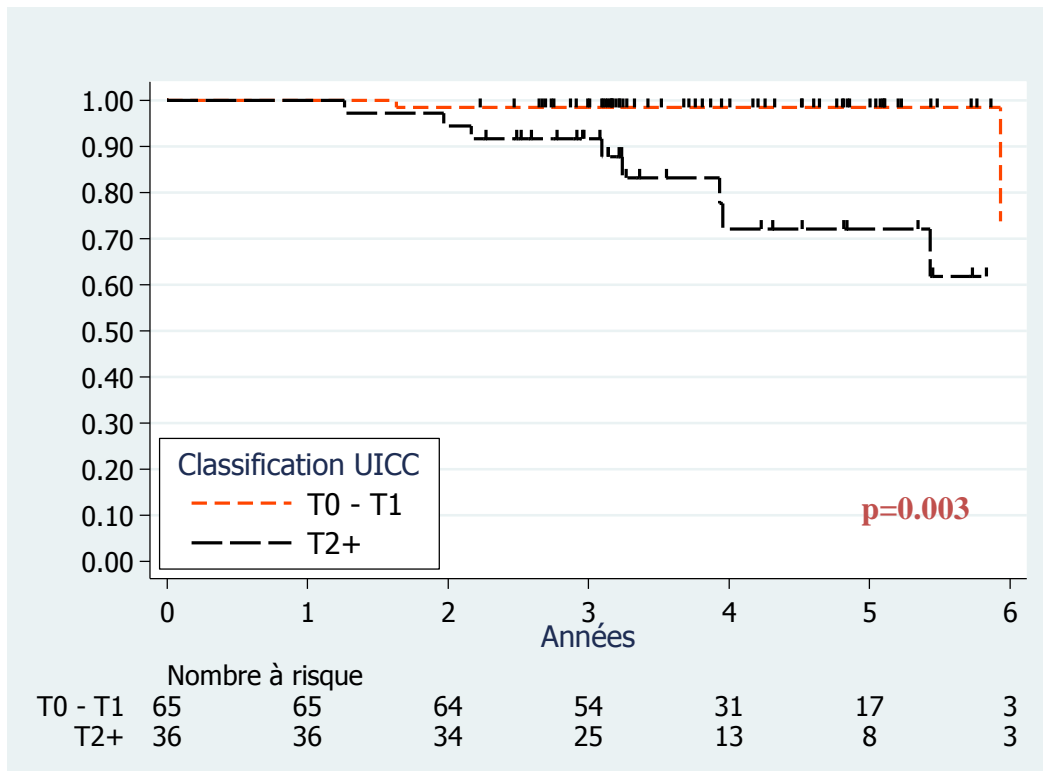
Comparaison par test du Log Rank.



**Figure 56.** Comparaison par test du Log Rank des courbes de survie sans progressions (PFS) en fonction de l'âge et du status RH.



**Figure 57.** Comparaison par test du Log Rank des courbes de survie sans progressions (PFS) en fonction du statut RE et des embols péricitumoraux.



**Figure 58.** Comparaison par test du Log Rank des courbes de survie sans progressions (PFS) en fonction de la taille tumorale.

## 2. Facteurs associés à la survie sans progression métastatique (MFS)

D'après le test de log Rank, il n'y a plus de différence significative parmi les caractéristiques comme l'âge, RE, RP sur le taux de survie sans récidives métastatiques en première progression, **seule la classification UICC T et les emboles péri-tumorales sont significativement différents au seuil de 5% (tableau 31) (Figure 59).**

Ainsi, en cas d'embols, le HR est de 4.72 (0.95-23.42 p=0.04) et en cas de stade  $\geq T2$ , le HR est 14.5 (1.78-118.05p=0.001).

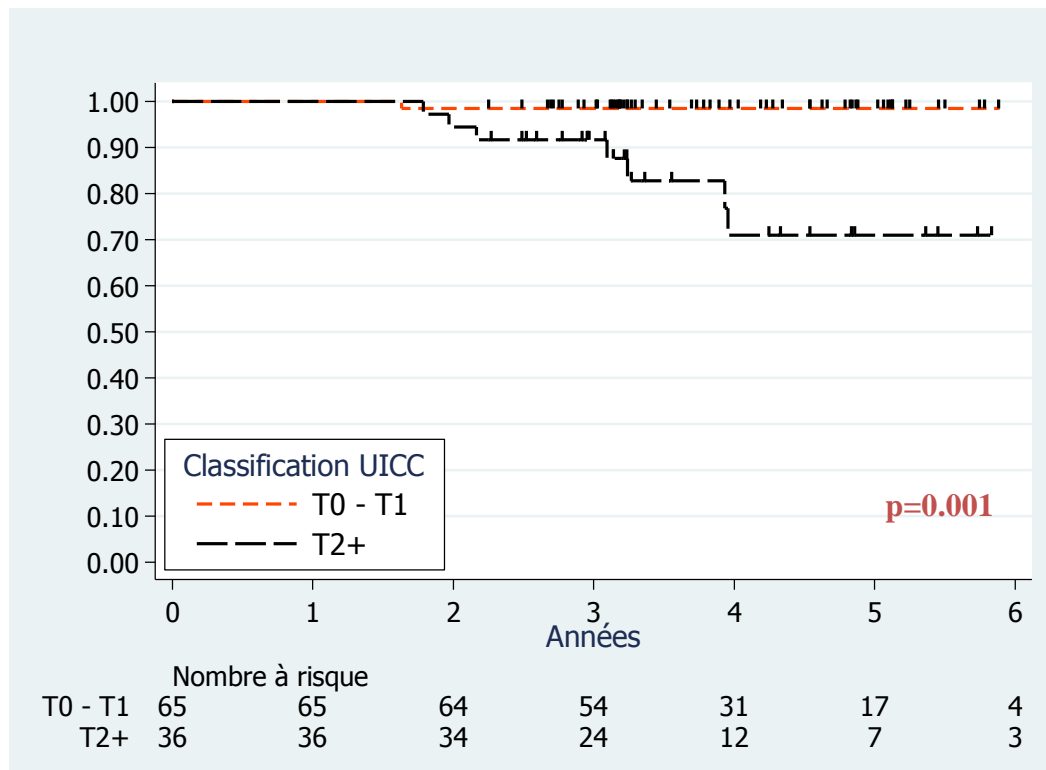
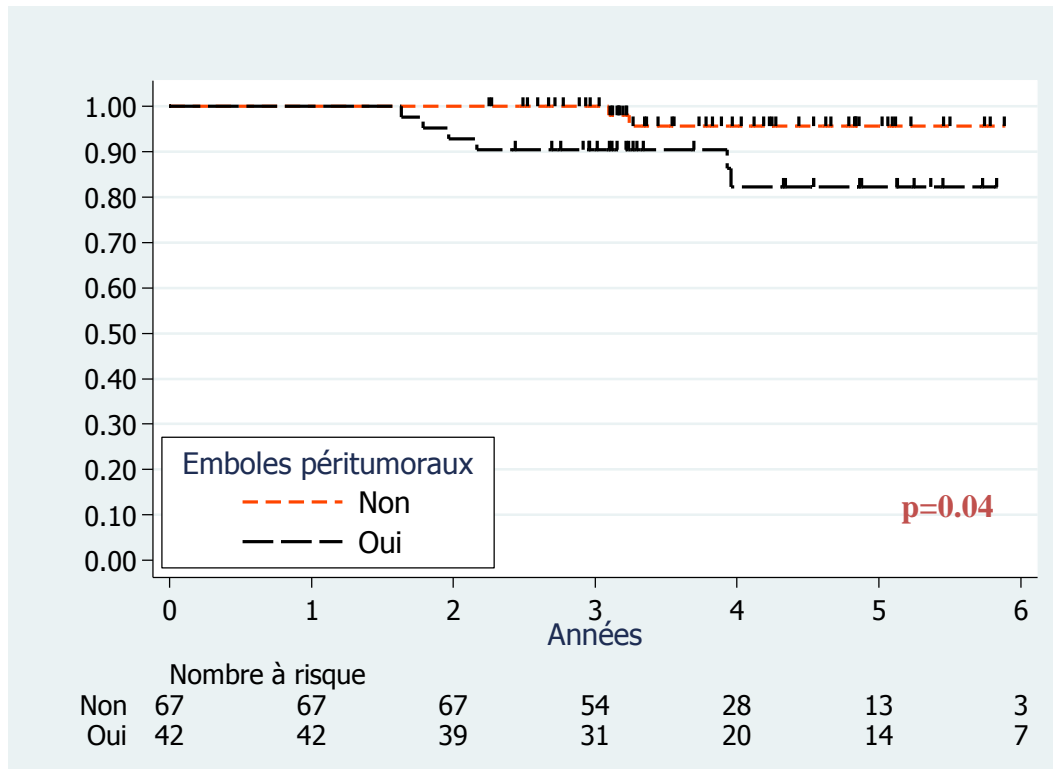
**Ces résultats sont à prendre avec encore plus de précaution que la partie 1 (PFS) puisque le nombre d'évènements est encore plus faible (seulement 8 progressions métastatiques ou décès).**



Caractéristiques	Patientes	Evènements	Médiane (années)	HR (95%CI)	P Log-Rank
<b>Age</b>					<b>0.10</b>
≤ 44 ans	31	5	-	1	
45 - 54 ans	27	1	-	0.23 (0.03 – 1.99)	
≥ 55 ans	51	2	-	0.24 (0.05 – 1.21)	
<b>Typage HER2</b>					<b>NA</b>
HER2+	104	8	-		
HER2-	1	0	-		
<b>*Attention cette comparaison ne sera pas faite au vue du nombre de patiente avec une tumeur HER2+</b>					
<b>SBR</b>					0.22
SBRII	46	2	-	1	
SBRIII	60	6	-	2.60 (0.52 – 12.91)	
<b>Récepteurs Hormonaux</b>					0.24
RH+	61	6	-	2.52 (0.51 – 12.58)	
RH-	44	2	-	1	
<b>Récepteurs Œstrogènes</b>					0.22
RE+	59	6	-	2.65 (0.53 – 13.18)	
RE-	46	2	-	1	
<b>Coté tumeur</b>					0.79
Droit	47	4	-	1	
Gauche	60	4	-	0.83 (0.21 – 3.30)	
<b>Types histologiques</b>					0.45
Carcinome canalaire infiltrant	89	8	-	1	
Lobulaire infiltrant	2	0	-	4.70e-16 (0 -.)	
Autres*	18	0	-	4.68e-16 (0 -.)	
<b>Emboles péritumoraux</b>					<b>0.04</b>
Oui	42	6	-	4.72 (0.95 – 23.42)	
Non	67	2	-	1	
<b>KI67</b>					<b>NA</b>
Négatif (<15%)	5	0	-		
Positif	77	4	-		
<b>*Attention cette comparaison ne sera pas faite au vue du nombre de patiente dans KI67 négatif</b>					
<b>Classification UICC</b>					
<b>T</b>					<b>0.001</b>
T0 – T1	65	1	-	1	
T2+	36	7	-	14.50 (1.78 – 118.05)	
<b>N</b>					0.43
N0	71	4	-	1	
N +	38	4	-	1.74 (0.44 – 6.97)	

**Tableau 31.** Survie sans récurrences métastatique (MFS) suivant différentes caractéristiques dans la population n°2.

Comparaison par test du Log Rank.



**Figure 59.** Comparaison par test du Log Rank des courbes de survie sans progressions métastatique (MFS) en fonction de la présence d'embols et de la classification UICC T.

## G. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) et délai de survie sans rechute (PFS).

### 1. Analyse des SNP

L'analyse des SNP effectuée pour la population est identique à la population n°1 et concerne ainsi un total de 46 SNP sur les 53 SNP sélectionnés sur les données de la littérature.

Le génotypage n'a pas été réalisé **pour les patientes n°414, 505, 598** (problème de classification initiale avec réalisation secondaire du génotypage impossible).

**L'association entre le délai de survie sans récurrences et SNP est donc évaluable pour 106 patientes.**

### 2. Relation SNP et délai toutes récurrences (PFS).

Seul l'analyse du délai entre PFS et SNP dans la population n°2 est effectuée, le nombre d'évènements métastatiques étant trop faible (8) pour permettre une analyse statistique entre MFS et SNP. Au total, 10 patientes sur 106 ont progressé ou sont décédées. Les 106 patientes correspondent à celles dont le génotypage est présent.

**Les résultats qui sont présentés sont à prendre avec prudence au vu du peu d'évènements (progression et mort).**

#### ❖ SNP associé à la PFS

L'association entre la survie sans récurrences et SNP est analysée (ex. pour un SNP de génotype AA/AC/CC) :

- parmi les 3 groupes : AA vs AC vs CC
- parmi les 2 groupes : AA vs (AC + CC)
- parmi les 2 groupes : (AA + AC) vs CC
- parmi les 2 groupes : (AA + CC) vs AC

La survie sans récurrence (PFS) est associée significativement au génotypage de 4SNP sur les 46 SNP analysées (**tableau 32**) :

**1.CYP2B6-rs2279345** : la répartition dans la population est la suivante 43 patientes de génotype CC (40.6%), 44 CT (41.5%), 19 TT (17.9%). La survie diffère entre les 3 groupes CC (1 évènement), CT (8 évènements) et TT (1 évènement), entre les 2 groupes CC (1 évènement), CT-TT (9 évènements) et entre les 2 groupes CT (8 évènements) et CC -TT (2 évènements). En cas de génotype **CT**, le HR de rechute est multiplié par **5.73** (1.22-27), 1 n'est pas dans l'IC.

**2.CES2-rs11075646**: la répartition dans la population est 87 CC (82.1%), 18 CG (17%), 1 GG (<1%). La survie diffère entre les 3 groupes CC (8 évènements), CG (1 évènement) et GG (1 évènement) et entre les 2 groupes GG (1 évènement) et CC -CG (9 évènements). En cas de génotype **GG**, le HR est diminué à **0.58** mais peut être considéré comme non interprétable, 1 étant dans l'intervalle de confiance. **De plus, ce résultat est à prendre avec grande précaution au vu du nombre de patientes (1 patiente) dans le groupe GG et n'a pas été inclus dans l'analyse multivariée.**

**3.MTHFR-rs1801133**: la répartition dans la population est 42 CC (39.6%), 50 CT (47.2%), 14 TT (13.2%). La survie diffère entre les 2 groupes CC (1 évènement), CT-TT (9 évènements) et entre les 2 groupes CT (8 évènements) et CC-TT (2 évènements). En cas de génotype **CT**, le HR est multiplié par **4.61** mais comme le SNP précédent, ne peut pas être considéré comme significatif, 1 étant dans l'intervalle de confiance. Le génotype **CC** est associé à une diminution du risque de rechute avec un HR **0.16** mais comprenant 1 également. **Ainsi, pour MTHFR, les résultats bien que significatifs ne sont pas interprétables et on ne peut conclure en raison de leur intervalle de confiance.**

**4. ABCC4-rs9561778**: la répartition dans la population est 60 GG (56.6%), 40 GT (37.7%), 6 TT (5.7%). La survie diffère entre les 2 groupes GG (9 évènements), GT -TT (1 évènement). Le HR est multiplié par **7.55** (0.96-59.61) en cas de génotype **GG**.

SNP	Patientes	Evènement	HR (IC 95%)	Modèle	p
<b>CYP2B6-rs2279345</b>					
CC	43	1	1	CC vs TT vs CT	<b>0.04</b>
CT	44	8	8.44 (1.05 – 67.63)		
TT	19	1	2.79 (0.17 – 45.48)		
CC –CT	87	9	0.59 (0.07 – 4.74)	(CC –CT) vs TT	0.62
CC –TT	62	2	5.73 (1.22 – 27.00)	(CC –TT) vs CT	<b>0.01</b>
CT –TT	63	9	0.14 (0.02 – 1.14)	(CT – TT) vs CC	<b>0.03</b>
<b>CES2-rs11075646</b>					
CC	87	8	1	CC vs CG vs GG	<b>0.01</b>
CG	18	1	0.65 (0.08 – 5.18)		
<b>GG**</b>	1	1	11.13 (1.34 – 92.70)		
CC –CG	105	9	0.58 (0.07 – 4.57)	(CC –CG) vs GG	<b>0.003</b>
CC – GG	88	9	0.82 (0.17 – 3.89)	(CC –GG) vs CG	0.60
CG – GG	19	2	11.84 (1.44 – 97.26)	(CG –GG) vs CC	0.81
<b>MTHFR-rs1801133</b>					
CC	42	1	1	CC vs TT vs CT	0.09
CT	50	8	7.02 (0.88 – 56.16)		
TT	14	1	3.21 (0.20 – 51.30)		
CC -CT	92	9	0.76 (0.10 – 6.02)	(CC –CT) vs TT	0.80
CC -TT	56	2	4.61 (0.98 – 21.70)	(CC –TT) vs CT	<b>0.03</b>
CT -TT	64	9	0.16 (0.02 – 1.27)	(CT – TT) vs CC	<b>0.05</b>
<b>ABCC4-rs9561778</b>					
GG	60	9	1	GG vs TT vs GT	0.08
GT	40	1	0.15 (0.02 – 1.21)		
<b>TT**</b>	6	0	8.02e-16 (0 -.)		
GG -GT	100	10	5.67e-16 (0 -.)	(GG –GT) vs TT	0.42
GG -TT	66	9	0.17 (0.02 – 1.34)	(GG –TT) vs GT	<b>0.06</b>
GT - TT	46	1	7.55 (0.96 – 59.61)	(GT – TT) vs GG	<b>0.02</b>

**Tableau 32. SNP associés à la survie sans récurrence (PFS) dans la population n°2.**

❖ Analyse des SNP associés à la PFS dans un modèle multivarié dans la population n°2.

Les SNP qui sont sélectionnés pour l'analyse multivariée sont les suivants : CYP2B6-rs2279345 [CC vs TT vs CT], CYP2B6-rs2279345 [(CC-TT) vs CT], MTHFR-rs1801133 [CC vs TT vs CT], MTHFR-rs1801133 [(CC-TT) vs CT] et ABCC4-rs9561778 [(GT-TT) vs GG].

Pour rappel, les paramètres cliniques et anatomopathologiques usuels habituellement pronostiques testés en analyse univariée retrouvés associés à la PFS dans cette population n°2 étaient : **l'âge, RH+, RE+, la taille ≥ T2, et les embols vasculaires.** Néanmoins les deux variables récepteurs hormonaux et récepteurs œstrogènes sont corrélées du fait de leur définition et une seule a donc été utilisée dans le modèle multivarié. La variable « récepteurs hormonaux » a été celle sélectionnée car elle a permis la construction du meilleur modèle.

Le **tableau 33** résume les variables cliniques et les SNP restants associés à la PFS en analyse multivariée avec les HR respectifs du risque de rechute métastatique en cas de génotype défavorable. Ainsi, en cas de tumeur **>T2**, le HR de rechute métastatique est multiplié par **10.78** (2.12-54.90) (p=0.004). En cas de génotype **hétérozygote TT** pour le SNP **CYP2B6-rs2279345** versus les homozygotes CC-TT, le HR de rechute métastatique est multiplié par **9.67**(1.82-51.28) (p=0.008). En cas de génotype **hétérozygote CT** versus les doubles homozygotes CC-TT du SNP **MTHFR-rs1801133**, le HR de rechute métastatique est multiplié d'un **5.62** (1.19-26.59) p=0.03).

**Le SNP CES2 n'avait pas été inclus dans l'analyse et ABCC4 ne sort pas significatif dans cette multivariée.**

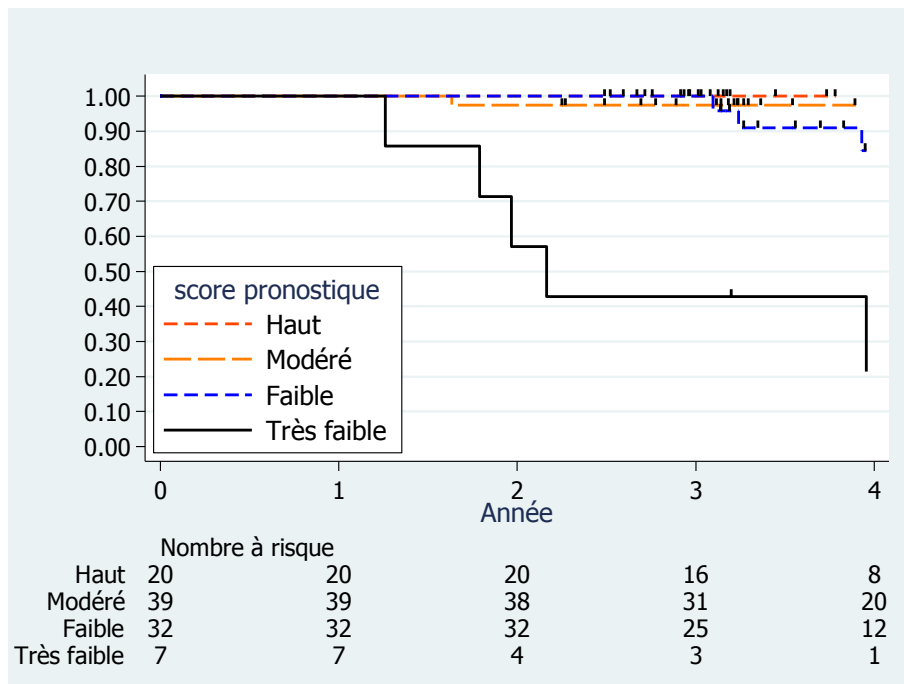
**Néanmoins, l'interprétation reste tout de même à prendre avec précaution, le nombre d'évènements est trop faible (seulement 10 progressions et/ou décès)**

**Au total, 2 des 46 SNP genotypés sont retrouvés associés de façon statistiquement significative à la PFS dans cette population n°2 traitée par FEC100-Docetaxel-Herceptin.**

Un score pronostique (**tableau 33**) (**figure 60**) de combinaisons de variables de poids important pour la PFS a également été construit. Ce score pronostique, inclue une variable tumorale, la taille et les 2 SNP significatifs en multivarié. **Le taux de survie sans récurrences à 2 ans est de 57% pour les patientes ayant un score de 3 contrairement aux patientes ayant un score de 0 qui ont un taux de survie sans récurrences de 100%. Le nombre de patientes avec un score de 3 est faible, ce résultat est donc à prendre avec grande précaution. De plus, l'analyse multivariée comporte peu d'évènements pour une bonne interprétation statistique.**

Progression sans récidi	Hazard Ratio	p	Score
<b>Classification UICC (T)</b>		<b>0.004</b>	
T0 – T1	1		0
T2+	10.78 (2.12 – 54.90)		+1
<b>CYP2B6-rs2279345</b>		<b>0.008</b>	
CT	9.67 (1.82 – 51.28)		+1
CC –TT	1		0
<b>MTHFR-rs1801133</b>		<b>0.03</b>	
CT	5.62 (1.19 – 26.59)		+1
CC –TT	1		0
<b>Score survie sans récidi</b>	<b>Modèle n°1</b>	<b>Médiane</b>	<b>Taux (2 ans)</b>
Survie haute: 0 (n=20)	1	-	100%
Survie modérée: 1 (n= 39)	5.93e+08	-	97.44%
Faible survie: 2 (n=32)	3.37e+09 (3.75e+08 - 3.04e+10)	5.9	100%
<b>Très faible survie : 3 (n=7)*</b>	<b>3.40e+10 (.67e+09 - 3.16e+11)</b>	<b>2.2</b>	<b>57.14%</b>
<b>Score survie sans récidi (3 classes)</b>	<b>Modèle n°2</b>	<b>Médiane</b>	<b>Taux (2 ans)</b>
Survie haute: 0 (n=20)	1	-	<b>100%</b>
Survie modérée: 1 (n= 39)	5.58e+08	-	<b>97.44%</b>
Faible survie: 2 - 3 (n=39)	6.03e+09 (7.60e+08 - 4.79e+10)	5.9	<b>92.31%</b>

**Tableau 33.** Variables associées à la PFS dans la population n°2 en multivariée.



**Figure 60.** Score pronostique sur la survie sans récidive (PFS) dans la population n°2.

## IV. SNP et équilibre de Hardy Weinberg

Comme mentionné dans la partie méthodologique, il a été nécessaire pour valider les sondes utilisées de vérifier que l'équilibre de Hardy Weinberg (HW) était bien respecté, c'est à dire que les fréquences alléliques ou génotypiques pour chaque SNP testé dans une population saine étaient statistiquement identiques à celles référencées dans la base de données dbSNP database pour une population caucasienne. La comparaison a été effectuée entre une population dite « saine » sur des échantillons de sang issus de l'établissement français du sang (EFS), et non sur une population malade. En effet, le but est d'éviter un biais lié à la présence du cancer dans la population de malades, c'est à dire de constater une différence significative de répartition des fréquences génotypiques ou alléliques, s'expliquant par le fait que le SNP identifié est lié au risque de cancer.

Sur les SNP qui ont été retrouvés associés en adjuvant à la PFS ou à la MFS dans la population 1 et 2 :

-7 SNPs vérifient l'équilibre de HW : Aucune différence statistiquement significative (données non présentées)

- CCND1-rs9344
- CYP2B6-rs2279345
- NOS3-rs1799983
- SLCO1B3-rs11045585
- BRCA1-rs799917
- CYP2D6-rs3892097
- MTHFR-rs1801133

-2 SNPs ne vérifient pas l'équilibre de HW : Il existe une différence statistiquement significative pour les fréquences génotypiques comme alléliques (**Tableau 34**)

- **CES2-rs11075646**
- **ABCC4-rs9561778**



SNP	Population	N	Génotype			p value	Allèle		P value
			XX n (%)	XY n (%)	YY n (%)		X n (%)	Y n (%)	
ABCC4 rs95617 78	EFS	168	132 (78.57)	33 (19.64)	3 (1.79)	0.0292†	297 (88.39)	39 (11.61)	0.0119*
	dbSNP	226	150 (66.40)	70 (31.00)	6 (2.70)		370 (81.90)	82 (18.10)	
CES2 rs11075 646	EFS	168	140 (83.33)	26 (15.48)	2 (1.19)	0.0048†	306 (91.07)	30 (8.93)	0.0079*
	dbSNP	42	26 (61.90)	16 (38.10)	0 (0.00)		68 (81.00)	16 (19.00)	

**Tableau 34. Fréquences des génotypes et allèles des SNPs dans la population de l'EFS versus celles de la base de données dbSNP.**

Mise en évidence d'une différence statistiquement significative pour 2 SNP sur les 9 retrouvés associés à la MFS ou PFS dans la population n°1 et n°2. \*Chi-2 test †Fisher exact test.

Ainsi les deux **SNPs, CES2-rs11075646 et ABCC4-rs9561778, retrouvés associés à la PFS dans la population n°2** ne sont pas interprétables compte tenu du déséquilibre de répartition des fréquences alléliques et génotypiques.

## DISCUSSION

### I. Caractéristiques de la population d'étude.

#### A. Caractéristiques cliniques, chirurgicales et anatomopathologiques des populations.

En observant les données descriptives des deux populations, à la fois sur le plan clinique et anatomopathologique, nous pouvons dire que celles-ci sont accord avec les données de la littérature, notamment pour une population de patientes atteintes de cancer du sein et recevant spécifiquement de la chimiothérapie adjuvante.

##### 1. Population n°1

Sur le plan clinique, l'âge médian au diagnostic est de 51 ans (21-74) avec 5.2% de patientes âgées de moins de 35 ans et plus de 75% des patientes âgées de plus de 45 ans. Concernant la taille tumorale, la médiane de taille est de 18mm (2-80) avec essentiellement des tumeurs T1 de moins de 2 cm (38.8%) mais T1c surtout et T2 (33.3%) qui correspond à des tailles tumorales conformes aux indications de chimiothérapie adjuvante (41). Il existe peu de tumeurs T3 (5.2%) ou T4 (1.6%) qui correspondent plus à des indications de chimiothérapie néoadjuvante. Dans notre population n°1, 40.8% des patientes ont une atteinte ganglionnaire, ce qui apparaît cohérent dans une population HER2 négatifs qui reçoit de la chimiothérapie adjuvante, l'atteinte ganglionnaire étant un critère pronostique majeur (33) (34) (35) et une indication validée de chimiothérapie adjuvante par la Conférence de consensus de Saint Gallen (21) si N>3.

Sur le plan du traitement chirurgical, la chirurgie est conservatrice dans la majorité des cas avec 59.6% de patientes traitées par mastectomie partielle, 40.4% par

chirurgie radicale. L'exploration sentinelle est fréquente, de 60.5%, mais cohérente avec l'évaluation ganglionnaire initiale (clinique-échographique) puisque 80.5% des patientes sont initialement considérées comme N0. Cependant, comme il s'agit majoritairement de tumeurs T1c-T2, il s'agit d'indication à une exploration des aires ganglionnaires.

Sur le plan anatomopathologique, nous avons observé un bon taux de concordance entre les données de la biopsie et celle de la pièce opératoire. Ainsi, nous observons une majorité de cancers infiltrant de type canalaire de 79.3%, avec peu de lobulaire de l'ordre de 9.4% et 11.3% de variants. Cette répartition correspond à la répartition habituelle des types anatomopathologiques rencontrés, avec peu être un peu plus de variants (35) (42). Mais il ne s'agit pas d'une population globale de patientes atteintes de cancer du sein mais d'une sous population recevant spécifiquement de la chimiothérapie adjuvante. Le reste des données est cohérent avec des tumeurs « agressives » qui sont une indication de chimiothérapie (21) : tumeur peu ou pas différencié (71.6%), grade SBR intermédiaire 2 (47.2%) ou élevé 3 (46.3%), avec un Ki67>15% dans 86.5% des cas, et un autre critère pronostique défavorable, indicatif également d'agressivité (22), de mauvais pronostique (29), les embols tumoraux, retrouvés dans 40.7% des cas de la population n°1. L'essentielle des tumeurs n'exprime pas HER2, ce qui est attendu dans cette population recevant uniquement du FEC100-Docetaxel sans Trastuzumab. Seul 4 patientes sont décrites comme HER2+, mais celle ci n'ont pas reçues de Trastuzumab, probablement pour des contre-indications cardiaques après chimiothérapie par FEC100. Nous observons majoritairement des tumeurs sur exprimant des RH, de l'ordre de 77.5%, seul 22.5% des tumeurs sont RH-. Cette distribution semble cohérente avec les séries de la littérature (57). Les tumeurs triples négatives représentent 22.4% des cas traités par chimiothérapie adjuvante par FEC100-Docetaxel, ce qui semble habituel en terme de répartition.

Sur le plan du traitement adjuvant, il n'y a pas eu de retard à l'initiation de la chimiothérapie adjuvante avec un délai médian normal à 2 mois (4jours -155 jours). Le traitement adjuvant à bien consisté pour 298 des 309 malades en 3 cycles de FEC100 et 3 cycles de Docetaxel (96.8%). Le protocole adjuvant est donc bien conforme sans biais potentiel liés à des éventuels traitements adjuvants incomplets.

## 2. Population n°2

Sur le plan clinique, l'âge médian au diagnostic est globalement similaire à la population HER2 négative, de 53 ans (26-74) avec néanmoins un peu plus de patientes jeunes, âgées de moins de 35 ans (8.2% vs 5.2%) et 71.6% des patientes âgées de plus de 45 ans. Concernant la taille tumorale, la médiane de taille est de 17.5 mm (3-85) avec essentiellement des tumeurs T1, de moins de 2 cm (42.2%) mais T1b-T1c essentiellement et T2 (27.5%) qui correspond aux indications de chimiothérapie adjuvante (41). Il existe peu de tumeurs T3 (5.5%) et aucune tumeur T4 (0%) qui relèvent d'une chimiothérapie néoadjuvante. Dans notre population n°2 HER2+, l'atteinte ganglionnaire est un peu moins fréquente de 34.9% vs 40.8% dans la population n°1, le critère HER2 étant à lui même un critère indépendant de traitement adjuvant par Trastuzumab et donc à la chimiothérapie y compris pour des tumeurs T1a-T1b sans atteinte ganglionnaire. La majorité des tumeurs HER2 traitées par chimiothérapie adjuvante ne présente pas d'atteinte ganglionnaire (65.1%).

Sur le plan du traitement chirurgical, la chirurgie est conservatrice dans la majorité des cas avec 56.9% de patientes traitées par mastectomie partielle, 43.1% par chirurgie radicale. L'exploration sentinelle est fréquente, de 67%, mais cohérente avec l'évaluation ganglionnaire initiale (clinique-échographique) puisque 78% des patientes sont initialement considérées comme N0. Cependant, comme il s'agit majoritairement de tumeurs de plus de T1c-T2N0, il s'agit d'indication à une exploration des aires ganglionnaires.

Sur le plan anatomopathologique, nous avons observé un bon taux de concordance entre les données de la biopsie et celle de la pièce opératoire. Ainsi, nous observons une majorité de cancers infiltrant de type canalaire de 81.7%, avec peu de lobulaire de l'ordre de 1.8% et 16.5% de variants (35) (42). La très faible proportion de tumeurs de type lobulaire est attendue et logique, dans la mesure où très peu voire aucun carcinomes lobulaire est HER2+. Cette répartition correspond à la répartition habituelle des types anatomopathologiques rencontrés, avec peu être un peu plus de variants. Le reste des données est cohérent avec des tumeurs « agressives » qui représentent une indication de chimiothérapie (21) et qui surexpriment HER2 :

tumeur peu ou pas différencié (83.5%), grade SBR intermédiaire 2 (43.4%) ou élevé 3 (56.6%), avec un Ki67>15% dans 93.9% des cas, et un autre critère pronostique défavorable, indicatif également d'agressivité (22), de mauvais pronostic (29), les embols tumoraux, retrouvés dans 38.5% des cas de la population n°2. 99.1% des tumeurs surexpriment HER2. Seul 1 patiente est décrite comme HER2- (**patiente 717**). Nous observons dans cette population n°2, HER2+, moins de tumeurs hormonosensibles, RH+, de l'ordre de 58.1% contre 77.5% dans la population n°1. Ainsi, 41.9% contre 22.5% dans la population n°1 sont RH-. Cette distribution semble cohérente avec les séries de la littérature concernant la distribution des RH pour les tumeurs HER2+, ou les tumeurs HER2+ sont RH+ dans 50% et RH- dans 50% des cas(75) (74).

Sur le plan du traitement adjuvant, il n'y a pas eu de retard à l'initiation de la chimiothérapie adjuvante avec un délai médian normale à 2.1 mois (0-278). La médiane du nombre de cycles de traitement est bien de 24 cycles (3FEC100-3Docetaxel-18 Trastuzumab), avec cependant seulement 2/3 de cette population n°2 qui a reçu les 18 cycles de traitement. Les écarts au protocole sont dominés par une sous réalisation des cycles (36.7%), portant essentiellement sur la thérapie ciblée adjuvante par Trastuzumab (perdu de vue / et ou cardiotoxicité), et seulement dans 5 cas à un nombre de cycles de Docetaxel inférieure à 3, pour des raisons de toxicité notamment. Tous les cycles de FEC100 ont bien été réalisés.

**Les deux populations d'études présentent donc des caractéristiques relativement similaires entre elles et attendues pour des patientes recevant de la chimiothérapie adjuvante, éliminant des biais potentiels pour l'analyse et l'interprétation des résultats.**

## B. Données de survies des deux populations.

**Dans la partie adjuvante de l'étude GENEOM,** les taux de survie sans récurrence (PFS) et de survie globale (OS) à 5 ans sont respectivement :

\* Pour la population n°1, HER2 négative, traitée par chimiothérapie seule  
-81.8% (74.3-87.3) (41 évènements progression ou décès/309 patientes)  
- 87.3% (79.4-92.4) (20 décès/309 malades).

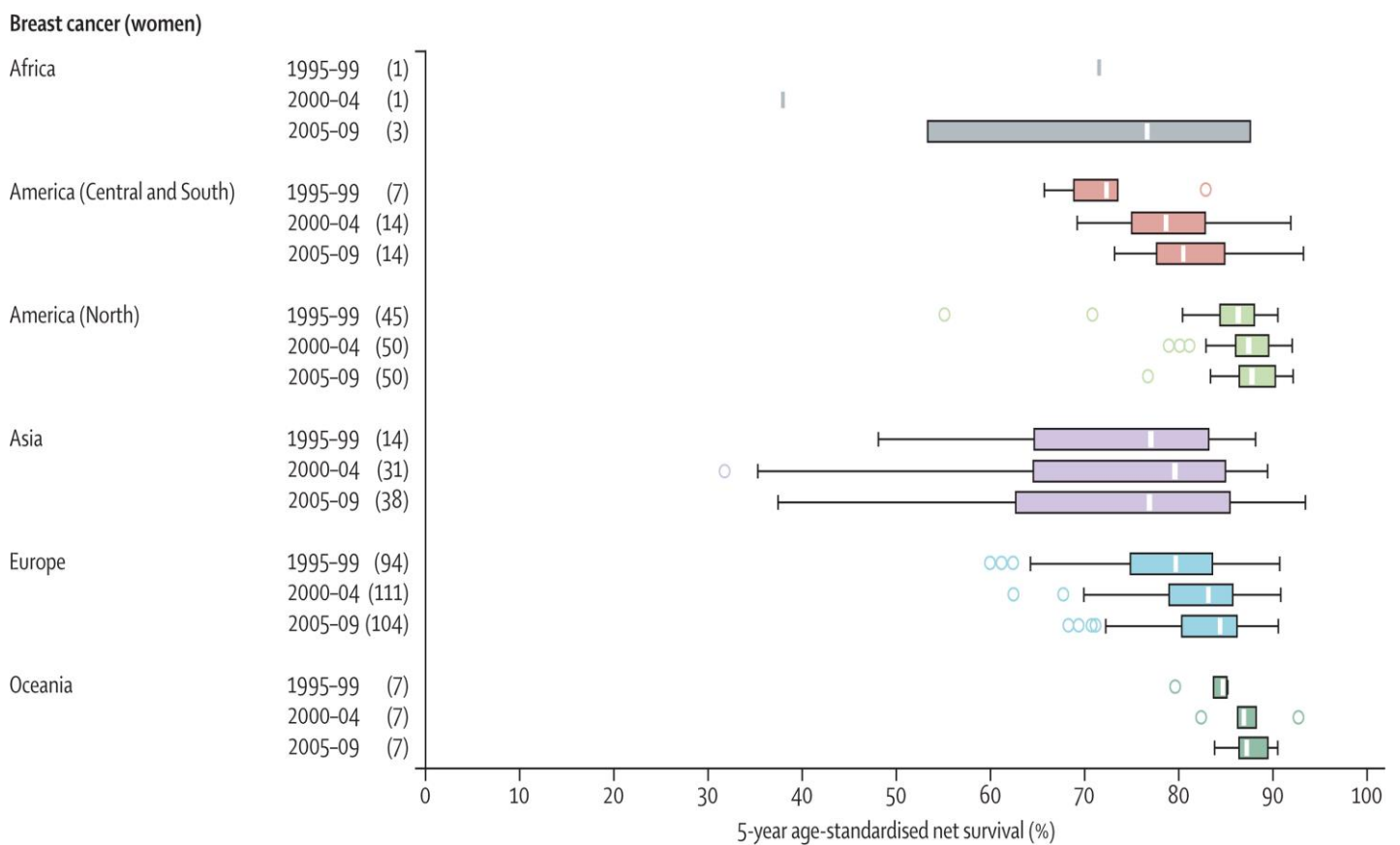
\* Pour la population 2, HER2 positive, traitée par chimiothérapie-Trastuzumab  
-90.1% (80.6-95.1) (10 évènements progression ou décès /109 patientes)  
-93.8% (83.7-97.7) (7 décès /109 patientes)

**Les données de survie sans progression et globale semblent donc plus favorables que dans la population traitée par Trastuzumab même si nous n'avons pas comparé directement les courbes de survie par un test statistique.**

**Déjà dans la partie néoadjuvante de l'étude,** nous avons comparé les survies des patientes HER2 positives traitées par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab (n=46) à celles HER2 négatives, traitées par FEC100-Docetaxel (n=118) uniquement. Nous avons fait le constat d'une meilleure PFS, pour les patientes traitées par chimiothérapie+Trastuzumab, avec un HR : 2.7 (IC95% 1.20-5.95) p= 0.012, sans différence en survie globale (p =0.24). De plus en comparant en fonction non pas en fonction du traitement par Trastuzumab, mais du statut HER2, nous avons une meilleure survie sans progression chez les patientes HER2 positives, avec un HR = 2.1 (IC 95% 1.01- 4.42) p=0.042, toujours sans traduction en survie globale (p = 0.38). Ainsi, le traitement par anti-HER2 chez les patientes HER2 positives, permet de « récupérer » le pronostic des tumeurs HER2 négatives, voire de le dépasser.

D'un point de vue plus général, ces données de survie sont très en accord avec les données de la littérature, notamment pour la survie globale.

**Pour la SURVIE GLOBALE à 5 ans (OS)**, les taux retrouvés de 87.3% en population n°1 et de 93.8% en population n°2 sont en accord notamment avec la dernière étude sur les données mondiales de surveillance de la survie après cancer, publiée dans Lancet Oncolgy par *Allemani et al.* Les données de cette analyse sont très fiables puisqu'elle regroupe les données individuelles de 25 676 887 patients de 67 pays sur 279 registres de population, portant sur différents types de cancers. Le taux de survie globale à 5 ans pour le cancer du sein est ainsi retrouvé au alentours de 85%, voire plus, approchant les 90% en Amérique du Nord (**Figure 61**) sur les données issues de 17 pays, pour des patientes traitées entre 2005-2009(218).



**Figure 61. Rang global standardisé à l'âge du taux de survie globale à 5 ans du cancer du sein sur 228 registres de données (218).**

Each box-plot shows the range of survival estimates among all those cancer registries for which suitable estimates could be obtained for patients diagnosed in a given calendar period in each continent. The number of registries included in each box-plot is shown in parentheses. Survival estimates considered less reliable are not included. The vertical line inside each box denotes the median survival value, and the box shows the IQR between the lower and upper quartiles. The extreme limits of the box-plot are 1.5 times the IQR below the lower quartile and above the upper quartile. Open circles indicate outlier values, outside this range.

En Europe, le taux de survie globale à 5 ans était **retrouvé à 83%**, ayant augmenté de 10% entre 1992 et 2008, notamment en Allemagne (219)

En France, selon les données de l'Institut National de Veille Sanitaire, en 2012, la survie globale des patientes diagnostiquées entre 1989 et 2004 était de :

- 97% à 1 an

**- 86% à 5 ans.**

- 76% à 10 ans.

Ces taux de survie globale, supérieure à 85%, sont donc équivalents aux taux des populations n°1 et n°2, avec respectivement de 87.3% et 93.8% de survie globale à 5 ans.

**Concernant LA SURVIE SANS PROGRESSION (PFS)**, on sait que celle ci varie fortement en fonction du type histologique, certains sous types ayant un mode de rechute plus ou moins précoce comme nous l'avions évoqué dans l'introduction de ce travail. Par exemple les tumeurs Luminal versus les triples négatives ou HER2 +. Ainsi, *Onitilo et al* ont analysé rétrospectivement la survie sans récurrence (PFS) et la survie globale (OS) de 1134 cas de cancer du sein en fonction notamment du statut hormonal et HER2 (**Figure 62**).

Subtype	Overall survival (95% CI)	Disease-free survival (95% CI)
Subtype		
ER/PR+,Her2+	88.7% (79.2-94.1)	83.2% (74.0-89.6)
ER/PR+,Her2-	90.3% (87.6-92.5)	86.8% (83.8-89.4)
ER/PR-,Her2+	78.8% (66.0-87.7)	66.0% (53.9-76.3)
ER/PR-,Her2-	79.0% (70.8-85.3)	73.5% (65.0-80.5)
ER/PR status		
ER/PR+	90.1% (87.5-92.2)	86.4% (83.6-88.8)
ER/PR-	79.0% (72.4-84.4)	70.8% (63.9-76.8)
Her2 status		
Positive	84.6% (77.3-89.9)	75.9% (68.6-81.9)
Negative	88.5% (85.9-90.6)	84.7% (81.9-87.2)
Overall	87.8% (85.4-89.9)	83.1% (80.5-85.5)

CI = confidence interval, ER = estrogen receptor, Her2 = human epidermal growth factor receptor 2, PR = progesterone receptor, + = positive, - = negative

**Figure 62. Survie sans progression et survie globale par sous types tumoraux, en fonction du statut HER2 et RE/RP(220).**



Dans cette étude, il est retrouvé en analyse globale, tous types confondus de cancer du sein, une survie sans progression à 5 ans de **83.1%** comparable donc à la PFS de la population n°1 (81.8%) et chez les HER2+ plus péjorative de 75.9% alors que dans notre série nous retrouvons une PFS clairement plus favorable de 90.1% mais aussi une survie globale bien supérieure (84.6% dans cette série rétrospective versus 93.8% dans notre étude. La principale explication à cette différence observée entre notre étude et les données de la littérature est probablement liée au manque de recul, avec seulement 10 évènements de type progression ou décès et une médiane suivi à 5 ans qui n'est pas atteinte puisque le suivi médian est de 4 ans (3.3-4.5) dans la population n°2.

Même si la PFS dans la population n°1 (81.8%) semble plus proche des données de la littérature, la même critique peut être faite sur une « surestimation » probable actuelle en raison d'une médiane de suivie à 3.4 ans (3.3-3.5).

Ainsi, avec des taux de survie conformes aux données de la littérature, notamment pour la survie globale, mais avec une survie sans progression probablement « surestimée » par manque de recul, avec insuffisance d'évènements, notamment dans la population n°2, nous pouvons conclure que l'analyse des SNP avec la survie est possible, même si un recul plus important permettra d'actualiser les taux de survie et de confirmer les SNP retrouvés associés aux données de survie et de mettre à jour d'éventuels nouveaux variants.

### **C. Facteurs associés à la survie : PFS et MFS.**

Nous avons recherché les facteurs cliniques et anatomopathologiques habituellement corrélés à la survie (PFS/MFS), pour les deux populations de l'étude : l'âge, les RH, la taille, l'atteinte ganglionnaire, les embols vasculaires, le grade, le Ki67, le type histologique, le caractère triple négatif. L'objectif était de les intégrer en analyse multivariée afin de déterminer la valeur de poids de chacun des paramètres et notamment des SNP au sein du modèle.

**Comme nous l'avons déjà évoqué, les patientes incluses ne sont pas représentatives de la population générale des patientes atteintes de cancer du**

sein, car toutes reçoivent de la chimiothérapie, et sont donc par définition des patientes à haut risque de rechute. Cela implique qu'il est difficile de mettre en évidence des facteurs pronostiques dans cette population.

### 1. Population n°1.

#### \* Pour la PFS.

Dans l'analyse des facteurs pronostiques, trois paramètres sont retrouvés statistiquement significativement associés à la PFS :

**-les récepteurs hormonaux avec un HR favorable pour l'expression des RH : HR : 0.49 (0.25-0.99) p=0.04.**

**-le statut triple négatif avec un HR en défaveur de ce facteur : HR : 2.1(1.05-4.21), p=0.03.**

**-Les embols tumoraux qui sont associés à un HR de rechute de 2.43 si présent (1.28-4.62), p=0.005.**

Le stade, par le T ou le N, le Ki67>15%, le grade, le type histologique, le statut RE, et l'âge ne sont pas associés à la PFS. Ceci n'apparaît pas illogique dans la mesure où la majorité des tumeurs de cette population d'étude possèdent des critères pronostiques défavorables, puisque toutes relevant de la chimiothérapie. Il s'agit d'une population sélectionnée et non globale de patientes atteintes de cancers du sein. Ainsi, les tumeurs sont dans 75% de stade T1-T2, avec 79.3% de tumeurs essentiellement canalaire, une majorité (93.5%) de grade 2-3 (seulement 20 tumeurs de grade I), 71.6% de tumeurs peu différenciées, un Ki67 >15% dans 86.5%. Peu de patientes sont aux âges extrêmes (5.2% <35 ans), reconnu comme facteur de mauvais pronostic, mais 75% d'entre elles ont plus de 45 ans.

En analyse multivariée avec le SNP associé à la PFS, CCND1-rs9344 [(AA-AG) vs GG], (SLCO1B3 non inclus en raison du très faible nombre d'événements et la rareté du génotype GG)), seul **les embols** restent associés à la PFS avec un HR : 2.84

(1.36-5.95)  $p=0.006$  ainsi que les **récepteurs hormonaux** avec un HR : 2.36 (1.04-5.37)  $p=0.04$ . Les embols tumoraux sont largement décrits dans la littérature comme un facteur de pronostic défavorable (22) (29) (56), notamment pour le risque de rechute locorégionale et sont surtout intégrés dans les paramètres décisionnels de radiothérapie adjuvante en cas de mastectomie totale, moins souvent pour la chimiothérapie adjuvante (21). De façon non surprenante, le statut RH reste un élément majeur du pronostic avec un risque de rechute multiplié par deux en l'absence de récepteurs hormonaux (41) (42) (59) (60) (61) (62).

✱ Pour la MFS.

En faisant la même analyse mais spécifiquement sur la MFS, ce qui restreint le nombre d'évènements mais permet de se focaliser uniquement sur les facteurs impactant sur le risque de rechute métastatique, **aucun paramètre ne ressort pronostique, notamment les embols, le statut RH, qui étaient associés à la PFS en analyse uni et multivariée.**

Ceci indique également que les embols impactent en effet sur le rechute, mais surtout sur la récurrence locorégionale, la PFS intégrant par définition la rechute locorégionale et à distance. De la même façon, le statut hormonal, n'est pas retrouvé associé spécifiquement à la survie sans récurrence métastatique dans cette analyse, alors qu'il l'était pour la PFS, ce qui apparaît plus « surprenant » que pour les embols. Ceci peut s'expliquer par le nombre d'évènements insuffisants avec le recul actuel de l'étude, en restreignant uniquement à la rechute métastatique, avec moins d'évènements métastases (8 chez les 65 patientes RH-) versus toutes les rechutes (12 évènements rechutes chez les 65 patientes RH-). Ceci peut éventuellement expliquer que le seuil de différence statistiquement significatif ne soit pas atteint.

L'analyse multivariée n'a pas pu combiner ces facteurs aux 5 SNP retrouvés associés à la MFS, aboutissant à un modèle pronostique uniquement sur les variants de nucléotides et non mixte avec les paramètres clinicopathologiques.

## 2. Population n°2.

### \* Pour la PFS uniquement

En effet, vu le faible nombre d'événements métastatiques dans la population traitée par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab (8 événements), une analyse de l'association des facteurs clinicopathologiques avec la MFS a été effectuée mais comme nous avons choisi de ne pas faire d'analyse du lien entre MFS et SNP dans la population n°2, nous ne discuterons pas de ces résultats.

L'interprétation de l'analyse pour la PFS reste elle aussi néanmoins sous caution car les évènements restent très faible (10). Il faut être très prudent sur la valeur à donner à ces résultats, d'autant plus que nous ne retrouvons pas les mêmes résultats que pour la population n°1, avec un HR inverse, notamment pour les récepteurs hormonaux, et les récepteurs aux œstrogènes, lié au faible nombre d'évènements : (2) pour les 46 tumeurs HER2+RE- versus les 8 évènements pour les 59 tumeurs HER2, RE+. Un recul plus important permettra un nombre suffisant d'évènements pour une analyse statistique correcte et une interprétation valable.

De cette analyse, 5 paramètres sont retrouvés significativement associés à la PFS dont un commun et allant dans le même sens que la population n°1 (les embols tumoraux) et 2 qui n'étaient pas retrouvés dans la population HER2 négatives : l'âge et la taille tumorale :

**-L'âge qui est ici dans cette cohorte HER2 positive, pronostique avec une tendance à davantage de rechute en cas d'âge jeune avec un HR favorable pour les patientes entre 45-54 ans et ≥ 55 ans versus les patientes jeunes <35 ans : HR respectifs 0.18 (0.02 -1.49), HR 0.19 (0.04 -0.91) et une p value à 0.03.**

**-les récepteurs hormonaux positifs avec un HR défavorable pour l'expression des RH : HR : 4.09 (0.86 -19.57) p=0.06**

-les récepteurs aux oestrogènes positifs avec un HR défavorable pour l'expression des RE : HR : 4.24 (0.89 -20.20) p=0.05

-Les embols tumoraux qui si présents sont associés à un HR de rechute de 5.30 (1.11-25.33) p=0.02

-La taille tumorale avec en cas de tumeur égale ou dépassant les 2 cm (T2+), un HR défavorable avec risque de rechute multiplié par 7.46 (1.58 – 35.26)

L'âge<35 ans est un facteur pronostic souvent décrit dans la littérature et intégré mais pas retenu encore de façon formelle comme un critère de chimiothérapie adjuvante (21). En effet, certaines études rétrospectives tendent à montrer que les femmes jeunes diagnostiquées avant 35 ans ont une moins bonne survie sans récurrence et une survie spécifique liée aux cancers du sein. Deux larges études (*Nixon et al, Albain et al*) ont démontré un plus mauvais pronostic pour les patientes de moins de 35 ans, après ajustement sur les autres variables pronostiques.

Les embols sont dans notre série un facteur pronostique fort, retrouvé associé à la PFS dans les deux populations, donc quelque soit le statut HER2 (22) (29) (56) (21), en univariée pour les deux populations et multivariée uniquement pour la population n°1.

La taille tumorale est ici bien retrouvée pronostique avec en cas de tumeur T2 ou plus, un risque de rechute multiplié par 7.46. L'impact pronostique du T n'est plus à démontrer, il s'agit d'un du premier critère utilisé pour les indications de chimiothérapie adjuvante (30) (31) (32). D'ailleurs, en analyse multivariée combinée avec les 4 SNP associés à la PFS dans la population n°2, il reste pronostique avec un risque de rechute multiplié par 10.78 (2.12-54.90) p=0.004 confirmant le rôle déterminant et connu de la taille de la tumeur sur le pronostic. Nous n'avons pas retrouvé cette association pour la taille dans la population n°1, avec la PFS ou la MFS, ceci pouvant trouver une explication dans un léger déséquilibre de taille des tumeurs entre les deux populations avec davantage de tumeurs de plus petite taille :

T1 : 38.8% dans la population n° 2 vs 42.2% dans la population n°1  
T2 : 27.5% dans la population n° 2 vs 33.3% dans la population n°1

Ceci étant lié au fait que le statut HER2 est un critère indicatif de chimiothérapie adjuvante pour des tailles tumorales plus limitées.

## **II. Polymorphismes de nucléotides (SNP) associés à la survie.**

### **A. Population n°1 traitée par FEC100-Docetaxel.**

#### **1. Sur la PFS.**

Seulement deux SNP sur les 46 qui ont pu être analysés sur la population n°1 traitée par FEC100-Docetaxel sont associés à la survie sans récurrence, toutes récurrences confondues.

**La comparaison des résultats obtenus de l'effet des génotypes des SNP sur la PFS aux résultats antérieurs sur la partie néoadjuvante de l'étude et avec les données de la littérature est résumée dans le tableau 37.**

#### **SLCO1B3-rs11045585.**

En effet, pour le variant **SLCO1B3-rs11045585**, il a été constaté une différence statistiquement significative entre les 3 génotypes possibles AA vs AG vs GG ( $p=0.01$ ) et en cas de génotype GG versus AA-AG, le HR de rechute est multiplié d'un facteur 6.44 (1.54-26.94) avec une  $p$  value à 0.003.

D'un point de vue **biologique**, SLCO1B3 ou encore (=OATP1B3 ou OATP8) est le transporteur d'influx cellulaire le plus important pour le Docetaxel et le Paclitaxel. Il est exprimé sur la membrane basolatérale des hépatocytes. Il est considéré comme étant une des protéines de membrane essentielles dans le métabolisme du Docetaxel, en coopération avec d'autre transporteur, ABCC2. Dans la littérature, les études concernant ce transporteur de membrane sont parfois discordantes avec des études sur des populations différentes (asiatique versus caucasienne) et sur des SNP différents de ce transporteur, à des locus différents du gène.

**Dans notre étude GENEOM adjuvant**, le variant GG est associé à un HR de rechute multiplié par 6.44 en cas de génotype GG versus (AA-AG)  $p=0.003$  et représente ainsi un génotype « défavorable ».

**Dans la littérature**, *Kiyotani et al* ont retrouvé ce variant spécifique **rs11045585** de SLCO1B3 (sur 4 variants de SLCO1B3 étudiés spécifiquement avec des SNP d'autres gènes), associé à une surtoxicité hématologique granulocytaire du Docetaxel dans une population japonaise de patients (203). En effet, *Kiyotani et al* ont recherché dans cette étude des variants génétiques associés au risque de leuconeutropénie induit par le Docetaxel chez des patients recevant spécifiquement cette drogue pour différents types de cancers (poumon, sein, œsophage et autres cancers). La comparaison a été effectuée sous la forme d'une étude cas-contrôle : génotypage de tous les patients recevant du Docetaxel et comparaison des génotypes entre les individus présentant une toxicité hématologique de grade III-IV versus pas de toxicité hématologique. Ainsi, cette étude d'association cas-contrôle portant sur 84 malades, a testé 79 SNP portant sur 7 gènes impliqués dans le métabolisme et le transport du Docetaxel (CYP3A4-CYP3A5-ABCB1-ABCC2-SLCO1B3-NR1I2-NR1I3). Sur l'ensemble des SNP étudiés, deux SNP sont retrouvés associés à la toxicité hématologique : ABCC2 rs 12762549, mais surtout **SLCO1B3, retrouvé associé à une augmentation du risque de toxicité de grade III-IV avec un HR : 5.44 (IC 95% 2.22-13.34 p ajusté =0.013)**. Le génotype défavorable était représenté par l'allèle G à l'état hétérozygote ou homozygote (AA vs AG-GG). L'explication de surcroît de toxicité hématologique en cas de variant AG ou GG s'explique par le fait que en cas d'atteinte de ce transporteur SLCO1B3, le Docetaxel est ainsi moins « transporté » du sang vers les hépatocytes. Une altération qualitative ou quantitative de l'activité de ce transporteur par des SNP entraîne ainsi une augmentation de l'aire sous la courbe du Docetaxel (AUC) par diminution de l'élimination hépatique et donc plus de toxicité. Dans une autre étude américaine de pharmacogénétique sur l'analyse de l'élimination du Docetaxel, *Baker et al* ne retrouve aucune association entre plusieurs variants de SLCO1B3 et la clairance du

Docetaxel (204). Cependant, ce variant spécifique **rs11045585 de SLOC1B3 ne faisait pas partie de la liste des SNP de SLCO1B3 étudiés.**

Enfin, dans l'étude de *Chew et al* portant sur 54 patients asiatiques atteints de carcinome nasopharyngés, et traités par Docetaxel, plusieurs SNP « classiques » du métabolisme de ce cytotoxique ont été étudiés, dont SLCO1B3 (CYP3A4, ABCB1, ABCC2, ABCG2, **SLCO1B3**) (212). Ce même SNP SLCO1B3-**rs11045585**, est retrouvé associé à une surexposition sanguine au Docetaxel chez les patients homozygotes GG **rs11045585 (A>G)**, avec une AUC du Docetaxel significativement plus élevée ( $p=0.026$ ) et une plus faible clairance ( $p=0.036$ ) que les patients (AA-AG), pouvant expliquer la surtoxicité observée dans l'étude de *Kiyotani et al*(203).

Ainsi, deux études ont retrouvé le SNP **rs11045585** de SLCO1B3 associé à une surexposition sanguine du Docetaxel sur le plan pharmacocinétique et dynamique (212) concordant avec une surtoxicité d'un point de vue biologique hématologique (203) mais pour les deux études sur des populations asiatiques et non caucasiennes, et sans données en terme de conséquence sur l'efficacité du traitement. Concernant les données de l'effet du variant GG de ce SNP en terme d'efficacité de la chimiothérapie par Docetaxel, nous pouvons nous rapporter aux résultats obtenus dans la population néoadjuvante.

**En effet, dans la 1<sup>ère</sup> partie de l'étude GENEOM néoadjuvant,** nous avons constaté un lien entre la réponse histologique complète (pCR) et ce SNP dans la population traitée par FEC 100-Docetaxel. L'interprétation était sous réserve, comme en adjuvant, puisque de la même façon seul 1.8% ( $n=2$ ) de patientes avaient ce génotype GG très rare, et avec très peu d'évènements (par rapport au reste de la population : 1 pCR sur les 25 obtenues dans la population). Il était observé une tendance (pas de  $p$  value possible vue la taille de l'effectif GG notamment) à davantage de pCR dans le groupe de patientes de génotype GG versus AG ou AA avec 50.0% de pCR versus 34.4 et 16.5% respectivement. Ceci apparaît cohérent avec les 2 études asiatiques de pharmacocinétique et de toxicité hématologique qui retrouvent davantage d'exposition à la drogue en cas d'allèle G à l'état homozygote ou hétérozygote. Ainsi, une surexposition induite par un transporteur SLCO1B3 « défaillant » entraînerait une réponse tumorale plus importante avec une régression plus marquée en terme de critère de Sataloff.



**Une 3<sup>ème</sup> étude, toujours asiatique,** coréenne, et plus récente, publiée en 2014 dans *Cancer Research Treatment* par *Choi et al*, ne retrouve pas l'association de ce SNP de *SLCO1B3* **rs11045585** avec ce surcroît de toxicité hématologique observée dans l'étude de *Kiyotani et al* (221). En revanche, elle retrouve une association du variant GG avec une contribution à une surtoxicité globale (pas hématologique) du Docetaxel. Dans cette étude, 92 patients atteints de cancers de tous types (poumon 59.8%, estomac 19.6%, ORL 14.1%, œsophage 4.3% et autres 2.2%) de stade avancé III-IV et traités par une chimiothérapie à base de Docetaxel seul ou combiné ont été genotypés pour 10 SNP de 5 gènes intervenant dans le métabolisme du Docetaxel (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *SLCO1B3*, *ABCC2*).

En effet, *SLCO1B3*-**rs11045585 A>G**, et notamment le génotype **GG** est retrouvé en analyse multivariée avec d'autres paramètres (dose de chimiothérapie, stade de la maladie, protocoles de chimiothérapie, et un SNP du gène *ABCB1*) significativement associé à une surtoxicité, avec un OR : 9.44 et une p value à 0.022 (**tableau 35**).

Factor	OR	95% CI	p-value <sup>a)</sup>
Gender	4.09	0.71-23.78	0.116
Tumor stage	2.04	0.39-10.54	0.394
Chemotherapy regimens <sup>b)</sup>	0.38	0.17-0.83	0.016
<i>ABCB1</i> 2677G>T/A	4.54	0.98-21.13	0.054
<i>SLCO1B3</i> rs11045585	9.44	1.39-64.01	0.022

OR, odds ratio; CI, confidence interval. <sup>a)</sup>Logistic regression analysis, <sup>b)</sup>Docetaxel single vs. combination.

**Tableau 35. Analyse multivariée estimant les contributions relatives des facteurs cliniques et génétiques à la toxicité induite par le Docetaxel sur une population de 92 patients traités par Docetaxel pour différents types de cancers, dans l'étude de *Choi et al* (221).**

L'élément important de cette étude est qu'elle nous donne des informations sur l'effet de ce variant sur la réponse au traitement. Ainsi, dans la population totale, tous cancers confondus, il est retrouvé un effet plutôt « favorable » du génotype «sauvage » AA sur la réponse au traitement vs la présence d'un allèle variant à l'état homozygote AG ou homozygote GG. En effet, il est observé une tendance à

davantage de réponses (complètes et partielles) avec 48.8% de réponse en cas de génotype AA versus 23.1% en cas de génotype AG-GG, mais p value non significative avec  $p=0.075$  (**Tableau 36**). En revanche, dans le sous groupe de patients atteints de cancer du poumon, il est retrouvé un lien cette fois ci significatif entre la réponse au traitement par Docetaxel et le variant SLCO1B3 rs-11055585. En

SNP	Genotype	CR+PR (%)	SD (%)	PD (%)	p-value
CYP3A4*1B	AA	23	19	12	-
CYP3A4*18A	TT	22	19	12	0.259
	TC	1			
CYP3A4*3	TT	23	19	12	-
CYP3A5*2	CC	23	19	12	-
CYP3A5*3	GG	12 (41.4)	9 (31.0)	8 (27.6)	0.625
	GA+AA	11 (44.0)	10 (40.0)	4 (16.0)	
ABCB1 1236C>T	CC	3 (37.5)	5 (62.5)	-	0.668
	CT+TT	20 (43.5)	14 (30.4)	12 (26.1)	
ABCB1 2677G>T/A	GG	11 (68.7)	3 (18.8)	2 (12.5)	0.020
	GT+TT+GA+AA+TA	12 (31.6)	16 (42.1)	10 (26.3)	
ABCB1 3435C>T	CC	13 (52.0)	9 (36.0)	3 (12.0)	0.300
	CT+TT	10 (34.5)	10 (34.5)	9 (31.0)	
ABCC2 rs12762549	CC	2 (100)	-	-	0.107
	CG+GG	21 (40.4)	19 (36.5)	12 (23.1)	
SLCO1B rs11045585	AA	20 (48.8)	16 (39.0)	5 (12.2)	0.075
	AG+GG	3 (23.1)	3 (23.1)	7 (53.8)	

CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease.

cas de génotype « sauvage » AA vs la présence d'un seul allèle « variant » donc AG-GG, le HR de réponse au traitement est de 9.44. Ainsi, cette étude retrouve contrairement au néoadjuvant un effet délétère du variant AG-GG sur la réponse au traitement, avec davantage de toxicité et une moindre efficacité.

**Tableau 36.** Association entre la réponse au traitement par Docetaxel et les SNP dans la population des 92 patients de l'étude de *Choi et al* (221).

Dans notre étude qui concerne la partie GENEOM adjuvant, il est a noté cette **même relation** à savoir que ce génotype variant GG est plutôt corrélé à un moindre effet du traitement adjuvant avec davantage de récurrence précoces pour HR de rechute à 6.44 (1.54-26.94)  $p=0.003$  en cas de génotype GG vs AG-AA. Une augmentation de l'exposition sanguine du Docetaxel devrait s'associer à davantage de réponse à la chimiothérapie, tendance observée dans la partie néoadjuvante mais effet inverse obtenue dans la population adjuvante et dans l'étude de *Choi et al*, notamment dans le sous groupe de cancers du poumon. L'explication peut venir de la toxicité induite par la surexposition au Docetaxel, qui entraîne des retard de cycles

de chimiothérapies pour toxicité hématologique, cutanée, avec ainsi une réduction de dose intensité relative (RDI), voire des arrêts de chimiothérapies et finalement une moindre efficacité des chimiothérapies cytotoxiques adjuvantes.

Dans notre étude, les données de toxicité n'étaient pas intégrées au recueil de données. **Nous avons donc observé les données de toxicité dans les dossiers des patients de génotype GG** (n=4 patientes), notamment pour les 2 patientes avec ce génotype ayant rechutées (dose de chimiothérapie, report de cures). L'objectif était de regarder de manière exploratoire si ce génotype GG avait bien eu pour conséquence un surcroît de toxicité (grade III-IV) ayant entraîné, soit des reports de cures, soit une réduction des doses et donc au final une modification de la dose intensité relative, pouvant impacter sur l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante.

**Ainsi, sur les deux patientes avec le génotype GG et ayant rechutées, la patiente n°419 à justifié une réduction de dose du Docetaxel à 75% pour une toxicité cutanée de grade III. La patiente n° 774 n'a pas bénéficié d'une réduction de dose du Docetaxel même s'il est signalé un syndrome mains pied de grade II. Ainsi, ces données « observatoires » suggèrent une potentielle surtoxicité induite par ce variant, au moins cutanée, pouvant impacter sur la dose du protocole de chimiothérapie adjuvante. La toxicité n'est donc pas une explication à éliminer à cet effet délétère du génotype GG sur le risque de rechute après chimiothérapie adjuvante.**

Cependant, comme pour GENEOM-Néoadjuvant, l'interprétation de ce SNP rs11045585 de SLCO1B3 est délicate compte tenu du faible nombre d'événement (2) survenant dans un groupe à génotype défavorable relativement peu fréquent dans notre population d'étude (4 patientes de génotype GG soit 1.3%) versus 74 patientes de génotype AG (24.6%) et la majorité 223 soit (71.1%) double homozygote AA.

**Ce SNP n'a donc pas pu être inclus dans l'analyse multivariée finale et son impact reste donc limité dans le cadre de cette étude.**

#### **SNP CCDN1 rs9344.**

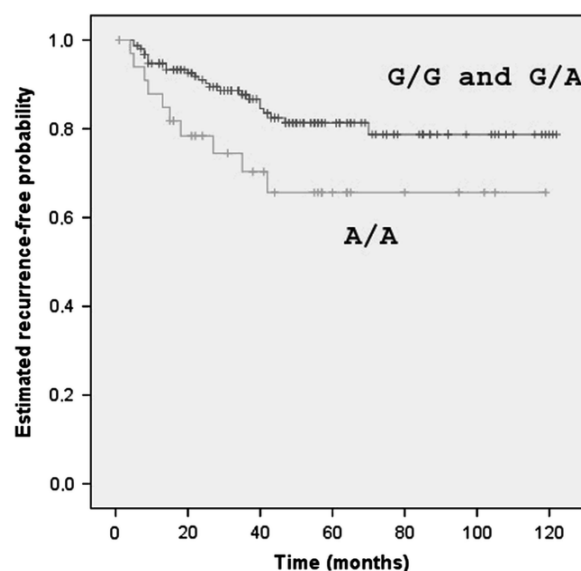
**Dans notre étude GENEOM Adjuvant,** il a été constaté une différence statistiquement significative en cas de **génotype GG versus AA-AG**, le HR de

rechute est multiplié d'un facteur 2.13 (1.12-4.06) avec une *p value* à 0.02 en cas de génotype double homozygote GG. Concernant la distribution des génotypes dans la population n°1, le génotype « double variant GG » concerne 81 patientes soit 26.9% de la population tandis que le génotype majoritaire est le génotype hétérozygote AG avec 155 patientes concernées (51.5%) et 21.6% soit 65 patientes de génotype double homozygote AA. Dans l'étude de *Absenger et al*, dans la cohorte d'évaluation, la répartition des génotypes étaient 30% GG, 50.4% AG et 19.6% AA. Les mêmes chiffres sont retrouvés dans la cohorte de validation : 29.8% GG, 43.5% de AG et 26.2% de AA (222). La répartition des génotypes de l'étude GENEOM est comparable à celle de l'étude princeps de *Absenger et al*.

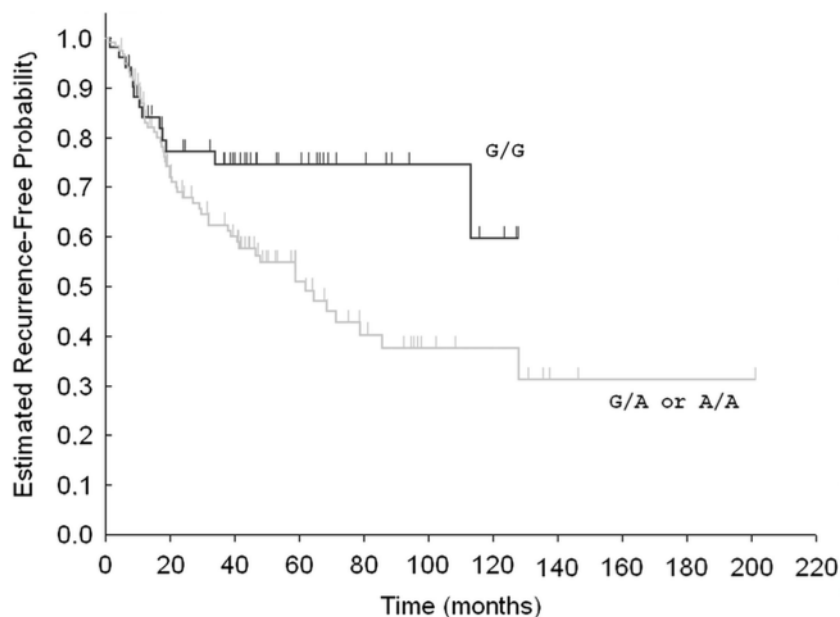
**D'un point de vue biologique**, CCDN1 ou la cycline D1 est bien connue puisque elle fait partie avec son partenaire catalytique la cycline dépendent Kinases ou CDK4-CDK6 d'un des membres de la famille des cycline dépendent kinases (CDKs), régulateurs clefs du cycle cellulaire pour la progression de la phase G à S. Pour rappel, les CDKs sont des complexes hétérodimériques formés d'une sous unité catalytique, la kinase et d'une sous unité régulatrice, la cycline. Le partenaire des cycline D (D1, D2 et D3) sont les kinases CDK4/CDK6. Le complexe actif phosphoryle et inactive la protéine suppresseur de tumeur Rb, permettant la transcription de protéines nécessaires pour la progression en phase S. Ainsi, il est démontré que l'hyperexpression de la cycline D1 perturbe le cycle cellulaire normal, avec un passage précoce en phase G1-S et donc aboutit à une prolifération cellulaire majorée. De nombreuses publications ont indiqué la valeur potentiellement pronostique et prédictive de polymorphismes (SNP) à l'échelle germinale, concernant spécifiquement ces gènes régulateurs du cycle cellulaire (223). Ainsi, un SNP commun et fonctionnel de la cycline D1, **CCDN1 rs9344 G>A** [G870A] sur le codon 242, affecte l'épissage du transcrite de CCDN1 et cause une prolifération cellulaire anormale. L'allèle dit « sauvage » est l'allèle G et code pour le transcrite-a et l'allèle « variant » l'allèle A pour le transcrite-b. La différence entre les deux transcrits se situe au niveau du domaine C-terminal, responsable d'une dégradation intracellulaire rapide. En cas de variant b, la demie vie du transcrite de CCDN1 est prolongée et donc le niveau protéique de CCDN1 augmenté, se traduisant par une prolifération cellulaire accrue (224).

**Dans la littérature**, ce variant a été étudié non pas dans le cancer du sein mais chez des patients atteints de cancer colique de stade II ou III et traités par chimiothérapie adjuvante par 5FU, dans deux cohortes, une d'évaluation (n=264, population Autrichienne) et l'autre de validation (n=234, population américaine). *Absenger et al* ont ainsi retrouvé pour la 1<sup>ère</sup> cohorte de validation un effet délétère du génotype AA uniquement dans la population traitée par chimiothérapie adjuvante à base de 5FU et pas chez les patients traités par chirurgie seule. Ceci éliminant un rôle pronostique de ce SNP et évoquant plutôt un rôle prédictif de réponse à la chimiothérapie adjuvante par 5FU. Ainsi, en cas de génotype double homozygote **AA versus le génotype AG ou GG (MODELE RECESSIF)** le pronostic est défavorable avec un temps jusque à la récurrence plus court en uni et multivarié : **HR : 2.47 IC 1.16-5.29, p= 0.019, (Figure 63.)** (222).

La même observation a été confirmée dans la cohorte de validation avec l'allèle A CCDN1-rs9344 G>A restant significativement associé à un TTR plus court en uni et multivarié : **HR :1.94 IC95%1.05-3.58 p=0.035)**, mais sur un **MODELE DOMINANT (figure 64.)** et non récessif comme dans la cohorte d'évaluation (**AG-AA délétère versus GG** et non AG-GG versus AA **(Figure 63)**).



**Figure 63.** Temps jusqu' à la récidence (TTR) en fonction du génotype du SNP de la cycline D1-rs 9344G>A (Modèle récessif) dans la population d'évaluation de patients atteints de cancer colique de stade II ou III et traité par chimiothérapie adjuvante par 5FU. **Effet délétère du génotype AA** (222).



**Figure 64.** TTR en fonction du génotype du SNP de la cycline D1 rs-9344G>A (Modèle dominant) dans la population de validation de patients atteints de cancer colique de stade II ou III et traité par chimiothérapie adjuvante par 5FU. **Effet délétère du génotype AG ou AA (222).**

Ainsi, le changement d'un allèle G pour un allèle A pour ce gène de la cycline D1 sur le codon 242 en position 870 aboutit à une hyperactivation de la cycline D1, se traduisant chez les patients traités par 5FU en adjuvant par une moins bonne survie sans rechute.

Dans notre étude **GENEOM ADJUVANT**, nous avons tout d'abord retrouvé globalement la même répartition des génotypes que celle de la population de *Absenger et al.* D'autre part, chez nos patientes recevant également du 5FU en adjuvant dans le cadre du protocole FEC 100, nous n'avons pas retrouvé cet effet délétère de l'allèle A soit un génotype AA plus délétère que les AG-GG (**Modèle récessif d'*Absenger et al*, cohorte d'évaluation**), puisqu'aucune différence statistiquement significative n' a été retrouvée dans ce modèle de comparaison : AA vs AG-GG HR :0.70(0.29-1.68) p=0.42. En revanche, nous avons retrouvé que l'absence de l'allèle A soit le génotype GG versus AA-AG (**Modèle dominant d'*Absenger et al***) était associé de façon statistiquement significative à une survie sans rechute toutes rechutes confondues (PFS) plus précoce (HR : 2.13 (1.12-4.06) p=0.02) et donc que le génotype « sauvage » GG était plus « délétère »

contrairement à l'effet « protecteur » de GG dans le modèle dominant de *Absenger et al.* Cependant, l'étude d'*Absenger et al* présente de nombreuses limites : son caractère rétrospectif, le problème des modèles différents de l'effet de l'allèle A sur le pronostic (récessif dans l'évaluation et dominant dans la validation) en rapport avec un biais de sélection de population, le fait qu'elle porte sur des patients atteints de cancers du colon et non de cancer du sein, ainsi que le fait qu'elle porte sur l'effet d'une drogue majeure dans le cancer du colon en adjuvant (le 5FU), cytotoxique quant à lui beaucoup moins important dans le cadre du cancer du sein (anthracyclines et taxanes +++)

Néanmoins, dans la littérature, d'autres études ont également démontré un effet « délétère » de l'allèle A ou du génotype double homozygote AA chez des patients traités par chimiothérapie et non comme dans notre étude le modèle « double « homozygote GG délétère ». Dans une étude suisse portant sur 244 patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) avancés traités par chimiothérapie à base de sels de platine, *Gautschi et al* ont retrouvé que les patients porteurs de l'allèle A présentaient une moindre réponse à la chimiothérapie (stabilité + réponse tumorale) : AG-AA GG versus (p=0.04) (225).

Dans une autre étude, toujours dans le cadre du cancer du colon (étude BOND-2), mais cette fois ci métastatique, et non en adjuvant, recevant des cytotoxiques et des biothérapies (cetuximab + bevacizumab vs irinotecan + cetuximab + bevacizumab), après progression sous chimiothérapie à base d'irinotecan), les patients doubles homozygote AA dans le bras avec la chimiothérapie par irinotecan (n=31) avait un temps jusqu'à la récurrence (TTR) plus court (6.8 vs 8.4 mois, p=0.001) (226). Toujours dans le cancer colique métastatique et par le même auteur, une étude sur une 3<sup>ème</sup> ligne de traitement par cetuximab seul sur n=39 patients atteints de cancers colorectaux avancés a retrouvé le même effet délétère, cette fois ci, sur la survie globale du génotype AA versus le génotype AG-GG (médiane de survie globale de 2.3mois vs 8.7 mois, p=0.019) (227).

En plus de la discordance avec les données actuelles de la littérature, il est difficile de donner **une explication notamment biologique** à ces résultats discordants entre un génotype GG plutôt « protecteur » dans notre étude et un allèle A ou génotype AA

plutôt « délétère » dans la littérature. En effet, *Li et al* ont ainsi étudié les isoformes de CCDN1 induits en réponse au dommage de l'ADN provoqués par de la doxorubicine ou des radiations sur des lignées cellulaires de cancers du rein, du colon rectum ou du sein (228). Celui-ci a démontré que le transcrit-a codé par l'allèle normal G induisait davantage d'arrêt du cycle cellulaire et de cassures doubles brins que le transcrit-b codé par l'allèle variant A. Ainsi, à partir de ce modèle biologique, nous pouvons bien confirmer que l'allèle G est plutôt protecteur et l'allèle A plutôt délétère.

D'autre part, cette association pour ce SNP avec le génotype GG délétère sur la PFS ne persiste d'ailleurs plus dans le modèle multivariée. De plus, dans la partie néoadjuvante de l'étude aucune association entre la pCR et ce SNP n'avait été mise en évidence.

L'ensemble de cette analyse donne peu d'impact de ce SNP de la cycline D1 sur la PFS dans la population n°1.

**Ainsi, en prenant tous types de récurrences de la maladie possibles (récurrence locale, métastatique et locorégionale), aucun des 46 SNP ne peut actuellement prédire un risque de rechute plus précoce chez les patientes recevant une chimiothérapie adjuvante par FEC100-Docetaxel.**

**Le but et l'effet de la chimiothérapie adjuvante étant de limiter le risque de rechute à distance, il nous est apparu intéressant de se focaliser uniquement et spécifiquement sur la survie sans récurrence métastatique (MFS) et les éventuels SNP associés.**



SNP	Rôle physiologique	CT	SNP rs	Allèle sauvage	Allèle variant	Conséquence fonctionnelle biologique	GENEOM Adjuvant HR de rechute	GENEOM Néoadjuvant OR de pCR	Données de la littérature			
PFS												
SLCO1B3	Transporteur d'influx du Docetaxel :Entrée du TXT dans la cellule	TAXOTERE	rs11045585 -567A>G	A	G	Diminution de l'entrée du TXT dans l'hépatocyte  Plus de forme libre non détoxifiée	<b>GG vs AA-AG :</b> 6.44(1.54-26.94) p=0.003  → <b>Génotype GG délétère</b>  <b>SURTOXICITÉ ?</b>	<b>AG-GG vs AA</b> 2.77(1.10-6.7) p=0.031  → <b>Génotype AG-GG favorable</b>  → <b>au moins un allèle G favorable avec davantage de pCR</b>	Japonaise, n=84 <i>Kiyotani et al, 2008(203)</i>  <b>TOXICITÉ</b>  <u>Tous type de cancers :</u>  -Poumon (28.3%) -Sein (33.6%) -Œsophage (9.7%) -Autres (28.3%)  <u>Chimiothérapie par Docetaxel.</u>  <b>AG-GG vs AA</b> HR : 5.44(IC 95% 2.22-13.34, p=0.013).  <b>Au moins un allèle G :</b>  <b>-plus de toxicité hématologique G3-G4</b>  <b>-par augmentation de l'AUC</b>	Asiatique, n=54, Singapour <i>Chew et al, 2011(212)</i> <b>PHARMACOCINETIQUE</b>  -Carcinomes nasopharyngés  -Traitement par Docetaxel.  <b>GG vs AG ou AA</b>  <b>AUC du Docetaxel plus élevée</b> (p=0.026)  <b>Clairance plus faible du Docetaxel</b> (p=0.036)	Coréenne N=92 <i>Choi et al, 2014,(218)</i> <b>TOXICITÉ</b> <u>Tous types de cancers</u> Poumon: 59.8% Estomac: 19.6% ORL: 14.1% Œsophage: 4.3% Autres: 2.2% <u>Chimiothérapie par Docetaxel.</u> Toxicité <b>GG vs AG-AA.</b> HR :9.44 (1.39-64.01) p=0.022 <b>Génotype GG plus de toxicité</b> <b>REPONSE</b> 48.8% AA vs 23.1% GG-AG p=0.075 Poumon : OR: 9.44 si AA  <b>Génotype AA favorable plus de réponse</b>	

CCDN1 Cycline D1	cycline dependent kinases (CDKs), cycle cellulaire	<b>5FU</b>	rs9344 Pro241Pr G>A [G870A]	G	A	-Transcrit demi vie allongée  -Hyper expression de la cycline D1  -Prolifération cellulaire	<b>GG vs (AA-AG)</b> 2.13 (1.12-4.06) <b>p=0.02</b>  <b>→Génotype GG délétère</b>	Non retrouvé	<p>Etude Autrichienne, <i>Absenger et al, (n=264/234) 2014 (221)</i> Cancer COLON stade II-III Chimio adjuvante 5FU Cohorte évaluation (n=264) :Modèle récessif AA vs <u>AG- GG</u> <b>TTP plus court : génotype AA défavorable</b> HR : 2.47 IC 1.16-5.29, p= 0.019.</p> <p>Cohorte de validation (n=234) :Modèle dominant AA-AG vs GG <b>TTP plus court : génotype AA-AG défavorable</b> HR : 1.94 IC 95%1.05-3.58 p=0.035</p> <p>Etude Américaine <i>Zhang et al, (n= 31) étude BOND-2, 2010 (226)</i> COLON métastatique réfractaire à l'irinotecan Bevacizumab +cetuximab+irinotecan vs Bevacizumab +cetuximab Bras avec irinotecan ; <b>Génotype AA défavorable</b> <b>TTP plus court</b> : 6.8mois (6-11.1) vs 8.4 mois(7.1-13) p=0.001</p> <p>Etude américaine, <i>Zhang et al, 2006 (n= 39) (227)</i> COLON métastatique en 3<sup>ème</sup> ligne Traitement par Cetuximab <b>Génotype AA défavorable</b> <b>Médiane de survie globale plus courte</b> : 2.3(2.1-5.7) vs 8.7 mois (4.4-13.5) p=0.019</p> <p>Étude suisse, <i>Gautschi et al,2006 (n= 244) (222)</i> Cancer du POUMON non à petites cellules 81% de stade III-IV Chimiothérapie : doublets sels de platine &gt;50% des cas, taxanes, gemzar, navelbine Allèle A délétère : moindre réponse à la chimiothérapie <b>Génotype sauvage GG favorable</b> vs AG-AA : associé (réponse stabilité), sous sels de platine p=0.04</p>
------------------------	--	------------	--------------------------------------	---	---	---	---	--------------	---

**Tableau 37. Comparaison de l'effet des SNP sur la PFS à la partie néoadjuvante et aux données de la littérature dans la population n°1**

## 2. Sur la MFS

En prenant la survie sans récurrence métastatique uniquement (MFS) et non la PFS, nous avons retrouvé, davantage de SNP associés à la rechute métastatique au décours de la chimiothérapie adjuvante.

En effet, sur les 46 SNP testés, 5 sont associés à la MFS : **CYP2B6-rs2279345, NOS3-rs1799983, SLCO1B3-rs11045585, BRCA1-rs799917, CYP2D6-rs3892097.**

**La comparaison des résultats obtenus des l'effet des génotypes des SNP sur la MFS aux résultats antérieurs sur la partie néoadjuvante de l'étude et avec les données de la littérature sont résumées dans le tableau 39.**

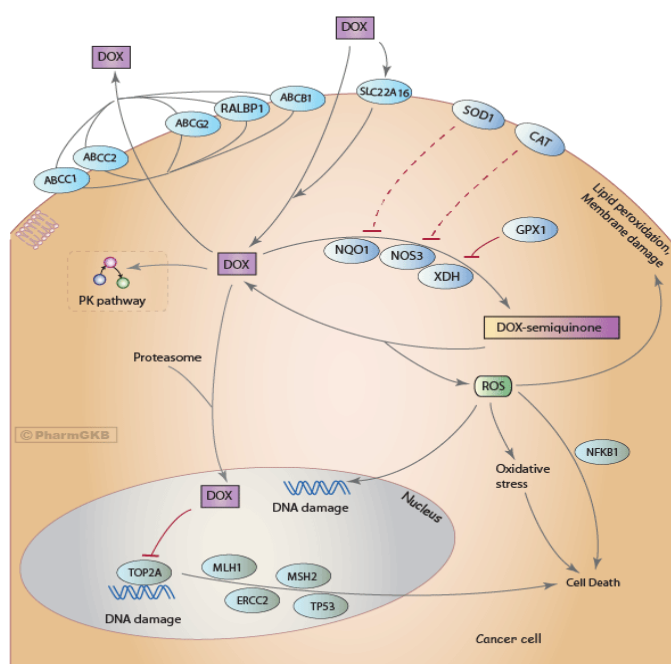
### **NOS3- rs1799983.**

En effet, pour le variant **NOS3-rs1799983.** il a été constaté une différence statistiquement significative entre les 3 génotypes possibles GG vs TT vs GT ( $p=0.008$ ), et en cas de génotype **TT versus GG-GT,** le HR de rechute métastatique est multiplié d'un facteur **2.62 (1.07-6.43)** avec une ***p value*** à **0.03** faisant du génotype TT un génotype plutôt « délétère ». À l'inverse, en cas de génotype GT versus GG-TT, on observe une réduction de récurrence métastatique avec un HR 0.32 (0,14-0.76)  $p=0.006$  faisant évoquer un génotype plutôt « protecteur » pour le statut hétérozygote GT. Pour le génotype GG, la comparaison au génotype GT-TT n'est pas interprétable car statistiquement non significative ( $p=0.13$ ).

**D'un point de vue biologique,** et de l'implication de variants de ce gène avec la chimiothérapie, on sait que de nombreux agents de chimiothérapie sont cytotoxiques en générant des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS). Le cyclophosphamide et les anthracyclines exercent ainsi en plus de leur action spécifique sur l'ADN, un effet anti tumoral via le stress oxydatif. En effet, une apoptose cellulaire est induite par activation intrinsèque des voies mitochondriales médiée par les ROS et le stress oxydatif. Ainsi, pour le cyclophosphamide, le 4-hydroperoxycyclophosphamide, analogue actif du cyclophosphamide, génère du

peroxyde d'hydrogène durant sa dégradation et induit l'apoptose par stress oxydatif. Parmi les nombreux mécanismes intracellulaires cytotoxiques des anthracyclines, un nombre important d'oxydoréductases catalysent la réduction de la doxorubicine en dox-semiquinone, générant des radicaux libres qui interagissent et induisent des dommages à l'ADN (**Cf. partie IV. C. 1. a) et Figure 65**). **Des variants des gènes relatifs au stress oxydatifs (qui génèrent ou qui protègent des ROS) peuvent ainsi influencer la survie sans récurrence.**

De telles études ont déjà été menées, et notamment spécifiquement dans le cancer du sein. Ainsi, *Choi et al* ont étudié l'effet des variants de ces gènes incluant la nitric oxide synthase endothéliale (NOS3) parmi d'autres gènes (NQO1, NQO2, CBR3) chez des patientes issues de l'essai du SWOG S8897(194). Dans cette étude, les patientes étaient randomisées entre une chimiothérapie par CMF ou par FAC+/-Tamoxifène (n=458) pour les haut risque de rechute ou par l'absence de chimiothérapie adjuvante pour les bas risques (n=874). Pour rappel, NOS3 génère de l'oxyde nitrique de durée de vie limitée en convertissant la L-arginine en citrulline dans les tissus endothéliaux.



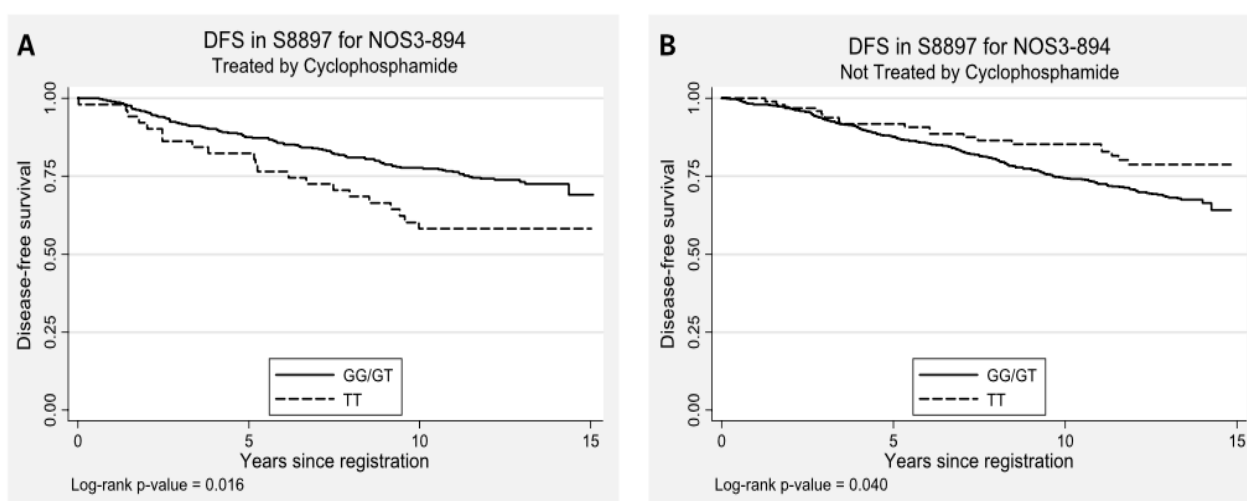
**Figure 65. Mécanisme d'action des anthracyclines, ici de la doxorubicine.**

Blocage de la topoisomérase II au niveau nucléaire et production de radicaux libres (ROS) lors de la conversion en dox-semiquinone par les oxydoréductases cellulaires (NQO1, NOS3, XDH) contribuant à la cytotoxicité et à la mort cellulaire.

*Issu de la base PharmGKB.*

Dans cette étude, deux variants de NOS 3 étaient étudiés : dans une région codante de NOS3, au niveau de l'exon 7, en position 894 Glu298 Asp (G>T) avec pour conséquence une diminution de la capacité de clivage de NOS3, donc une diminution de la production de NO. Le 2<sup>ème</sup> variant NOS3 786T>C est situé au niveau du promoteur de NOS3 avec pour conséquence une diminution de l'activité du celui ci et donc de la quantité de NO.

Les patientes traitées et non traitées ont été génotypées pour ces 2 SNP de NOS3 en plus de SNP sur des enzymes intervenant dans la détoxifications des quinones (anthracyclines) et le stress oxydatif comme la NADPH déhydrogénase quinone 1 ou 2 (NQO1) (NQO2) et la carbonyl réductase 3 (CBR3). Il a été retrouvé, uniquement pour les patientes traitées, par chimiothérapie adjuvante (CAF/CMF) (n=458), et uniquement pour le SNP **NOS3894 G>T**, un effet « délétère » du **génotype homozygote TT**. En effet, ce génotype est retrouvé associé à une moindre survie sans récurrence (PFS) par rapport aux patientes avec le **génotype GG ou GT (HR : 1.76 IC 95%1.14-2.92) p=0.016**. Cependant, chez les patientes non traitées par chimiothérapie, il est observé l'effet inverse du génotype homozygote TT. En effet, dans ce cas, **le génotype TT est « favorable »** avec une meilleur survie que celles avec le génotype GG ou GT (HR ajusté :0.67 IC95%0.42-1.07) p=0.040 (**Figure 66**). Le 2<sup>ème</sup> SNP de NOS3, sur le promoteur du gène, 786T>C n'était pas retrouvé associé la survie sans récurrence dans la population traitée par chimiothérapie.



**Figure 66.** Survie sans progression chez les patientes traitées par chimiothérapie adjuvante (CMF ou CAF) à droite et non traitées à gauche en fonction du génotype pour le SNP de NOS3-894 G>T (194).

**Cet effet inverse entre le groupe traité/non traité par chimiothérapie adjuvante cytotoxique peut s'expliquer par le rôle multiple et dualiste du NO dans la tumorigénèse et la progression tumorale, dépendant notamment de sa concentration, de l'environnement tumoral, du type cellulaire (194).**

En cas de variant TT, il existe ainsi une activité diminuée de NOS3, donc des niveaux plus faibles de NO endothélial.

-Dans le groupe traité par chimiothérapie, ce génotype TT avec diminution de NO est délétère. Ceci s'explique par le fait que l'activité enzymatique de NOS3 médie la sensibilité aux agents alkylants via le NO. En effet, le NO interagit avec d'autres radicaux générés par les agents de chimiothérapie pour former du peroxy-nitrite, responsable des dommages aux lipides membranaires, à l'ADN et aux protéines par des réactions oxydatives directes/indirectes. Ainsi, si les patientes de génotypes TT ont une activité diminuée de NOS3, donc moins de NO, moins de dommages cellulaires induits par les agents de chimiothérapies et donc une moindre efficacité se traduisant par une DFS plus courte.

-Dans le groupe non traité, les patientes avec un génotype TT, donc de faible niveau de NO, ont à l'inverse une meilleure survie sans rechute que celle avec des niveaux de NO élevés pour les génotypes GT-GG. Ceci peut s'expliquer par l'effet de la concentration de NO. En effet, une concentration élevée de NO est retrouvée associée à une augmentation de la synthèse des facteurs de croissance vasculaires (VEGF) et de la néovascularisation, de l'angiogenèse tumorale, du flux sanguin tumoral, une croissance tumorale plus importante, ainsi qu'une propension à une invasion et une dissémination à distance plus élevée. Des niveaux élevés de NO peuvent ainsi activer KRAS, nécessaire à la croissance tumorale. Le NO et les NOS ont des fonctions parfois dualistes en fonction de l'environnement oxydatif.

En cas de niveau bas de NO chez les patientes de génotype TT, ces mécanismes ne sont pas mis en jeu et il en résulte une croissance tumorale ralentie et un moindre risque de récurrence métastatique. Ceci expliquant que le génotype TT est associé à un meilleur pronostic chez les patientes non traitées (diminution NO et de l'agressivité biologique) et à un pronostic plus péjoratif chez les patientes traitées par

chimiothérapie, par altération de la sensibilité aux agents cytotoxiques médiées par le stress oxydatif.

**Ainsi les patientes avec un génotype normal GG-GT codant pour une enzyme NOS3 efficiente tirent bénéfice de la chimiothérapie tandis que les patientes avec le génotype TT codant pour une activité enzymatique diminuée n'ont pas ce bénéfice.**

Ainsi, les résultats de cette étude corroborent notre propre résultats puisque dans notre cohorte de patientes traitées par FEC100-Docetaxel, nous retrouvons un effet délétère sur le risque de rechute métastatique **d'un facteur 2.62 (1.07-6.43) du génotype TT avec une *p value* à 0.03 par rapport au génotype GT-GG sur le SNP NOS3 894 G>T, Glu298 Asp. Nos résultats sont donc en accord avec ceux de la littérature, à savoir un effet « défavorable » du génotype TT donc d'une activité diminuée de NOS3 en cas de chimiothérapie adjuvante par agents alkylants.** De plus, la répartition des génotypes semble sensiblement équivalentes puisque dans notre étude, la répartition était la suivante GG (44.2%), GT (45.2%), 31 TT (10.3%). Dans l'étude de *Choi et al*, dans le groupe traité, elle était de : GG(53.3%), GT(29.5%) et TT(17.2%).

D'autres études ont retrouvé, toujours dans le cancer du sein, que les génotypes associés à un stress oxydatif plus important sont associés à de meilleure survie. *Ambrosome et al* ont ainsi décrits un risque de décès diminué par 3 chez les patientes avec des génotypes associés à de plus haut niveau de ROS pour la Manganèse Superoxide Dismutase (MnSOD) et la Myéloperoxidase (MPO) : MnSOD génotype CC and MPO génotype GG: HR 0.33; 95% IC 0.13-0.80;  $p= 0.01(193)$ .

Nous n'avions pas retrouvé ce SNP associé à la pCR dans la population néoadjuvante.

### **SLCO1B3-rs11045585**

Ce SNP a été retrouvé associé à la PFS dans la partie précédente et est également associé de façon plus spécifique à la MFS. En effet, pour la PFS, il a été constaté une différence statistiquement significative entre les 3 génotypes possibles AA-AG ou GG

( $p=0.01$ ) et en cas de génotype GG versus AA-AG, le HR de rechute était multiplié d'un facteur 6.44 (1.54-26.94) avec une  $p$  value à 0.003 avec 2 évènements « toutes récurrences » dans le groupe GG sur 4 patientes avec un tel génotype GG contre 36 sur 297 avec un génotype AA-AG.

Pour la MFS, nous retrouvons toujours ce même surrisque pour le groupe GG (les 2 évènements étant des évènements métastatiques sur les 4 patientes de génotype GG) mais en réduisant à la survenue de métastases uniquement, dans le groupe AG-AA, nous avons alors 29 évènements sur les 297 soit un HR de rechute métastatique en défaveur du génotype GG à 7.73(1.83-32.7)  $p=0.001$ . Comme nous l'avons discuté dans la partie précédente pour la PFS, ces résultats sont en désaccord avec une tendance à un meilleur taux de pCR obtenue dans la population néoadjuvante traitée par FEC100-Docetaxel de génotype GG, mais en accord avec les données de réponse à la chimiothérapie par Docetaxel dans l'étude de *Choi et al*, retrouvant davantage de réponse en cas de génotype « sauvage » AA vs AG-GG (221). Les données de toxicité des patientes de génotype GG ont été évoquées dans la partie précédente.

De plus, la limite et critique majeure, comme pour GENEOM-Néoadjuvant, pour l'interprétation de ce SNP rs11045585 de SLCO1B3 est liée au faible nombre d'évènement (2) survenant dans un groupe à génotype défavorable relativement peu fréquent dans notre population d'étude (4 patientes de génotype GG soit 1.3%) versus 74 patientes de génotype AG (24.6%) et la majorité 223 soit (71.1%) double homozygote AA.

**Ce SNP n'a donc pas pu être inclus dans l'analyse multivariée finale et son impact reste limité dans le cadre de cette étude.**

### **CYP2B6-rs2279345.**

**Dans notre étude GENEOM adjuvant, pour CYP2B6-rs2279345**, il a été constaté une différence statistiquement significative entre les 3 génotypes possibles CC, CT et TT ( $p=0.049$ ) et en cas de génotype TT versus CC-CT, le HR de rechute métastatique est multiplié d'un facteur 2.29 (1.02-5.13) avec une  $p$  value à 0.04. Pour ce SNP, il s'agit d'une substitution d'une thymine (T) pour une cytosine (C). L'allèle ancestral est



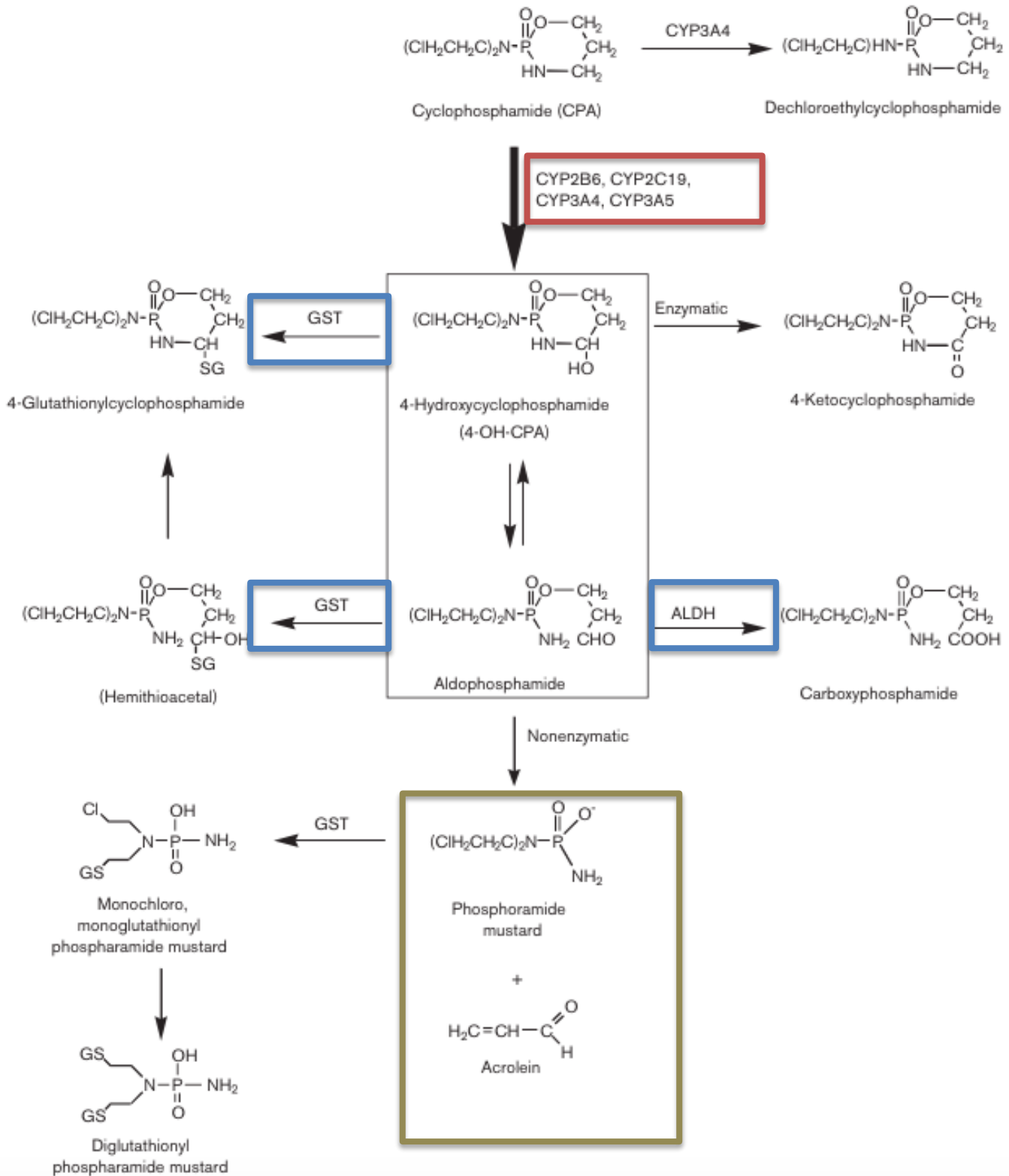
l'allèle C. Concernant la répartition des génotypes dans notre population majoritairement caucasienne, le génotype TT représentait 15.3% des cas (46TT), les CT 43.8% (132CT) et les doubles homozygotes CC 40.9% (123CC). Dans l'étude de *Nakajima et al* sur une population différente puisque asiatiques, les génotypes CT-CC représentaient 70.9% des cas (fréquente dans la population japonaise) contre un peu moins, 59.1% dans notre étude (229).

**D'un point de vue biologique.** CYP2B6 est un cytochrome impliqué dans le métabolisme du cyclophosphamide (CPA), métabolisme essentiellement hépatique (Cf partie IV, C, 1, b). Le cyclophosphamide est une prodrogue qui nécessite d'être activée en 4-OH cyclophosphamide, qui va être à l'équilibre avec l'aldophosphamide qui subit lui même une décomposition pour former la moutarde phosphoramidate, agent alkylant bifonctionnel responsable des lésions à l'ADN et en acroléine, métabolite cytotoxique ultime. Cependant, le 4OH-CPA comme l'aldophosphamide peuvent être parallèlement dégradés par la glutathione S transférase (GST) et l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) en 4ketocyclophosphamide et en carboxyphosphamide respectivement (**Figure 67**).

La transformation du CPA en 4-OH CPA est **une étape cruciale** pour l'activation du CPA. Elle est effectuée par plusieurs cytochromes CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5.

**Parmi ces cytochromes, CYP2B6 effectue la majeure partie de l'hydroxylation du CPA.**

De nombreux SNP ont été décrits pour CYP2B6, certains ayant pour conséquence une augmentation ou une diminution de l'expression et de l'activité du cytochrome, avec parfois des données contradictoires.

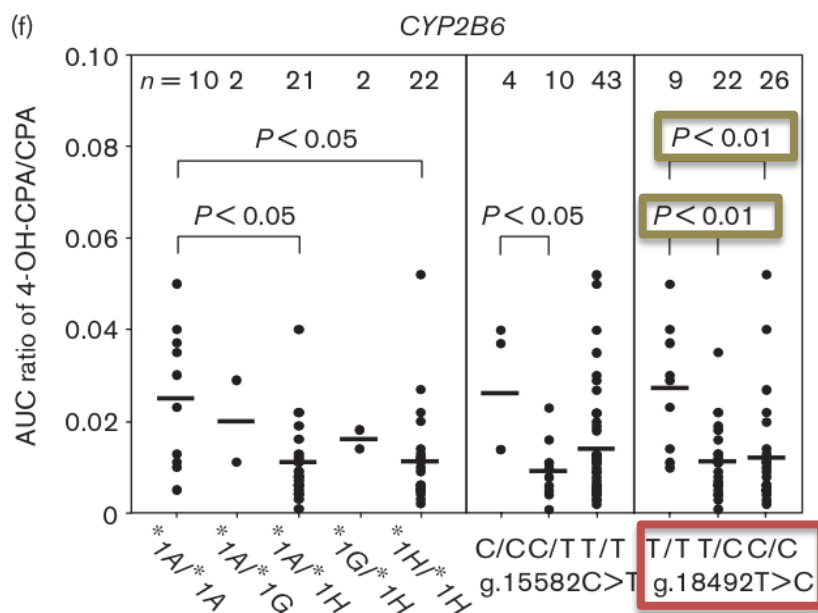


**Figure 67.** Voies d'activation et d'inactivation du cyclophosphamide (229).

Une étude japonaise a été réalisée sur 103 patientes atteintes de cancer du sein ou de lymphomes malins afin d'étudier les polymorphismes de différents cytochromes (CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5), de l'ALDH1A1 et de la GST impliqués dans le métabolisme du CPA (229). Ces patients étaient traités par chimiothérapie par cyclophosphamide entre 500 et 750mg/m<sup>2</sup>. Dans cette étude, *Nakajima et al* ont retrouvé une association pour le SNP CYP2B6 18492 T>C au niveau de l'intron 5 (avec d'autres SNP du gène CYP2B6 mais à des endroits différents du gène) avec une aire sous la courbe (AUC) basse du ratio 4-OH CPA/CPA, témoignant d'une diminution de l'hydroxylation du CPA.

Cette différence est objectivée pour les patients avec un seul allèle C soit le génotype CT vs les patients de génotype TT ( $p < 0.01$ ) et pour les variants doubles homozygotes CC vs TT ( $p < 0.01$ ) (**Figure 68**).

**Ainsi, l'allèle C à l'état homozygote ou hétérozygote est associé à une diminution de l'hydroxylation du CPA et donc de la forme active du CPA, pouvant ainsi impacter sur l'efficacité de la chimiothérapie.**



**Figure 68.** AUC du ratio 4-OH CPA/CPA en fonction du génotype du SNP du gène CYP2B6. Chaque point représente un patient de l'étude, chaque barre la valeur moyenne du ratio pour chaque groupe de génotype (229).

De plus cette étude a confirmé en corollaire le lien entre ce SNP 18492 T>C et la toxicité hématologique du CPA sous forme de leucopénie avec 100% de leucopénie de G $\geq$ 2 en cas de génotype TT (activation normale du CPA) contre 86% et 62% de leucopénie de G $\geq$ 2 (diminution de la forme active de CPA et donc potentiellement de la toxicité) en cas de génotype CT ou CC respectivement (**Figure 69**).

	Leukocytopenia (grade $\geq$ 2)		The percent decrease in leukocyto count [(baseline–nadir)/ baseline] $\times$ 100 (%)
	Not experienced	Experienced	
CYP2B6*1A/*1A (n=10)	0 (0%)	10 (100%)*	72.3 $\pm$ 18.1
CYP2B6*1A/*1H (n=21)	4 (19%)	17 (81%)*	59.1 $\pm$ 21.5
CYP2B6*1H/*1H (n=22)	9 (41%)	13 (59%)*	51.2 $\pm$ 32.9
CYP2B6*1A/*1G (n=2)	0 (0%)	2 (100%)	(43.6, 58.2)
CYP2B6*1G/*1H (n=2)	0 (0%)	2 (100%)	(55.0, 90.4)
g.15582C>T			
C/C (n=4)	0 (0%)	4 (100%)	79.3 $\pm$ 16.3
C/T (n=10)	2 (20%)	8 (80%)	63.5 $\pm$ 24.4
T/T (n=43)	11 (26%)	32 (74%)	55.5 $\pm$ 27.0
g.18492T>C			
T/T (n=9)	0 (0%)	9 (100%)*	75.6 $\pm$ 16.0 <sup>†</sup>
T/C (n=22)	3 (14%)	19 (86%)*	60.9 $\pm$ 20.9
C/C (n=26)	10 (38%)	16 (62%)*	50.7 $\pm$ 30.8 <sup>†</sup>

\* $P < 0.05$ , by Fisher's exact method.

**Figure 69.** Association entre les différents génotypes du gène CYP2B6 dans la population japonaise de patientes (229).

Dans notre étude GENEOM ADJUVANT, nous avons retrouvé un effet « délétère » du génotype TT versus CC-CT, le HR de rechute métastatique étant multiplié d'un facteur 2.29 (1.02-5.13) avec une *p value* à 0.04. Cela signifie que dans notre population, les patientes avec une génotype TT, donc une transformation en métabolite actif normal ou normal haut ont un risque de rechute métastatique plus élevé que les patientes avec un variant C à l'état homozygote CC ou hétérozygote CT.

Dans la population néoadjuvante, ce SNP avait également été retrouvé associé à la pCR dans la population traité par FEC100-Docetaxel mais dans une sous partie de cette population, uniquement pour les RE+ (**tableau 38**).

	Population totale	ER +	ER-
pCR, n (%)	25/118 (21.2%)	10/74 (13.5%)	15/42 (35.7%)
Association significative aux SNP:	<b>ERCC1-rs11615</b> BRCA1-rs799917 CYP1B1-rs1056836 <b>SLCO1B3-rs11045585</b>	<b>ERCC1-rs11615</b> BRCA1-rs799917 CYP1B1-rs1056836 <b>SLCO1B3-rs11045585</b> <b>CYP2B6-rs2279345</b> <b>CYP2D6-rs3892097</b> SHMT1-rs1979277	<b>ERCC1-rs11615</b> CD24-rs52812045 CYP2B6-rs2279343 GSTP1-rs1695

**Tableau 38. SNP associés à la pCR dans la population néoadjuvante.**

En bleu, SNP commun avec la partie adjuvante de l'étude pour la population n°1 traitée par FEC100-Docetaxel.

Dans ce cas, les patientes de génotype CT ont une probabilité de pCR multipliée par 5.57 (1.3-24)  $p=0.016$ , avec 28% de pCR si CT vs 8.3% si CC et 0% si TT (allèle T avec activation normale en CPA actif). Il n'était retrouvé aucune pCR dans le groupe de patientes de génotype TT avec une quantité de forme hydroxylée de CPA normale. Ainsi dans la partie néoadjuvante de l'étude, nous retrouvons un effet plutôt « défavorable » sur la pCR du génotype TT (0%), avec moins de pCR et ceux ci malgré des formes actives de CPA normales ou normales hautes par rapport aux génotypes CC-CT.

**Au total, le génotype TT bien qu'associé biologiquement à une activation « normale » du cyclophosphamide est retrouvé associé en néoadjuvant à une moindre pCR (0%). La présence d'au moins un allèle C, soit CT permet de multiplier par 5.57 la pCR. En adjuvant, le génotype TT est associé à un augmentation du risque de rechute métastatique d'un facteur 2.29 (1.02-5.13) et semble donc plutôt délétère.**

**Il semble difficile d'expliquer d'un point de vue biologique cette « relation inverse »** dans le mesure ou de façon logique et cohérente, si le génotype TT est associé à la présence en quantité normale ou normale haute de la forme active de CPA vs les CT ou CC, il devrait être associé à davantage d'efficacité et donc de meilleure données de survie. Comme pour SCLO1B3, l'explication tient peut être **aux données de toxicité** puisque l'étude de *Nakajima et al* confirme l'association du génotype TT à une toxicité hématologique plus importante. Les patientes avec un

génotype TT ont éventuellement fait l'objet de réductions de dose et / ou de reports de cure pour toxicité hématologique induite par le cyclophosphamide (réduction de la RDI : relative dose intensity). Dans notre étude, 46 patientes (15.3%) sont concernées par ce génotype TT. Les données de toxicités n'ont pas été pour rappel intégrées au recueil de données de cette étude. Il n'était donc pas possible de regarder les RDI et les toxicités des 46 patientes TT.

**Cependant, nous avons regardé, parmi ces 46 patientes TT, les données de toxicités des 8 patientes qui ont présenté une rechute métastatique, afin d'observer si celles ci présentaient des toxicités importantes, notamment hématologique, avec baisse éventuelle de la RDI du FEC 100. En regardant ces données, seule une patiente sur les 8, la patiente n°180 a présenté deux reports de cure pour le 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> FEC100 sans modification de dose. Les 7 autres patientes TT ont reçu le protocole FEC 100 avec une RDI normale.**

**Ainsi, sur ces données « observatoires », nous n'avons pas retrouvé de surtoxicité avec modification potentielle de la RDI pouvant expliquer cet effet inverse délétère du génotype TT.**

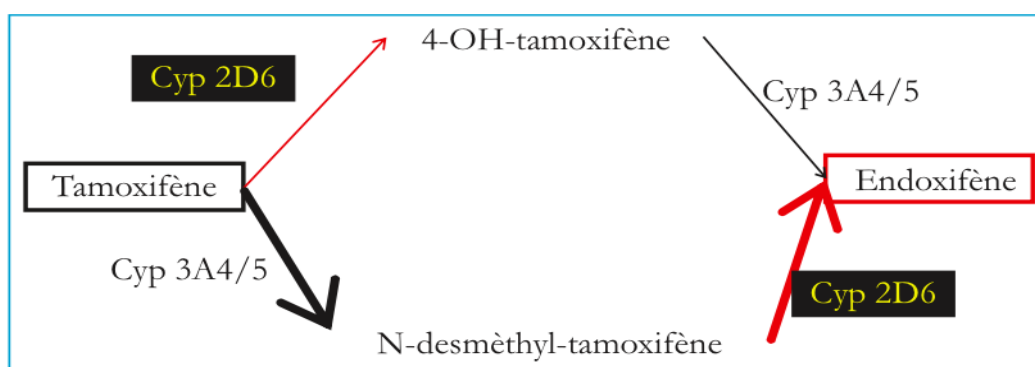
Eventuellement, l'hypothèse également d'efficacité identique du CPA chez les CC ou CT par métabolisation du CPA en forme hydroxylée par les autres cytochromes (CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5) permettant une hydroxylation certes diminuée du CPA, mais suffisante pour que la chimiothérapie soit « efficace ».

Enfin, ces patientes peuvent être porteuses de SNP sur ces autres cytochromes intervenant dans le métabolisme du cyclophosphamide, augmentant leur efficacité, avec finalement un niveau équivalent voire augmentée de forme active de CPA.

### **CYP2D6-rs3892097.**

Pour CYP2D6-rs3892097, ou CYP2D6\*4, **dans notre étude GENEOM adjuvant,** pour ce variant, il a été constaté une différence statistiquement significative en cas de génotype hétérozygote AG versus AA-GG, le HR de rechute métastatique est augmenté d'un facteur 2.14 (1.05-4.36) avec une *p value* à 0.03.

**D'un point de vue biologique,** CYP2D6 est un cytochrome qui intervient essentiellement dans le métabolisme du Tamoxifène. En effet, à l'image du cyclophosphamide, le Tamoxifène est une prodrogue qui nécessite d'être activée en endoxifène essentiellement par un cytochrome hépatique, le cytochrome CYP2D6. Le métabolisme du Tamoxifène est résumé dans la **figure 70**. Le Tamoxifène est métabolisé par le CYP2D6 ce qui aboutit au 4-OH-Tamoxifène puis par d'autres cytochromes en N-desmethyl-tamoxifène (NDT). Les 2 produits issus de cet 1<sup>ère</sup> étape métabolique vont être en partie transformés toujours par le CYP2D6 et les autres cytochromes en Endoxifène, métabolite final et actif. **Parmi ces enzymes, c'est surtout le CYP2D6 qui est responsable de la majorité de la formation de l'Endoxifène**, les CYP3A4/5 ne sont responsables que de la formation d'une infime partie de l'Endoxifène. Ce cytochrome intervient dans le métabolisme de près de 25% des médicaments notamment le métabolisme de la morphine, des anti-arythmiques cardiaques, des antipsychotiques et antidépresseurs, expliquant les nombreuses interactions médicamenteuses à prendre en compte dans la prescription du Tamoxifène.






**Figure 70. Métabolisme simplifié du Tamoxifène (230)**

Il est décrit actuellement plus de 80 variants de ce cytochrome (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>), avec pour résultantes 4 phénotypes de métabolisme enzymatiques avec des activités nulles, diminuées, normales ou augmentées. Les variations les plus fréquentes sur ce gène sont des SNP, avec moins fréquemment des délétions. De nombreuses études concernant les variants de ce cytochrome existent, la plupart rétrospectives et parfois contradictoires, en tout cas insuffisantes pour valider le génotypage en pratique courante actuelle pour la prescription de Tamoxifène dans le cadre des hormonothérapies adjuvantes.






Ainsi, plusieurs variants sont décrits, le variant noté \*1 avec une activité normale étant le plus fréquent. Il existe 4 groupes de variants en fonction de l'activité prédite du variant sur le CYP2D6 (**Figure 71**):

- Les variants \*1 et \*2 traduisent une activité normale.
- les variants \*9, \*10 et \*41 une activité intermédiaire (protéine entière mais de conformation tertiaire différente)
- les variants \*3, \*4, \*5 et \*6 une activité nulle (pas de protéine traduite).

En fonction des combinaisons à l'échelle bi-allélique des variants, il est possible de connaître l'activité enzymatique du cytochrome CYP2D6.

Allèles	Variants
	CYP2D6*1, CYP2D6*2
	CYP2D6*9, CYP2D6*10, CYP2D6*41
	CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*6

Haplotype	Phénotype = activité enzymatique prédite
	Augmentée = ultrarapid metabolizer ( <b>UM</b> ) (Duplication du gène avec variant normal)
	Normale = extensive metabolizer ( <b>EM</b> )
	Diminuée = intermediate metabolizer ( <b>IM</b> )
	Diminuée = intermediate metabolizer ( <b>IM</b> )
	Nulle = poor metabolizer ( <b>PM</b> )

**Figure 71.** Correspondance entre les génotypes possibles du CYP2D6 et la traduction en terme d'activité enzymatique (230).

Le variant \*4, après le variant normal \*1, est le variant le plus fréquent chez les caucasiens de l'ordre de 12 à 21%. Ainsi, 7% environ des caucasiens sont homozygotes \*4/\*4 avec activité enzymatique nulle (PM), 70% sont métaboliseurs normaux (EM), 20% sont intermédiaires (IM), et 2% métaboliseurs ultra-rapides (UM).



Dans notre étude, la répartition du génotype étudié du **CYP2D6\*4 1846G>A**, le **rs3892097** était d'une majorité de patients de génotype normal **GG (210 GG) soit 69.8%**, **25.6% de génotype AG (77AG)** et **4.6% AG (14AA)**, ces chiffres étant ainsi en accord avec les données de la littérature sur la répartition de ce génotype dans la population caucasienne.

**Sur le plan de l'association de ce SNP avec la MFS dans la partie adjuvante, CYP2D6-rs3892097 G>A est retrouvé associé à une moins bonne MFS.** L'allèle sauvage étant l'allèle G et le variant l'allèle A. En effet, le génotype AG versus AA-GG est défavorable avec un HR de rechute métastatique augmenté d'un facteur 2.14 (1.05-4.36) avec une *p value* à 0.03. Nous avons observé que le génotype normal GG (activité enzymatique normale) même si non statistiquement significatif semble bien avoir un effet « protecteur » avec un HR de rechute métastatique de 0.55(0.27-1.12) *p*= 0.10 (2<sup>ème</sup> résultat le plus statistiquement significatif). Les résultats de notre étude sont donc en accord avec les données actuellement connues de la littérature concernant la répartition et les conséquences d'un tel variant en terme d'efficacité du Tamoxifene. En effet, nous corroborons le fait que le variant CYP2D6\* avec une activité diminuée ou nulle impacte sur l'efficacité du Tamoxifene et in fine sur le risque de survenue de métastases.

Ce SNP en particulier, **CYP2D6-rs3892097 G>A**, a été choisi pour l'étude GENEOM suite à l'étude de *Gor et al* (231), même si dans cette étude il n'avait pas retrouvé associé à la survie sans récurrence dans la population RE+ traitée par Tamoxifène. Cette étude ECOG-2190/INT-0121, menée rétrospectivement sur 350 patientes atteintes de cancer du sein N+, traitée par FAC +/- suivie d'une chimiothérapie haute dose (Cyclophosphamide et Thiotepa avec autogreffe de cellules souches périphériques), s'est intéressée au génotypage de la plupart des SNP des enzymes impliqués dans le métabolisme du cyclophosphamide afin de les corrélés aux données de survie sans rechute (PFS) et de survie globale (OS) et de faire « émerger » un éventuel SNP prédictif de non réponse (CYP2B6, CYP2C9, **CYP2D6**, CYP3A4, CYP3A5, GSTM1, GSTT1, and GSTP1) (231). Le variant CYP2D6\*4 était intégré au génotypage afin de prendre en compte un éventuel effet différentiel du génotype de ce cytochrome sur le métabolisme du Tamoxifene et donc sur les données de survie chez les patientes avec des récepteurs hormonaux positifs.

En effet, les études sur les variants du cytochrome CYP2D6 sont parfois discordantes avec des résultats contradictoires et s'intéressent à des populations de patients atteintes de cancers du sein parfois différentes (situation métastatique versus adjuvant), (**Figure 72**, *Barriere et al*, revue de la littérature, Bulletin du cancer (230).

*Goetz et al* en 2007, en intégrant les données de la coprescription d'inhibiteurs enzymatiques du CYP2D6 a retrouvé, avec un recul de 10 ans, chez 180 femmes ménopausées issu de l'essai NCCTG 89-30-52 traité par Tamoxifène pendant 5 ans, un risque relatif de rechute plus élevée chez les métaboliseurs nuls (\*4/\*4) et/ou sous inhibiteurs du CYP2D6 (RR=1,6 IC 95% (1.06-2.43), p=0,027) versus le groupe à métabolisme normal (sauvage/sauvage) ou intermédiaire (\*4/sauvage). Il n'y avait pas d'effet sur la survie globale. *Schroth et al* a retrouvé également cet effet délétère du CYP2D6\*4 et d'autres variants \*5,10,41 sur 206 patientes avec une moindre survie sans récurrence avec en cas de génotype hétérozygote métaboliseur normal, métaboliseur intermédiaire ou nul pour un risque relatif de rechute de 1.89 (1.10-3.25) p=0.02 (232). Les autres études asiatiques de *Lim* (233), *Kiyotani* (234) et *Xu et al* (235) sont moins intéressantes dans notre situation, puisque révélant le variant \*10 comme délétère sur la survie sans récurrence ou la réponse au traitement, celui-ci étant plus fréquent chez les asiatiques que le variant \*4. *Nowell et al* (236) comme *Wegman et al* (237) n'ont pas retrouvé cet effet délétère des variants de CYP2D6, notamment \*4, voire un effet paradoxalement favorable.

**Dans la population GENEOM néoadjuvant.** ce variant avait été retrouvé associé à la pCR, uniquement dans la population RE+. En effet, il était retrouvé davantage de pCR dans le groupe de génotype GG avec 19.6% de pCR vs 4.2% si AG et 0% si AA et une probabilité d'atteindre une pCR diminuée avec HR diminué à 0.17 (0.02-1.44) p =0.049, en cas de génotype AG-AA versus les GG. Cependant même si ce résultat est cohérent d'un point de vue biologique, il n'est pas « logique » dans le sens où la pCR reflète l'effet de la chimiothérapie néoadjuvante et pas l'effet de l'hormonothérapie qui est administrée en post opératoire au décours de la chimiothérapie en cas de RE+.

**Au total, dans notre étude.** le génotype AG du SNP **CYP2D6-rs3892097 G>A** semble bien être associé à une diminution de l'activité du CYP2D6 et donc du Tamoxifène avec un impact ainsi sur le risque de rechute métastatique. Il semble être

intéressant pour sélectionner les patientes candidates à l'hormonothérapie adjuvante. Il n'a pas d'impact démontré actuellement spécifiquement sur l'efficacité de la chimiothérapie.

Auteur et type d'essai	Nombre de patients	Allèles étudiés	Résultats (analyse multivariée)
Goetz <i>et al.</i> 2005 [12] Étude rétrospective de l'essai NCCTG 89-30-52 Patientes caucasiennes	n = 190 échantillons disponibles (sur 256)	CYP2D6*4	*4/*4 vs wt/*4 + wt/wt SSM : RR = 1,86 (IC 95 %, [0,91-3,82]) p = 0,089-NS
Goetz <i>et al.</i> 2007 [13] Même population que dans l'étude publiée en 2005 Prise en compte des inhibiteurs du CYP2D6	n = 180	CYP2D6*4	PM + IM vs EM SSM : RR = 1,6 (IC 95 %, [1,06-2,43]) p = 0,027 SG = NS
Schroth <i>et al.</i> 2007 [14]. Étude rétrospective (hors essai) Patientes caucasiennes	n = 206 (patientes sous tamoxifène-TAM) n = 280 (groupe témoin-sans TAM)	CYP2D6*4 (PM) CYP2D6*5 (PM) CYP2D6*10 (IM) CYP2D6*41 (IM)	*Groupe TAM : EM vs (hetEM + IM + PM) SSE : RR = 1,89 (IC 95 %, [1,10-3,25]) p = 0,02 OS : RR = 1,73 (IC 95 %, [0,88-3,41]) p = 0,11 = NS *Groupe sans TAM : pas de différence
Lim <i>et al.</i> 2007 [15]. Étude en partie prospective Patientes coréennes	n = 21 (12 en prospectif + 9 en rétrospectif) n = 202 pour l'étude de pharmacocinétique associée dont 190 adjuvants	CYP2D6*10 Autres : CYP2D6*2xN, CYP2D6*5	RC + RP + MS = MC MC > 24 semaines = 15/21 Groupe (wt/wt + wt/*10) = 100 % de MC Groupe (*10/*10) : = 50 % de MC TP : 5,03 vs 21 ; 8 mois ; p = 0,0032
Kiyotani <i>et al.</i> 2008 [16] Étude rétrospective (hors essai) Patientes japonaises	n = 67	CYP2D6*10 + CYP2D6*4 CYP2D6*5 CYP2D6*41 CYP2D6*21	*10/*10 vs Wt/wt SSR : RR = 10 (IC 95 %, 1,2-86) ; p = 0,036
Xu <i>et al.</i> 2008 [17]. Étude rétrospective (hors essai) Patientes chinoises	n = 152 (patientes sous tamoxifène-TAM) n = 141 (groupe témoin-sans TAM)	CYP2D6*10	*10/*10 vs Wt/wt + wt/*10 SSM : RR = 4,7 (IC 95 %, [1,1-20,0]) p = 0,04 Groupe sans TAM : pas de différence
Nowell <i>et al.</i> 2005 [22] Étude rétrospective Patientes caucasiennes (81 %), patientes afroaméricaines (19 %).	n = 162 (patientes sous tamoxifène-TAM) n = 175 (groupe témoin sans TAM)	CYP2D6*4 Autres : CYP2D6*3, CYP2D6*6	*4/*4 + wt/*4 vs wt/wt SSP : RR = 0,67 (IC 95 %, [0,33-1,35]) ; p = 0,19), NS Groupe sans TAM : pas de différence
Wegman <i>et al.</i> 2007 [23] Étude rétrospective, issues en partie de patientes incluses dans un essai Patientes caucasiennes	n = 677	CYP2D6*4	*4/*4 vs wt/*4 ou wt/wt SSR : RR < 1, p = 0,055, NS

Wt : wild type ; SSM : survie sans maladie ; SG : survie globale ; SSE : survie sans événement ; SSR : survie sans rechute ; TP : temps jusqu'à progression, NS : non significatif, RR : risque relatif ; PM : poor metabolizer ; IM : intermediate metabolizer ; EM : extensive metabolizer ; hetEM : heterozygote extensive metabolizer ; MS : maladie stable ; RP : réponse partielle, RC : réponse complète ; MC : maladie contrôlée.

**Figure 72.** Etudes ayant retrouvées une association positive ou négative de variants de CYP2D6, en particulier le variant \*4, sur la survie sans récidence de patientes atteintes de cancers du sein et traitées par hormonothérapie par Tamoxifène (230)

**BRCA1- rs799917.**

Pour le variant BRCA1-rs799917, **dans notre étude GENEOM adjuvant** il a été constaté une différence statistiquement significative entre les 2 génotypes doubles homozygotes CC-TT et le génotype hétérozygote CT. En cas de génotype CT, le HR de rechute métastatique est diminué à 0.41 avec un effet « protecteur » de ce génotype par rapport au double homozygote soit TT ou CC. L'allèle sauvage est pour ce SNP l'allèle C et l'allèle variant, l'allèle T.

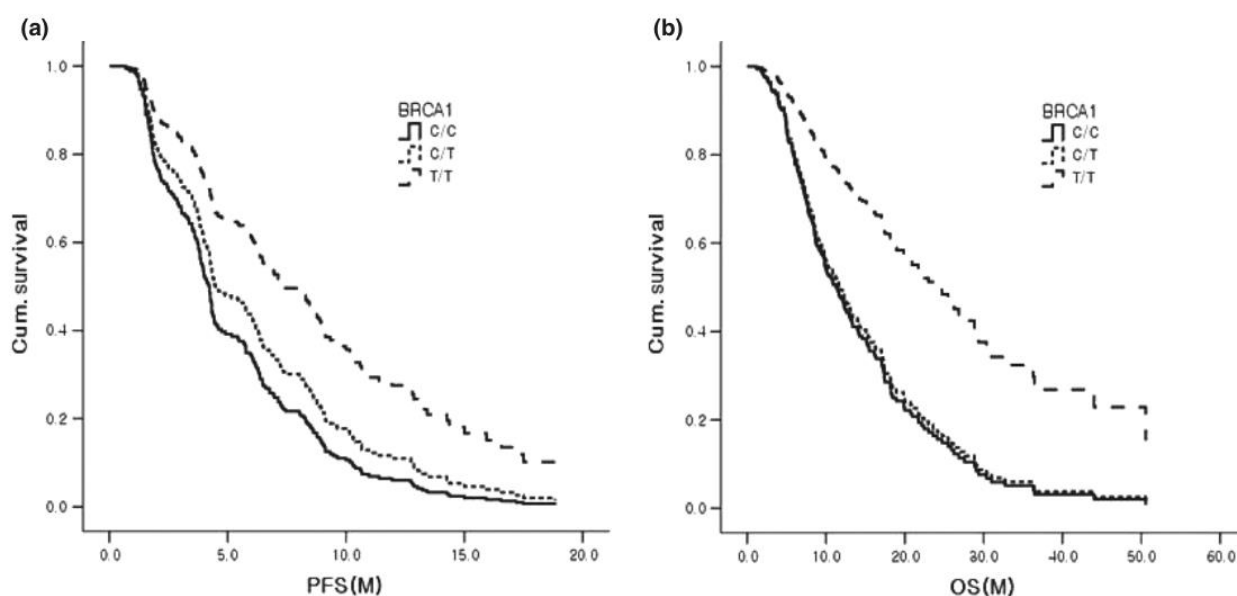
Concernant la **distribution de ce SNP**, le génotype TT est peu fréquent avec une fréquence de 9% (27TT), avec cependant une majorité de patientes hétérozygotes avec au moins un allèle mutant T de BRCA1 48.2% (145CT) et 42.8% de génotypes doubles homozygotes CC (129CC). Par comparaison à l'étude de *Shim et al*, mais qui concerne une population asiatique, la fréquence des génotypes de BRCA1 était de 5% de TT, 43.5% de CT et 51.5% de génotype sauvage CC ce qui est similaire avec la répartition des génotypes des patientes de notre étude (210).

**D'un point de vue biologique.** BRCA1 est un gène suppresseur de tumeur et de réparation des lésions de l'ADN. Il détecte les dommages de l'ADN, empêche la réplication d'un ADN anormal, remplace les nucléotides anormaux et en fonction des dommages empêche ou promeut l'apoptose cellulaire. Comme la plupart des agents de chimiothérapie agissent en induisant des dommages directs ou indirects à l'ADN, le rôle prédictif de polymorphismes de BRCA1 a déjà été étudié avec différents agents de chimiothérapie cytotoxiques (sels de platines, taxanes) et dans des localisations carcinologiques différentes : cancer du poumon notamment et cancer gastrique. Ainsi, la cytotoxicité induite par les sels de platine est médiée par la formation de ponts inter et intrabrins, entraînant un blocage de la réplication et une mort cellulaire par apoptose. BRCA1 intervient dans la réparation des ponts interbrins via les voies NER, de recombinaisons homologues et la voie de BRCA/Fanconi. Pour les taxanes, BRCA1 intervient comme un régulateur du point de passage du cycle cellulaire de la phase G2/M en réponse à ces agents. De plus, on sait que les patientes avec des mutations héréditaires germinales de BRCA1/BRCA2 ont en général de meilleures réponses aux agents entraînant des dommages à l'ADN. Ainsi, *Cass et al* ont démontré que les patientes avec un cancer héréditaire de l'ovaire lié à des mutations germinales de BRCA1/BRCA2 ont de meilleure réponse aux sels de platine que les

patientes avec des cancers sporadiques (238). Dans le cancer du sein, *Goffin et al*, ont retrouvé que les patientes porteuses du gène BRCA1 muté tiraient davantage bénéfice de la chimiothérapie adjuvante à base d'agents induisant des dommages à l'ADN que les patientes avec un cancer du sein sporadique (239).

Ainsi, dans le cadre du cancer gastrique métastatique, recevant une chimiothérapie à base de taxanes et de sels de platine (standard dans cette pathologie), une étude coréenne sur 200 patients menée par *Shim et al* a étudié plusieurs SNP potentiels pouvant impacter sur l'efficacité de la chimiothérapie car impactant sur le métabolisme des taxanes, des sels de platine et du 5FU ainsi que des gènes de réparation de l'ADN comme BRCA1 : (ABCB1, GSTM1, GSTP1, ERCC1, XRCC3, XRCC4, XRCC1, BRCA1, MTHFR, TYMS). Pour BRCA1-rs79991, **le génotype sauvage est le génotype CC (allèle normal C) et les génotypes variants sont CT ou TT (210).**

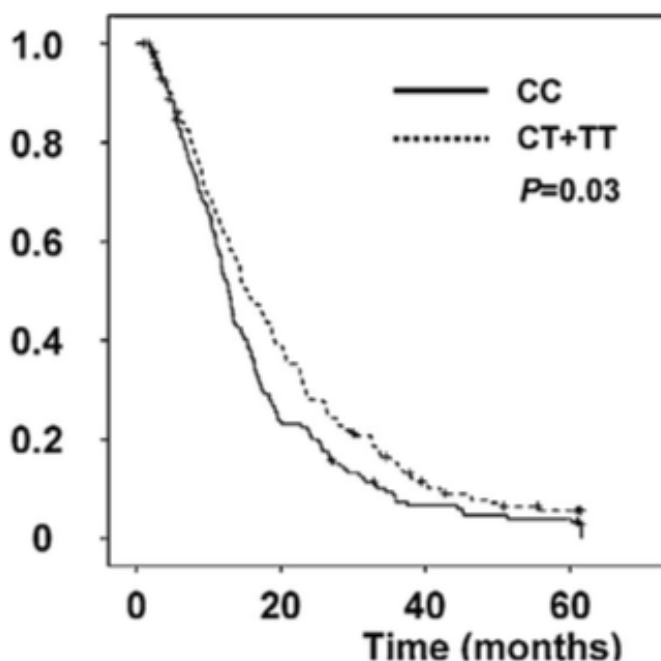
Sur 200 patients, seul le génotype variant à l'état homozygote TT de BRCA1 était retrouvé associé à une meilleure PFS avec un HR 0.51 IC 95%(0.26-1.00)  $p=0.05$  et à une meilleure OS avec un HR 0.43 IC95%(0.20-0.92)  $p=0.03$  (**Figure 73**). En regroupant les génotypes avec au moins un allèle T, on retrouve que le génotypes mutants de BRCA1, TT ou TC sont associés à une meilleure PFS HR : 0.695 (0.05-0.96)  $p=0.026$  et OS HR : 0.642 (0.47-0.89)  $p=0.07$  comparativement au patient de génotype sauvage CC (210).



**Figure 73.** Courbes de survie sans progression (PFS) à gauche et (OS) à droite dans la population de patients atteints de cancers gastriques avancés et traités par cisplatine et taxanes (210).

Une autre étude, dans le cadre du cancer du poumon localement avancé non résectable (stade III) ou métastatique (stade IV) a étudié en particulier ce SNP de BRCA1 et retrouve des résultats concordants sur l'effet positif du génotype sur les données de survie et de réponse aux traitements. En effet, *Lee et al*, sur une série coréenne de 382 patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), traité par chimiothérapie de 1<sup>ère</sup> ligne par Paclitaxel et cisplatine a effectué le génotypage de 74 SNP de 48 gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN et les voies de l'apoptose (240). Il a ensuite recherché une corrélation avec la réponse à la chimiothérapie et les données de survie.

BRCA1 rs799917 C>T est ainsi retrouvé positivement associé aux données de survie globale et de réponse au traitement. En effet, sur un « modèle dominant » en cas de génotype TT ou CT, le taux de répondeurs à la chimiothérapie est de 53.8% vs 42% pour les génotypes sauvages CC avec un OR ajusté à 0.59 IC95% 0.39-0.90  $p=0.02$ . Pour la survie globale celle ci est respectivement de 15.3 mois (12.9-17.7) vs 12.7 mois (11.7-13.8) en cas de génotype TT-CT versus CC avec un HR 0.78 (0.63-0.97)  $p=0.03$  (**Figure 74**).



**Figure 74.** Courbes de survies globales des patients atteints de cancer du poumon (NSCLC) traité par chimiothérapie de 1<sup>ère</sup> ligne par Paclitaxel et cisplatine en fonction du génotype du gène BRCA1 (240).

**Dans la population néoadjuvante** traitée par FEC 100-Docetaxel, la répartition du génotype dans la population totale était de 40% CC, 47.3% CT et 12.7% TT. La pCR différait entre les 2 groupes CC et CT-TT avec respectivement 11.4% et 28.8% de pCR, OR : 3.15(1.08-9.2)  $p=0.025$ . Ainsi, il était observé dans la population néoadjuvante, en cas de la présence d'un seul allèle variant T à l'état hétérozygote ou deux allèles T à l'état homozygote, davantage de pCR. Bien que considéré comme neutre, les conséquences fonctionnelles de ce SNP de BRCA1 C>T sont en fait encore inconnues. Ce variant pourrait affecter l'expression, l'activité, ou l'interaction de BRCA1 avec ses partenaires. En conséquence, ce SNP pourrait altérer la capacité de réparation de l'ADN de BRCA1 et donc contribuer à potentialiser l'effet des agents induisant des dommages à l'ADN.

**Dans notre étude GENEOM adjuvant,** nous avons retrouvé un effet plutôt « protecteur » donc bénéfique en présence d'un allèle mutant T soit le génotype CT versus les génotypes sauvage CC combinés aux génotypes variants homozygotes TT. Ce résultat de comparaison de groupes de génotypes est le seul statistiquement significatif avec une p value à 0.03 en faveur du génotype CT. Si on regarde le génotype sauvage CC versus la présence d'au moins un allèle mutant T soit CT -TT, on retrouve une « tendance » à un effet plutôt défavorable sur la MFS du génotype sauvage sans mutation de BRCA1 avec un HR à 1.97 (0.96-4.02)  $p=0.06$ . Il s'agit du deuxième résultat le plus proche de la significativité ( $p=0.06$ ) pour pouvoir analyser et comparer les génotypes. Cependant, ces interprétations sont à prendre avec précaution en raison de l'absence de significativité sur le plan statistique. Le génotype TT comparé à CT-CC n'est pas significatif sur le plan statistique avec un HR : 1.97 (0.96-4.02)  $p=0.43$ .

**Comme pour SLCO1B3 et CYP2B6, nous avons regardé les données de toxicités pouvant expliquer que le génotype TT ne « sorte » pas comme un génotype favorable à l'image de CT. Sur les 27 patientes de génotype TT, 4 ont rechutés. Seul une patiente, la patiente n° 698 a justifié d'un report de cure pour le 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> FEC 100 pour neutropénie non fébrile. Les 3 autres patientes ont bénéficié d'une RDI normale pour le FEC100. L'explication peut tenir également au fait que le génotype TT de BRCA1 n'est pas fréquent et ne concerne que 9% des patientes de l'étude (n=27 sur les 301 patientes évaluées) avec presque 50% de la population avec au moins un allèle T (48.2% CT) versus 42.8% CC.**

SNP	Rôle physiologique	Chimio	SNP rs	Allèle sauvage	Allèle variant	Conséquence fonction biologique	GENEOM Adjuvant HR de rechute	GENEOM Néoadjuvant OR de pCR	Données de la littérature		
<b>MFS</b>											
1°) SLCO1B3	Transporteur d'influx du Docetaxel (TXT)  Entrée du TXT dans la cellule	<b>Docetaxel</b>	<b>rs1104558 5 -567A&gt;G</b>	A	G	-Diminution de l'entrée du Docetaxel dans l'hépatocyte  -plus de forme libre non détoxifiée	<b>GG vs AA-AG :</b> HR : 7.73 (1.83-32.7) p=0.001  <b>Génotype GG délétère</b>  <b>SURTOXICITÉ ?</b>	<b>AG-GG vs AA</b> OR : 2.77(1.10-6.7) p=0.031  → <b>Génotype AG-GG favorable</b>  → <b>au moins un allèle G favorable avec plus de pCR</b>	Japonaise, n=84 <i>Kiyotani et al, 2008</i> (203)  <b>TOXICITÉ</b>  <u>Tous type de cancers :</u>  -Poumon (28.3%) -Sein (33.6%) -Œsophage (9.7%) -Autres (28.3%)  <u>Chimiothérapie par Docetaxel (TXT)</u>  <b>AG-GG vs AA</b> HR : 5.44 (IC 95% 2.22-13.34, p=0.013).  <b>Au moins un allèle G :</b>  <b>-plus de toxicité hématologique G3-G4</b>  <b>-par augmentation de l'AUC</b>	Asiatique, n=54, Singapour <i>Chew et al, 2011</i> (212) <b>PHARMACO-CINETIQUE</b>  <b>-Carcinomes nasopharyngés</b>  <b>-Traitement par TXT</b>  <b>GG vs AG-AA</b>  <b>-AUC du Docetaxel plus élevée</b> (p=0.026)  <b>-Clairance plus faible du Docetaxel</b> (p=0.036)	Coréenne N=92 <i>Choi et al, 2014,(218)</i> <b>TOXICITÉ</b> <u>Tous types de cancers</u> Poumon: 59.8% Estomac: 19.6% ORL: 14.1% Oesophage: 4.3% Autres: 2.2%  <u>Chimiothérapie :TXT</u> Toxicité <b>GG vs AG-AA</b> HR :9.44 (1.39-64.01) p=0.022 <b>Génotype GG plus de toxicité</b> <b>REPONSE</b> 48.8% AA vs 23.1% GG-AG p=0.075 Poumon : OR: 9.44 si AA <b>Génotype AA, plus de réponse</b>



2°) NOS3	Production de NO Participation au stress oxydatif	<b>Cyclo phosphamide</b>	<b>rs1799983 Glu298As p</b>	G	T	Diminution du NO endothélial	<b>TT vs <u>GT-GG</u></b> HR : 2.62 (1.07-6.43)  p=0.03  <b>Génotype TT délétère</b>	Non retrouvé Associé à la pCR	Étude Américaine, n=458 traitées en adjuvant <i>Choi et al, 2009 (229)</i> Cancer du sein adjuvant étude SWOG S8897 Chimiothérapie par FAC/CMF <b>Génotype TT délétère</b> vs GT-GG <b>PFS diminuée</b> HR : 1.76 IC 95%(1.14-2.92) p=0.016
3°) CYB2B6	Hydroxylation du cyclophosphamide	<b>Cyclo phosphamide</b>	<b>rs2279345</b>	T	C	Diminution Hydroxylation du CPA  Diminution forme active endoxan	<b>TT vs <u>CC-CT</u></b> Génotype TT délétère HR : 2.29 (1.02-5.13) p=0.04 <b>Génotype TT délétère</b>  <b>SURTOXICITÉ ?</b>	Associé pCR uniquement Population RE+ pCR 0% TT 8% CC 28% CT <b>Génotype TT semble défavorable</b>  <b>CT vs <u>TT-CC</u></b> OR : 5.57 (1.3-24) p=0.016  <b>au moins un allèle C, tendance à plus de pCR</b>	Etude japonaise, (n=103) <i>Nakajima et al, 2006(226)</i> Cancer du sein/Lymphomes Chimiothérapie par cyclophosphamide (500-750mg/m <sup>2</sup> )  PHARMACOCINETIQUE et TOXICITÉ <ul style="list-style-type: none"> <li>AUC du 4-OHCPA/CPA diminué pour un allèle C→CC vs TT (p&lt;0.01) et CT vs TT (p&lt;0.01)</li> <li>Toxicité G≥2 100% TT vs 86% CT et 62% si CC</li> </ul> <b>Génotype TT « sauvage » et allèle T :</b>  -plus de forme active de CPA  -plus de toxicité hématologique

4°) BRCA1	Réparation des lésions de l'ADN. Gène suppresseur de tumeur	Agents alkylants : Cyclophosphamide  Epirubicine	rs799917	C	T	Diminution de la réparation des lésions induites à l'ADN :  Augmentation de la mort cellulaire	<b>CT vs TT-CC</b> HR :0.41(0.19 – 0.89) p=0.02  <b>Génotype CT favorable, au moins un allèle T</b>  « <u>Tendance</u> » effet délétère du génotype sauvage CC, HR à 1.97 (0.96-4.02)  p=0.06	Associé à la pCR dans la population totale et RE+ pCR -11.4%CC -28.8% CT-TT  <b>CT-TT vs CC</b> pCR OR :3.15 (1.08-9.2) p=0.025  <b>Génotype CT-TT favorable</b>	<i>Shim et al</i> , n=200 patients, 2010, (210) Etude coréenne, Cancers gastriques avancés 1 <sup>ère</sup> ligne de chimiothérapie Taxanes(Taxol/Docetaxel)+ Cisplatine  <b>TT vs CT-CC</b>  OS : HR : 0.43 IC 95% (0.20-0.92) p=0.03  PFS : HR 0.51 IC 95%(0.26-1.00) p=0.05  <b>Génotype TT favorable</b>	<i>Lee et al</i> , n=382, 2013, (240) Etude coréenne Cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC) Stade III-IV 1 <sup>ère</sup> ligne de chimio Taxol+ Cisplatine <b>TT vs CT-CC :</b>  -Association <u>à la réponse</u> : 53.8% vs 42% OR ajusté à 0.59 IC 0.39-0.90 p=0.02 <b>-Association à la survie globale</b> 15.3 mois (12.9-17.7) vs 12.7 mois (11.7-13.8) HR 0.78(0.63-0.97) p=0.03 <b>Génotype TT favorable</b>
5°) CYB2D6	Transformation du Tamoxifène en forme active : endoxifène	<b>Hormono-thérapie par Tamoxifène</b>	rs3892097	G	A	Diminution de la forme active de Tamoxifène	<b>AG vs AA-GG</b> HR : 2.14(1.05-4.36) p=0.03  <b>Génotype AG défavorable</b>  « <u>Tendance</u> » effet protecteur du génotype sauvage GG  GG vs AG-AA HR à 0.55 (0.27-1.12) p=0.10	Associé à la pCR dans le sous groupe RE+ <b>Génotype GG favorable</b> associé a davantage de pCR 19.6% GG 4.2% AG 0% AA GG vs <b>AG-AA</b> OR :0.17 (0.02-1.44) p =0.049	Nombreuses études sur les CYP2D6 et ses variants A titre d'exemple en population caucasienne Etudes positives retrouvant une association <i>Goetz et al</i> , 2006 (n=180) (237) Patientes caucasiennes *4/*4 vs (wt/*4-wt/wt)  PFS : RR : 1.60(1.06-2.43) p=0.02 7 Pas d'effet sur la survie globale	<i>Schroth et al</i> , 2007 (n=206) (229) Patientes caucasiennes Métaboliseur normal vs (Nulle+intermédiaire +hétérozygote+métaboliseur normal) PFS : HR : 1.89 (1.10-1.25),p=0.02. Pas d'effet sur la survie globale

**Tableau 39.** Comparaison de l'effet des SNP sur la MFS à la partie néoadjuvante et aux données de la littérature ds la population n°1.

### **Au Total.**

L'analyse multivariée a combiné uniquement les SNP (aucun paramètre clinicopathologique pronostique significatif en univarié) et donne la valeur de poids sur la survie sans récurrence métastatique (MFS) de chacun des SNP.

Ainsi, chaque SNP est associé à risque de rechute métastatique compris globalement entre de 2-3 (**tableau 19**). En effet, pour NOS3 rs1799983, en cas de génotype GG-GT, le HR de rechute métastatique est multiplié d'un facteur 3.11 (1.33-7.27)  $p=0.009$ , pour CYP2B6-rs2279345 génotype TT, le HR est multiplié par 2.38(1.05-5.41)  $p=0.038$ , pour BRCA1-rs799917 génotype CC-TT, le HR est multiplié par 2.21(1.01-4.85)  $p=0.047$  et pour CYP2D6 rs 3892097 génotype AG, le HR est multiplié par un facteur 2.14(1.04-4.40) $p=0.039$ .

Le modèle pronostique (**figure 52**) ainsi élaboré sur la base de cette analyse multivariée est intéressant dans le sens où il montre que la combinaison de SNP défavorables peut augmenter le risque de rechute métastatique **jusqu'à un facteur 10** en cas de présence de 3 à 4 de ces génotypes dits « défavorables ». Ainsi, en cas de présence de 3-4 génotypes « défavorables » de SNP ( $n=41$ ), le taux de survie à 2 ans est de 92.68% versus 100% si aucun de ces génotypes n'est présent ( $n=40$ ) soit un risque de rechute métastatique multiplié par 10.25(1.29-81.31).

Ce modèle suggère que les SNP sont plus intéressants en analyse combinée sur le pronostic car c'est bien le **cumul de SNP défavorables** qui impacte sur l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante. Dans la première analyse de cette étude GENEOM portant sur la population néoadjuvante, nous avons déjà démontré notamment dans la population traitée par FEC100-Docetaxel que la combinaison de SNP favorables, en l'occurrence de deux SNP, CYP1B1 et BRCA1 était capable de doubler le taux de pCR, passant de 21.2% dans l'ensemble de la population versus 50% de pCR chez les patientes avec des génotypes favorables (ERCC1 CT et CYP1B1-CC), soit un OR : 8.5 (1.6-46)  $p=0.013$ . L'obtention d'une pCR est un élément essentiel du pronostic, dont on sait le lien avec la survie.

Ce modèle, bien que encore non applicable en routine, met en exergue le rôle fondamental et jusqu'alors non pris en compte, de la pharmacogénomique dans la capacité de réponse à la chimiothérapie adjuvante, et in fine de son impact sur le pronostic. Au delà paramètres pronostiques tumoraux, les paramètres pharmacogénomiques de l'hôte apparaissent être des éléments fondamentaux pour aider dans les indications de chimiothérapies adjuvantes mais surtout pour la sélection éventuelle des protocoles de chimiothérapie adjuvante dans le cancer du sein.

### **B. Population n°2 traitée par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab.**

La principale limite pour cette 2<sup>ème</sup> population de l'étude concerne le nombre d'évènements, de 10 évènements pour la PFS et de 8 pour la MFS, ceci ne permettant pas dans le 2<sup>ème</sup> cas, d'envisager une analyse statistique de SNP associés à la MFS (nombre d'évènement <10) mais uniquement pour la PFS.

**L'analyse des résultats est donc sous réserve, au vu du nombre d'évènements limités et n'a portée que sur la PFS.**

Seulement 4 SNP sur les 46 qui ont pu être analysés sur la population n°2 traitée par FEC100-Docetaxel sont associés à la survie sans récurrence, toutes récurrences confondues. Sur ces 4 SNP retrouvés associés à la PFS dans cette population n°2 traité en plus par Trastuzumab, seul CYB2B6 rs 2279345 était aussi retrouvé dans la population n°1, mais associé à la MFS et pour des combinaisons de génotypes différents. C'est également le seul SNP qui est était retrouvé associé à la pCR dans la population néoadjuvante. Il s'agit du seul SNP retrouvé commun dans les deux populations adjuvantes néoadjuvante de l'étude GENEOM.

**Aucun des deux SNP en rapport avec HER2 et l'utilisation du Trastuzumab a été retrouvé associé à la PFS dans cette population n°2.**

**La comparaison des résultats obtenus de l'effet des génotypes des SNP sur la PFS aux résultats antérieurs sur la partie néoadjuvante de l'étude et avec les données de la littérature est résumée dans le tableau 40.**

**CYP2B6-rs2279345.**

En effet, dans notre étude GENEOM adjuvant, pour le variant, CYP2B6-rs2279345, il a été constaté une différence statistiquement significative entre les 3 génotypes possibles CC vs CT vs TT ( $p=0.04$ ) et en cas de génotype **CT versus CC-TT**, il est retrouvé un **HR de rechute à 5.73 (1.22-27)**,  $p$  value 0.01, en défaveur du génotype hétérozygote. De plus, le génotype avec le double allèle variant CC homozygote versus CT-TT est quant à lui retrouvé plutôt « favorable » avec une réduction du risque de rechute : CC vs CT-TT HR 0.14 (0.02-1.14)  $p=0.03$ . Cependant l'interprétation reste sous réserve en raison de l'inclusion de la valeur 1 dans l'intervalle de confiance de cet HR. La présence des allèles CC est donc plus favorable sur la PFS, tandis que la présence d'au moins un allèle T, soit CT défavorable.

Ce même cytochrome a été retrouvé associé à la survie sans récurrence métastatique et non la PFS dans la population n°1 uniquement traitée par FEC 100-Docetaxel. Le génotype alors considéré défavorable n'était pas ici le génotype hétérozygote CT (population n°2) mais TT (population n°1) statistiquement significatif avec l'allèle sauvage à l'état homozygote **TT pour un HR de rechute métastatique à 2.29 (1.02-5.13)  $p=0.04$** .

Comme nous l'avons explicité dans la discussion relative à ce SNP dans la population n°1, l'allèle T correspond à l'allèle sauvage pour ce SNP tandis que l'allèle C au variant, avec moins de forme hydroxylée en cas de variant, donc théoriquement moins de forme active de cyclophosphamide. **Le génotype TT avec « l'allèle sauvage », bien qu'associé biologiquement à une activation « normale » ou « subnormale » du cyclophosphamide est associé en néoadjuvant à une moindre pCR (0%TT), en adjuvant à une augmentation du risque de rechute métastatique dans la population n°1 et semble donc plutôt délétère. Ici nous retrouvons un effet délétère du génotype CT donc de la présence d'au moins un allèle T. Dans les deux populations, la présence d'un allèle T (population n°2) ou de deux allèles (population n°1) est associée à une moindre survie (PFS) et (MFS) respectivement.**

**Il semblait difficile d'expliquer biologiquement cette « relation inverse »** dans la mesure ou de façon logique et cohérente, si le génotype TT est associé à la présence en quantité normale ou normale haute de la forme active de CPA vs les CT ou CC, il devrait être associé à davantage d'efficacité et donc de meilleures données de survie. Les hypothèses évoquées et discutées antérieurement pour la population n°1 sont celles de la toxicité, notamment hématologique. Les autres explications que nous avons déjà avancées sont celles d'une efficacité identique du CPA chez les CC ou CT par métabolisation du CPA en forme hydroxylée par les autres cytochromes (CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5) permettant une hydroxylation certes diminuée du CPA, mais suffisante pour que la chimiothérapie soit « efficace ». Enfin, ces patientes peuvent être porteuses de SNP sur d'autres cytochromes intervenant dans le métabolisme du cyclophosphamide, augmentant leur efficacité, avec finalement un niveau équivalent voire augmenté de forme active de CPA.

### **MTHFR-rs1801133.**

**Dans notre étude GENEOM adjuvant,** pour le variant MTHFR-rs1801133, 677 C>T, il a été constaté une différence statistiquement significative en cas de génotype CT vs CC-TT avec un HR en défaveur du génotype hétérozygote HR : 4.61(0.98-21.7), 1 étant dans l'intervalle de confiance  $p=0.03$ . Dans ce modèle, l'allèle sauvage est l'allèle C et l'allèle variant l'allèle T. La deuxième comparaison statistiquement significative est le génotype CC retrouvé « favorable » avec un HR de rechute de 0.16 (0.02-1.27)  $p=0.05$ , 1 étant également compris dans l'intervalle de confiance, vs les génotypes CT-TT. Les deux analyses sont sous réserve étant donné l'inclusion de la valeur 1 dans l'intervalle de confiance du HR.

Ainsi dans cette analyse, le génotype « sauvage » CC semble plutôt « favorable » tandis que la présence d'un allèle T à l'état hétérozygote CT plutôt « défavorable ».

Concernant la répartition des génotypes, nous avons observé peu de variants à l'état homozygote TT (13.2%) mais une majorité de génotypes sauvages CC (39.6%) ou hétérozygote CT (47.2%). Cette distribution rejoint celle de l'étude de *Custodio et al* portant sur les SNP dans le cancer du colon avec dans cette étude sur une population espagnole la répartition suivante des génotypes en poolant les deux cohortes : 42.27% CC, 40.11% CT et 12.14% TT et 4.49% indéterminé(243).

**Sur le plan biologique**, MTHFR est une enzyme clef qui régule les niveaux intracellulaires de folates. Elle médie la conversion irréversible du 5,10 méthylènetetrahydrofolate (CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>) en 5-méthyltetrahydrofolate (CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub>). La balance entre le CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub> est essentielle dans la cytotoxicité induite par le 5FU. En effet, le 5FU exerce son activité en partie en inhibant la Thymidylate synthase (TYMS) par formation d'un complexe tertiaire composée : 5FU-TYMS-CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>. Deux SNP de la MTHFR dont rs1801133 677C>T et rs1801131 1298A>C sont associés à une diminution d'activité de la MTHFR, donc une augmentation de CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub> disponible pour le complexe tertiaire formé avec le 5FU. Ainsi, pour le SNP rs 1801133 677C>T, on sait que les patients hétérozygotes CT ont une activité enzymatique de MTHFR de 65% par rapport aux patients de génotypes sauvages CC, les homozygotes TT ont une activité de la MTHFR de l'ordre de 30%.

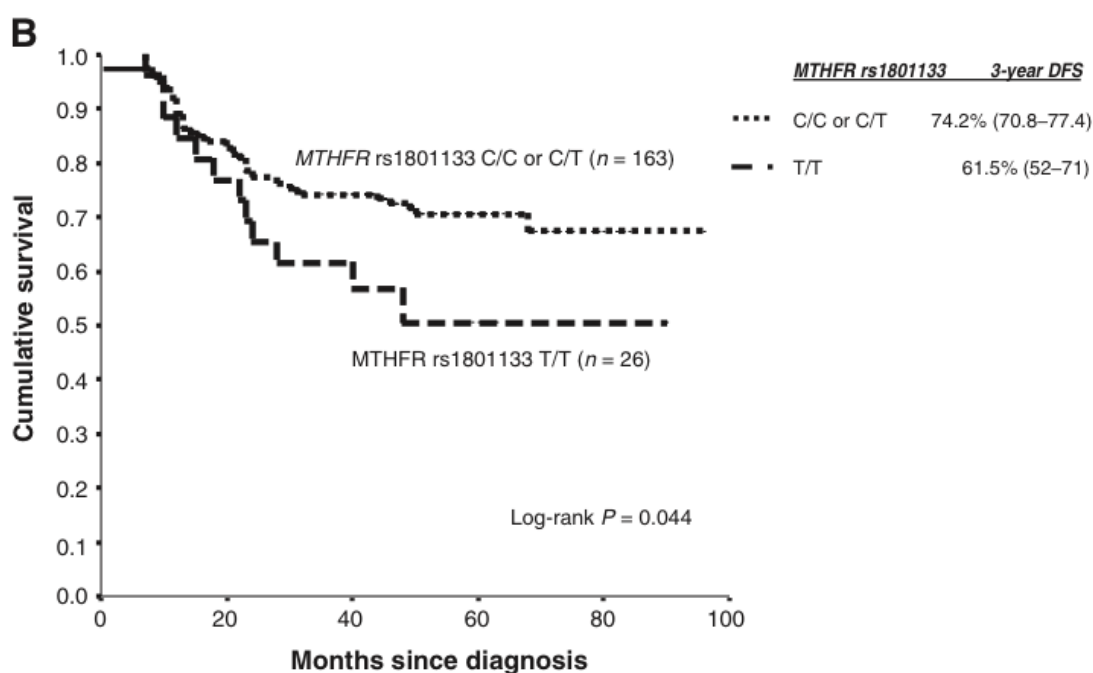
Le génotype TT par diminution de l'activité de MTHFR est ainsi associé à des niveaux plasmatiques de folates plus bas, avec l'hypothèse suite aux études in vitro (CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub> augmenté et donc également le complexe 5FU-TYMS-CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>) qu'il en résulte une augmentation de la sensibilité au traitement par 5FU chez ces patients avec un variant T, mais aussi de la toxicité. Cependant, les études cliniques sur l'association de ce SNP, avec les données sur la survie et l'efficacité de la chimiothérapie, essentiellement menées dans le cadre du cancer du colon sont contradictoires.

Ainsi, certains auteurs retrouvent aucune influence de ce génotype TT, d'autres un effet négatif sur la survie et d'autres un effet positif sur la survie des patients recevant un traitement à base de 5FU (étayant le modèle biologique) (243). Les résultats concernant l'effet de ce SNP sont donc discordants dans la littérature, s'expliquant par des études portant sur des régimes de chimiothérapie différents, sur des échantillons de taille limitée et l'absence de validation des résultats dans des cohortes indépendantes.

*Custodio et al* ont ainsi étudié l'effet de SNP de gènes impliqués entre autres dans le métabolisme du 5FU et l'oxaliplatine (total de 67 SNP de 32 gènes) sur une série de patients atteints de cancer du colon de stade II ou III et recevant une chimiothérapie adjuvante par 12 cures de FOLFOX ou 8 CAPOX (243). Les analyses ont été effectuées sur deux cohortes, une d'évaluation (n=202) et une indépendante de

validation (n=177). Dans cette étude espagnole, 2 SNP, dont **MTHFR-rs1801133 génotype TT** sont retrouvés associés à une augmentation du risque de récurrence dans les 2 cohortes, en analyse uni et multivariée, et retrouvés associés à la survie globale en modèle combinée.

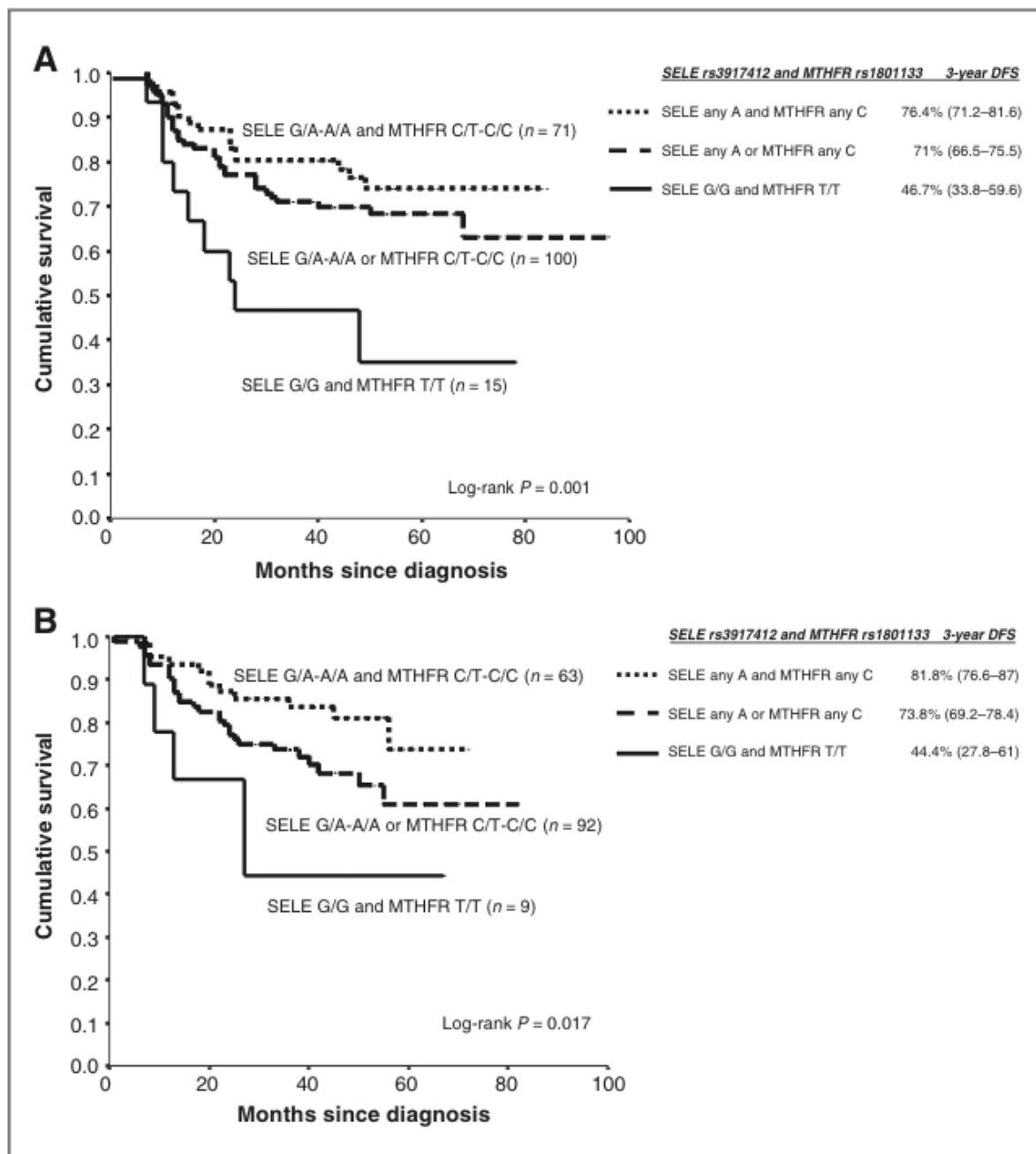
Ainsi, en analyse univariée, dans la cohorte d'évaluation, pour MTHFR, en cas de génotype TT, la DFS à 3 ans est de 61.5% vs 74.2% en cas de génotype CT-CC,  $p=0.044$ , HR : 1.924 IC95%(1.019-3.634) (**figure 75**).



**Figure 75.** Courbes de survie sans progression (PFS) dans la cohorte d'évaluation des patients atteints de cancers colorectaux de stade II-III et traités par chimiothérapie adjuvante à base de 5FU et Oxaliplatine (243).

En analyse multivariée, avec les autres paramètres pronostiques connus du cancer du colon, en combinant les génotypes défavorables des 2 SNP, **MTHFR-rs1801133 TT** et le 2<sup>ème</sup> SNP identifié, **SELE-rs 3917412 GG**, le RR de rechute de 4.103 (IC 95%1.803-9.334,  $p=0.001$  dans la cohorte d'évaluation et de 3.567 IC 95%1.253-10.151,  $p=0.017$  dans la cohorte de validation avec des taux de PFS qui diffèrent nettement en fonction du nombre d'allèle et du nombre de SNP défavorable (**figure 76**).





**Figure 76.** Courbes de survie sans progression (PFS) dans la cohorte d'évaluation en haut et de validation en bas des patients atteints de cancers colorectaux de stade II-III et traités par chimiothérapie adjuvante à base de 5FU et Oxaliplatine (243).

De plus et de façon intéressante, ces 2 SNP impactent sur la rechute mais aussi la survie globale avec des HR respectifs (cohorte d'évaluation/validation) de RR : 3.388 (0.988-11.623) p=0.052 et RR : 3.929 (1.144-13.485) p=0.028.

Ainsi, cette étude retrouve un effet délétère du génotype variant TT de MTHFR sur la PFS et la survie globale (OS) (diminution de l'activité biologique MTHFR), allant plutôt dans le sens contraire des « résultats in vitro » qui retrouvent en cas de diminution de l'activité de la MTHFR une potentialisation de l'effet du 5FU, même si les résultats in vitro ne peuvent être comparés aux résultats cliniques (autres cofacteurs intervenants dans le niveau de CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>).

**Dans notre étude,** nous avons retrouvé 2 comparaisons significatives avec le génotype sauvage CC semble plutôt favorable, tandis que la présence d'un allèle T à l'état hétérozygote CT plutôt défavorable, les deux p values étant significatives mais la valeur 1 étant comprise dans les deux intervalles de confiance de l'HR. Nous n'avons pas de résultats statistiquement significatifs pour le génotype TT. La présence d'au moins un allèle T est défavorable sur la survie sans rechute, et ce résultat semble au moins cohérent avec l'étude de *Custodio et al*, (allèle T mais à l'état homozygote TT). Cependant, dans l'étude de *Custodio et al*, il s'agissait de cancer du colon et non de cancer du sein.

Une autre étude, toujours espagnole, menée par *Henriquez-Hernandez et al* a étudié spécifiquement ce polymorphisme **MTHFR-rs1801133** avec d'autres SNP (TYMS, P53, MDR1) dans une population de patientes atteintes de cancers du sein et traitées par chimiothérapie néoadjuvante à base de 5FU et de cyclophosphamide. Cette étude a porté sur les données de toxicité et non pas d'efficacité. Sur 50 patientes, le SNP de MTHFR-rs1801133 a été retrouvé associé à une surtoxicité avec en analyse multivariée ajustée (âge, BMI, stade, traitement, statut ménopausique) en cas de présence d'un seul allèle T, soit les **génotypes CT ou TT versus CC. un HR de réactions toxiques de 7.1(1.4-36.1) p=0.018** (244). Ainsi, cette étude confirme, par rapport à d'autres études antérieures (leucémies, cancer colorectal métastatique traité par FOLFOX ou capecitabine, mais aussi cancer du sein) que le variant MTHFR 677C>T est associé à une augmentation du risque de leucopénie, de toxicité gastro-intestinale et hépatique. Dans le cadre du cancer du sein, une étude a retrouvé cette association entre toxicité aiguë sévère de la chimiothérapie par CMF et le génotype TT (245). Comme nous l'avons suggéré dans la discussion avec les autres SNP, nous n'avons pas intégré au recueil de données,

les paramètres de toxicité. Dans notre étude, il aurait été intéressant de savoir si les patientes avec le génotype TT (14 patientes) ou CT (50 patientes) ont davantage de toxicités, qui puissent expliquer que le génotype CT soit plutôt défavorable et le CC favorable.

De plus, de façon plus globale, les limites pour analyser ce SNP sont liées au faible nombre d'évènements, aux résultats discordants dans la littérature, l'absence des données de toxicité, pouvant orienter également pour l'interprétation.

D'autre part, les variations dans les combinaisons génétiques et la possible interdépendance avec d'autres enzymes peuvent impacter sur les données de survie et donner lieu ainsi à ces résultats discordants.

Ceci explique la difficulté d'utiliser les SNP comme marqueur prédictif pour obtenir des résultats à la fois reproductibles et uniformes, notamment en contexte adjuvant.

**Les 2 SNP suivants sont présentés dans la discussion mais sont d'intérêt limité, en raison du très faible nombre de patientes avec le génotype TT (n=6) pour ABCC4 rs9561778 et GG (n=1) pour CES2- rs11075646 n'ayant pas permis de les inclure dans l'analyse multivariée finale. De plus, l'équilibre de HW n'étant pas respecté, ceux ci ne sont ininterprétables.**

### **ABCC4-rs9561778**

En effet, dans notre étude GENEOM adjuvant, pour le variant, **ABCC4-rs9561778**, il a été constaté une différence statistiquement significative en cas de génotype **GG versus GT-TT** il est retrouvé un **HR de rechute à 7.55 (0.96-59.61)**, p value=0.02, en défaveur du génotype homozygote GG. Cependant, deux limites principales pour cette interprétation, le faible nombre de patientes de génotype TT (n=6 soit 5.7%) et la présence de la valeur 1 dans l'intervalle de confiance du HR. De plus, le génotype avec un allèle variant GT versus TT-GG semble plutôt « favorable » avec une tendance (p non significatif) à une réduction du risque de rechute : GT vs GG-TT HR 0.17 (0.02-1.34), p=0.06.

**Sur le plan biologique**, ABCC4 est un membre de la famille des transporteurs membranaires ABC. Il est décrit comme intervenant également dans le métabolisme du cyclophosphamide et de ses métabolites, notamment sur le plan de l'élimination urinaire. En effet, ABCC4 est exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme, notamment au niveau rénal. Des études antérieures ont démontré que l'expression d'ABCC4 au niveau rénal semble jouer un rôle important pour l'élimination du CPA et de ses métabolites, en tant que pompe d'efflux, permettant son excrétion rénale. (246) (247).

Des variants de type SNP affectant qualitativement ou quantitativement ce transporteur peuvent ainsi altérer l'excrétion rénale de la drogue, entraînant des sur toxicités. Ainsi, le variant ABCC4-rs9561778 va altérer le niveau d'expression de ABCC4, entraînant une diminution de la clairance urinaire du CPA, et donc une augmentation de la concentration de CPA et par conséquent une toxicité plus importante au CPA. Dans ce modèle de variant, l'allèle « sauvage » est l'allèle G et l'allèle variant « l'allèle T ».

Ainsi, une étude Japonaise, menée par *Low et al*, s'est intéressée au SNP de ce transporteur ABCC4, spécifiquement dans le cadre du cancer du sein. Il a été étudié avec d'autres SNP avec pour objectif de faire émerger des marqueurs prédictifs de la toxicité au CPA (248). Sous la forme d'une étude cas contrôle de 403 patientes atteintes de cancer du sein, recevant une chimiothérapie combinée avec du CPA, 143 SNP ont été génotypés sur 13 gènes candidats impliqués dans le métabolisme, le transport, l'activation du CPA (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, ALDH1A1, ALDH3A1, GSTA1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, **ABCC2 et ABCC4**).

Cette étude a été menée sur le principe d'une étude cas contrôle en comparant le génotype des patientes avec une toxicité hématologique granulocytaire de grade  $\geq 3$  ou gastro-intestinale de grade  $\geq 2$  (n=184) vs celui des patientes sans toxicités (n=219). Parmi ces SNP, seul un SNP, ABCC4-rs9561778 est associé de façon statistiquement significative à la toxicité induite par le cyclophosphamide en cas de la présence d'au moins un **allèle variant T. soit les génotypes GT ou TT** (OR :2.06, p=0.00031), en particulier en analyse de sous groupes, avec la toxicité gastro-intestinale (OR : 2.31, p=0.00019) et hématologique (OR :1.83, P=0.014).

De plus, l'association avec la toxicité est en particulier retrouvée pour le protocole FAC, OR : 3.13,  $p=0.00028$ .

Cependant, il s'agit d'une étude de toxicité, sans aucune donnée d'efficacité. Une diminution de la clairance du CPA et donc plus de forme active a-t-elle une conséquence en terme d'efficacité, soit augmentée par majoration de la concentration sanguine du CPA ? ou à l'inverse n'existe-t-il pas une surtoxicité, à l'image de SLCO1B3 pour le Docetaxel et CYP2B6 pour le CPA dans la population n°1, qui entraînerait finalement une moindre efficacité de la chimiothérapie ?

Une étude récente publiée en Février 2015 par *Islam et al* dans *Tumor biology* s'est intéressée spécifiquement à ce variant de ABCC4 rs9561778 avec une autre enzyme de détoxification du CPA, la glutathione S-transférase, GSTP1 rs1695 dans une population de 256 patientes atteintes de cancer du sein et traitées par chimiothérapie néoadjuvante (n=117) ou adjuvante (n=139), ceci afin d'évaluer la réponse (néoadjuvant), et la toxicité (néoadjuvant et adjuvant) au traitement en fonction des génotypes des SNP (249). La chimiothérapie était le protocole FEC et la population d'étude issue du Bangladesh. Cette étude, en terme de toxicité, a retrouvé, cet surtoxicité en présence de l'allèle T à l'état homozygote ou hétérozygote. En effet, les patientes porteuses du génotype **GT-TT présentent une toxicité** hématologique avec une anémie majorée avec un HR à 2.10 (1.18-3.74)  $p=0.012$ , plus de neutropénie HR 2.44 (1.35-4.40)  $p$  value=0.003, de leucopénie HR 2.28 (1.23-4.22)  $p=0.009$  et de toxicités gastro-intestinales 2.62 (1.22-5.59)  $p=0.013$ , comparativement au génotype GG.

**Sur le plan de l'efficacité au traitement, aucune association statistiquement significative de ce variant n'a été retrouvé associé à la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante à base de FEC.**

Les données actuelles de la littérature concernant l'effet de ce polymorphisme en terme d'efficacité du traitement sont donc limitées, et sont essentiellement associés à une surtoxicité hématologique et gastro-intestinale en cas de présence d'au moins un allèle T.

**Dans notre étude GENEOM adjuvant**, c'est le génotype GG donc la présence de l'allèle « sauvage », à l'état homozygote avec une clairance normale du CPA, qui est associé à une augmentation du risque de rechute. Nous ne retrouvons pas d'association significative pour le génotype « variant » soit GT ou TT, qui par augmentation de la concentration plasmatique du CPA pourrait être associé à plus d'efficacité de la chimiothérapie.

Cependant, le génotype TT est peu fréquent (5.7%) et donc la comparaison n'est pas possible. Cependant, même si non significatif puisque à  $p=0.06$ , on note néanmoins que 37.7% des patients GT ont un HR de rechute plutôt inférieur à 1, avec un HR : 0.17 (0.02-1.34) donc potentiellement avec un effet positif d'une augmentation du CPA sanguin par diminution de sa clairance sur l'efficacité de la chimiothérapie. Ainsi une augmentation du CPA sanguin pourrait entraîner plus d'efficacité de la chimiothérapie adjuvante à base de CPA. Cependant, comme mentionné en début de discussion, la limite principale pour interpréter ce SNP est le nombre de patientes avec l'allèle variant à l'état homozygote TT (5.7%) versus 94.3% de génotype avec l'allèle « sauvage G » soit GT 37.7% et GG 56.6%.

De plus, il n'existe pas de données actuelles dans la littérature en terme de retentissement de ce SNP sur l'efficacité de la chimiothérapie. Ce SNP n'avait pas été retrouvé associé avec la pCR dans la partie néoadjuvante de l'étude.

**Le résultat que nous avons est donc à prendre avec une très grande précaution et son impact quasi nulle.**

#### **CES2-rs11075646.**

En effet, dans notre étude **GENEOM adjuvant**, pour le variant, **CES2-rs11075646**, il a été constaté une différence statistiquement significative entre les trois génotypes possibles, CC vs CG vs GG  $p= 0.01$ , et en cas **de génotype GG vs CC-CG**, il est retrouvé un **HR de rechute favorable à 0.58 (0.07-4.57)**.  $p$  value 0.003, faisant du génotype homozygote GG un « génotype favorable ». Cependant, même si la  $p$  value est  $>0.05$ , la valeur 1 se situe dans l'intervalle de confiance, et

l'interprétation reste donc sous caution. Surtout, l'interprétation doit rester d'autant plus prudente que 1 seule patiente présente ce génotype GG (<1%), la majorité des patientes de la cohortes sont en effet double homozygote CC (82.1%) ou avec un allèle variant (17%), ce qui est concordant avec la répartition habituelle des génotypes dans une population caucasienne.

Pour cette raison, la valeur de cette comparaison des génotypes avec la survie sans récurrence est limitée et n'a d'ailleurs pas été intégrée à l'analyse multivariée.

**De surcroît, la valeur de ce SNP impliqué dans le métabolisme de la capecitabine, non utilisée en adjuvant mais en contexte métastatique, rend nulle la valeur de ce SNP retrouvé dans la population n°2 qui reçoit du 5FU IV et non la prodrogue orale du 5FU, la capecitabine.**

**En effet, sur le plan biologique**, CES2 ou la carboxylesterase 2, est une enzyme qui intervient dans le métabolisme d'une prodrogue orale du 5FU, la capecitabine. En effet, la première transformation métabolique de la capecitabine est assurée par la carboxylesterase 2 en 5'dFCR puis en 5'dFUR par la cytidine déaminase et ensuite en 5FU final par d'autres enzymes (Thymidine phosphorylase, TYMP, uridine phosphorylase UPP1, UPP2) (Cf schéma introduction du métabolisme du 5FU).

Nous avons sélectionné ce SNP suite à l'étude de *Ribelles et al.* En effet, cette étude a analysé de façon prospective le lien entre efficacité et toxicité de la capecitabine et 14 SNP dans les gènes d'enzymes intervenant spécifiquement dans le métabolisme du 5FU (CES2), Cytidine déaminase ou (CDD), thymidine synthase (TYMS), et dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) sur 136 patients atteints de cancers du sein ou du colon et recevant de la chimiothérapie par capecitabine. *Ribelles et al* ont ainsi retrouvé une association entre un polymorphisme de CES2, en 5'UTR 823 C/G ou **rs11075646**, et la réponse au traitement. Dans ce modèle, l'allèle « sauvage » est l'allèle C et l'allèle variant l'allèle G. Les patients avec au moins un allèle variant, soit le génotype **CG ou GG ont un taux de réponse** significativement plus important de 59% vs 32%,  $p=0.015$ , ainsi qu'un temps jusqu'à progression de la maladie plus long (8.7 mois vs 5.3 mois)  $p=0.014$  (209).

Une étude plus récente, publiée en février 2015 dans *The Oncologist* par *Martin et al*, a retrouvé une association de ce SNP avec la toxicité de la capecitabine sur 195 patientes atteintes de cancer du sein métastatiques HER2-, traitée par Capecitabine (250). En effet, il est retrouvé une association de ce variant **rs11075646** avec l'intensité du syndrome mains pieds induits par la capecitabine. L'allèle G de rs11075646 (59UTR 823 C/G) de CES2 a été retrouvé associé à une augmentation du risque de syndrome mains pied de grade III-IV pour un OR à 4.49 (1.43-14.14) p value 0.01.

Ainsi en cas de chimiothérapie par capecitabine, la littérature semble indiquer qu' en cas de variant de CES2 **rs11075646**, avec la présence d'un seul allèle G, il en résulte une meilleure efficacité de la chimiothérapie mais aussi davantage de toxicité, notamment cutanée. **Or il s'agit de la capecitabine, dont nous n'avons pas recours dans l'étude, puisque les patientes étaient traitées par FEC100-Docetaxel-Herceptin dans cette population n°2.** Une seule patiente présente le génotype homozygote (<1%) et les hétérozygotes GC sont peu fréquentes également (17%), plus de 80% des patients ayant un génotype sauvage GG. La comparaison des groupes de génotypes, significative sur le plan statistique, est GG vs GC-CC en faveur du génotype « sauvage GG » avec un HR de rechute favorable à 0.58 (0.07-4.57). Elle va donc dans le même sens que les données de l'étude de *Ribelles et al* (effet favorable de l'allèle G), mais pour toutes les raisons citées au préalable (**rareté du génotype GG, non respect de l'équilibre de HW, mais avant tout et surtout une chimiothérapie sans capecitabine mais par FEC100, la présence de la valeur 1 dans l'intervalle de confiance, le nombre très limité d'évènements dans cette population n°2**), aucune conclusion sur ce SNP ne peut être portée, et ce SNP n'a donc pas été intégré au final dans l'analyse multivariée.





<p>2°) CYB2B6</p>	<p>Hydroxylation du cyclophosphamide</p>	<p><b>Cyclophosphamide</b></p>	<p>rs2279345</p>	<p>T</p>	<p>C</p>	<p>Diminution Hydroxylation du CPA  Diminution forme active endoxan</p>	<p><b>POPULATION n°2</b> <b>CT vs <u>CC-TT</u></b> <b>Génotype CT «délétère»</b> HR :5.73(1.22-27) p=0.01 CC vs CT-TT <b>Génotype CC«favorable»</b> HR : 0.14(0.02-1.14) p=0.03</p> <p><b>POPULATION n°1</b> <b>TT vs <u>CC-CT</u></b> <b>Génotype TT « délétère »</b> HR : 2.29 (1.02-5.13) p=0.04</p> <p><b>SURTOXICITÉ ?</b></p>	<p>Associé pCR uniquement Population RE+ pCR 0% TT 8% CC 28% CT</p> <p><b>Génotype TT semble défavorable</b></p> <p><b>CT vs <u>TT-CC</u></b> OR : 5.57 (1.3-24) p=0.016</p> <p><b>au moins un allèle C</b></p> <p><b>tendance à plus de réponse</b></p>	<p>Etude japonaise,(n=103) <i>Nakajima et al, 2006(226)</i> Cancer du sein/Lymphomes Chimiothérapie par cyclophosphamide (500-750mg/m<sup>2</sup>)</p> <p>PHARMACOCINETIQUE et TOXICITÉ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>AUC du 4-OHCPA/CPA diminué pour un allèle C→CC vs TT (p&lt;0.01) et CT vs TT (p&lt;0.01)</li> <li>Toxicité G≥2 100% TT vs 86% CT et 62% si CC</li> </ul> <p><b>Génotype TT « sauvage » et allèle T :</b></p> <p><b>-plus de forme active de CPA</b></p> <p><b>-plus de toxicité hématologique</b></p>
<p>3°) CES2</p>	<p>Transformation de la capecitabine, prodrogue en 5'dFCR pour aboutir au final au 5FU</p>	<p>Capecitabine</p>	<p>rs11075646</p>	<p>C</p>	<p>G</p>	<p>?</p>	<p><b>GG vs <u>CG-CC</u></b> HR 0.58 (0.07-4.57)p=0.003</p> <p><b>Génotype GG double variant favorable</b></p>	<p>Aucune association avec la pCR</p>	<p>Étude espagnole n=136, <i>Ribelles et al, 2008, (209)</i> Cancer du sein/colon avancés <b>EFFICACITÉ</b> Chimiothérapie par Capecitabine <b>Génotype CG-GG vs <u>CC</u></b> Augmentation de la réponse : 59% vs 32% p=0.015 et du temps jusqu'à progression : TTP : 8.7 mois vs 5.3 mois, p=0.014 <b>Au moins un allèle G favorable</b></p> <p>Étude espagnole n= 195, <i>Martin et al, (247)</i> Cancers du sein métastatique, HER2- Chimiothérapie par capecitabine <b>TOXICITE</b> Syndrome Mains pied de grade III-IV associé à la présence d'au moins un allèle G OR : 4.49 (1.43-14.14) p =0.01. <b>Allèle G associé à la toxicité cutanée</b></p>

4°) ABCC4	Transporteur membranaire de la famille ABC  Elimination urinaire du CPA et des ses métabolites	Cyclophosphamide	rs9561778	G	T	-Diminution de la clairance urinaire du CPA  -Augmentation de la concentration sanguine	GG vs <u>GT-TT</u> HR : 7.55(0.96-59.61) p=0.02  <b>Génotype GG défavorable</b>	Non retrouvé associé à la pCR	Etude Japonaise, cas-contrôle n=403 <i>Low et al, 2009 (245)</i>  <b>TOXICITE</b> Cancer du sein Chimiothérapie à base de CPA  <b>GT-TT vs GG</b>  Toxicités : OR :2.06 p=0.00031 Toxicité gastro-intestinale : OR : 2.31 p=0.00019 Toxicité hématologique OR : 1.83 p=0.014  <b>Génotype GT-TT associé à une surtoxicité,</b>  <b>au moins un allèle T</b>	Etude Bangladesh <i>Islam et al, 2015, n=256</i> néoadjuvant, (n=117) et (adjuvant, n=139)  Cancers du sein Chimiothérapie par FEC  <b>TOXICITE</b> <b>GT-TT vs GG</b> Anémie : HR : 2.10(1.8-3.74)p=0.012 Neutropénie : HR : 2.44(1.35-4.40) p=0.003 Leucopénie : HR : 2.28(1.23-4.22) p=0.009 Toxicité gastro-intestinale : HR : 2.62(1.22-5.59) p=0.0013  <b>Génotype GT-TT associé à une surtoxicité, au moins un allèle T</b>  <b>EFFICACITÉ :</b> AUCUNE association avec la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante
--------------	--	------------------	-----------	---	---	---	--	-------------------------------	---	---

**Tableau 40.** Comparaison de l'effet des SNP sur la MFS à la partie néoadjuvante et aux données de la littérature population n°2.

**Au total.**

L'analyse multivariée a combiné sur ces 4 SNP retrouvés associés à la PFS dans cette population n°2, **uniquement CYP2B6 et MTHFR**, les deux autres CES2 et ABCC4 ne pouvant être intégrés à l'analyse au vu du très faible nombre de patients GG (n=1) et TT(n=6) respectivement. De plus ces 2 SNP ne respectent pas la l'équilibre de Hardy Weinberg et ne sont donc pas interprétables.

**Aucun des 2 SNP décrits dans la littérature associés à la réponse au Trastuzumab pour le SNP rs FCGR3A, rs1155763 par *Musolino et al (251)* ou à la cardiotoxicité pour HER2 [Ile655Val] rs1136201, décrit par *Beauclair et al (252)*, n' a été retrouvé associé à la PFS dans l'étude.**

Contrairement à l'analyse multivariée de la population n°1, nous avons intégré les paramètres cliniques et anatomopathologiques statistiquement significatifs en univariée (**âge, RH, stade T, embols tumoraux**). Celle ci reste néanmoins à **interpréter avec une très grande prudence a vu du très faible nombre d'évènements.**

Elle retrouve ainsi qu'une tumeur >T2+ est le seul paramètre clinique associé au risque de rechute, alors multiplié d'un facteur 10.78 (2.12-54.90), et donne surtout la valeur de poids des 2 SNP associés à la survie sans récidence (PFS) dans cette population HER2+, avec un HR de rechute pour CYP2B6 rs2279345, génotype CT de 9.67(1.82-51.28) et pour MTHFR-rs1801133, génotype CT de 5.62 (1.19-26.59)

**(Tableau 33)**

Le modèle pronostique (**Figure 60**) ainsi élaboré sur la base de cette analyse multivariée (interprétation sous caution), est intéressant et donne des pistes dans le sens ou il montre que la combinaison de SNP défavorables peut augmenter le risque de rechute, avec dans ce modèle, l'association en plus de paramètre clinique comme la taille tumorale. Ainsi en cas de présence des 2 SNP « défavorables » et d'une tumeur >T2+, le taux de survie sans rechute chute à 57% à 2 ans versus 100% si aucun de ces paramètres n'est présent. Dans un modèle plus équilibré, en regroupant les patientes de score pronostique 2 et 3 (car très peu de patientes score

3) versus score 1 versus score 0, le taux de survie à 2 ans est ainsi de 92.31% vs 97.44% vs 100% respectivement. Ce modèle suggère que les SNP sont plus intéressants en analyse combinée sur le pronostic, car c'est bien le cumul de SNP défavorables qui impacte sur l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante. De plus, il montre l'intérêt de combiner dans les analyses les paramètres tumoraux et de l'hôte.

Ce modèle, bien que sous **extrême réserve** dans cette population n°2 HER2+, en raison du très faible nombre d'évènements, confirme l'intérêt de la pharmacogénomique dans l'évaluation de la capacité de réponse à la chimiothérapie adjuvante, qui se situe bien au delà des seuls paramètres cliniques, biologiques, anatomopathologiques et moléculaires usuels de la tumeur, mais bien au niveau de l'hôte.

### **III. Limites générales de l'étude GENEOM.**

#### **A. Sélection et choix des SNP étudiés.**

Les SNP qui ont été sélectionnés l'ont été à partir des données déjà publiées dans la littérature à partir d'études ayant démontrées des variations de la réponse à la chimiothérapie à base d'anthracyclines et ou de taxanes (5FU, cyclophosphamide, epirubicine, doxorubicine, Paclitaxel, Docetaxel) ou aux thérapies ciblées anti-VEGF comme le bevacizumab, ou anti-HER2 comme le Trastuzumab.

Les limites principales et les critiques que nous pouvons adresser à cette sélection sont inhérentes aux études à partir desquelles ces SNP ont été sélectionnés.

En effet, celles ci sont le plus souvent rétrospectives, rarement menées dans le cadre de suivi prospectif au long cours et le plus souvent sur de petites séries, dépassant rarement plus de 200 malades. Elles portent souvent sur d'autres types de cancers que le cancer du sein, certes avec les mêmes cytotoxiques, mais avec des protocoles de chimiothérapies différents, à des doses et des rythmicités d'administrations spécifiques. Les critères d'évaluation des conséquences de ces

SNP sont très variables : données de survie sans rechute (PFS), de temps jusqu' à progression (TTP), de survie globale (OS), mais aussi et beaucoup de données de toxicités très variées (hématologique essentiellement, digestive ou cutanée), mais aussi des études de pharmacocinétique et pharmacodynamie. Quand ces études ont été effectuées spécifiquement dans le cadre du cancer du sein, les contextes sont souvent très variables d'une étude à l'autre : contexte néoadjuvant, adjuvant ou métastatique. De plus, de nombreuses études sont effectuées sur des populations asiatiques, et non caucasiennes, avec des répartitions génotypiques parfois complètement différentes, même si, au delà de la répartition des génotypes, le plus important reste la conséquence fonctionnelle. En effet, si un variant est retrouvé fortement associé à la réponse au traitement dans la population asiatique par exemple, le tester sur une population caucasienne, pour qui le génotype variant est rare, n'aura pas en pratique d'intérêt. De plus, la majorité des études, sauf quelques unes, s'intéressent à l'effet d'un variant isolé, mais rarement combiné dans des modèles. Or, on sait l'importance de combiner les génotypes, la pharmacogénomique n'étant pas limitée à un seul système enzymatique, mais à un ensemble beaucoup plus complexe d'interaction de transporteurs, d'enzymes, pour aboutir au final à cette variation interindividuelle dans la réponse au traitement. Certains SNP ont été sélectionnés, comme CES2, pour des drogues non pas utilisées en contexte adjuvant, mais en contexte métastatique, puisque cette étude GENEOM s'adressait initialement à trois contextes possibles de chimiothérapie : adjuvant, néoadjuvant et métastatique. De la même manière, comme l'effet de l'hormonothérapie était étudié pour la partie métastatique de l'étude, le CYP2D6 a été sélectionné pour être évalué et ressort associé aux résultats du traitement cytotoxique. Enfin, pour certains SNP sélectionnés, les conséquences en terme de fonction du variant ne sont pas toujours connues à l'heure actuelle, et les résultats des études parfois complètement discordants.

**Ainsi, tous ces éléments constituent de nombreux facteurs de confusion et biais potentiels pour l'interprétation des résultats de l'étude.**

Enfin, l'analyse porte sur 46 variants, ce qui apparaît être un effort important mais qui au final reste limité, en raison de la multitude des enzymes et transporteurs impliqués dans le métabolisme des cytotoxiques, ainsi que des nombreux variants potentiels

possibles pour ceux ci. En effet, nous avons retenu les SNP décrits pour certains gènes, mais de nombreux autres SNP du même gène ou autres gènes n'ont pas été pris en compte. Ainsi, l'interprétation doit rester prudente, et il faut garder à l'esprit la complexité de la pharmacogénomique et la multitude d'interaction possible entre les variants.

## **B. Recul de l'étude et nombre d'évènements.**

L'objectif et critère principal de l'étude en contexte adjuvant étaient la PFS à 5 ans. Le problème principal pour notre travail a été celui du recul pour le suivi des patientes, et en conséquence, du nombre d'évènements suffisants (rechute/décès) pour permettre une bonne analyse statistique.

La première inclusion en contexte adjuvant a eu lieu en janvier 2008, la dernière en janvier 2012, avec donc un recul le plus court à environ 3 ans. Dans cette étude, deux cohortes de patientes étaient incluses, une rétrospective, après la chimiothérapie adjuvante au décours de la surveillance ou au moment de la récurrence (n=70), et une cohorte prospective (n=428) pendant la réalisation de la chimiothérapie adjuvante. Ainsi, le suivi de ces patientes est court, puisque l'essentiel de la cohorte est prospective. Le suivi médian dans la population n°1 est de 3.1 ans (3.3-3.5) et de 4 ans (3.3-4.5) dans la population n°2. Le recul n'est donc pas suffisant.

De plus, il existe de nombreuses de données de suivies censurées, c'est à dire pour laquelle nous ne disposons pas d'informations relatives au statut médical (rechute : oui/non) et vital (en vie ou décédée), lors de la dernière actualisation des données de suivi effectuées le 12 novembre 2014. A titre d'exemple, dans la population n°1, nous avons une information sur les données PFS à 5 ans pour seulement 46 des 309 patientes et pour la population n°2, pour 28 des 109 malades.

Le nombre d'évènements (progression/ décès/ seconds cancers) est en conséquent faible de 44/309 (14.2%) pour la population n°1 et de 15/109 (13.8%) dans la population n°2.

Ceci a pour conséquence de devoir prendre en compte les résultats des SNP prédictifs avec très une grande prudence et sous réserve pour la population traitée par FEC100-Docetaxel-Trastuzumab. Il n'a pas été possible de réaliser l'analyse pour la MFS spécifiquement dans cette population (8 événements métastatiques), ce qui aurait été intéressant puisque dans la population n°1, davantage de SNP étaient spécifiquement associés à la MFS, qui apparaît être un critère plus approprié pour évaluer le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante. Ceci représente la limite et la critique principale de notre étude, les événements n'ayant pas encore eu lieu.

Il sera intéressant de refaire l'analyse statistique avec un recul plus prolongé, afin de vérifier si les résultats obtenus dans cette analyse préliminaire perdurent dans le temps mais également si d'autres SNP n'émergent pas comme marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie adjuvante.

### **C. Design de l'étude et paramètres du recueil de données.**

#### **Données manquantes.**

Nous avons constaté, lors de l'analyse et la discussion des résultats, la difficulté à interpréter des résultats parfois discordants avec les données de la littérature. Pour certains SNP, il aurait été intéressant de connaître les données de toxicité, afin de savoir si certains de ces SNP, même si associés théoriquement et biologiquement à plus de forme active de cytotoxiques, du fait de la surtoxicité, notamment hématologique, ne sont pas in fine plus délétère. Les données de réduction de doses et ou de report de cure donnant la dose intensité relative ou RDI, comme les données de toxicité (gastro-intestinale, cutanée) auraient été intéressantes à analyser dans cette étude pour corréliser aux études de toxicité, parfois plus nombreuses que celles portant sur l'efficacité.

#### **Critère de jugement de l'étude.**

Sur le critère de jugement de l'étude, la PFS à 5 ans, il s'agit d'un critère largement éprouvé pour évaluer le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante, notamment dans le cadre du cancer du sein. Cependant, il s'agit d'un critère soumis à l'influence de



nombreux autres paramètres par rapport au critère « réponse pathologique complète » (pCR) utilisé en néoadjuvant, qui reflète quant à elle, la réponse « pure et directe » de la tumeur aux cytotoxiques.

La PFS est assujettie à de nombreuses influences et ne traduit pas directement l'effet des SNP impliqués dans le métabolisme des cytotoxiques. En effet, contrairement à la pCR, elle est aussi impactée par la radiothérapie, l'hormonothérapie adjuvante, rendant plus difficile l'interprétation des SNP associées à la réponse à la chimiothérapie adjuvante.

C'est d'ailleurs pour cette raison que la survie sans récurrence métastatique (MFS) nous est apparue plus licite, et à d'ailleurs révélé davantage de SNP associés à la réponse à la chimiothérapie. Surtout il s'agit d'un critère soumis à la variable temps, qui n'est pas un paramètre fixe comme le taux de pCR et qui nécessite un suivi et un recul suffisant pour pouvoir faire émerger d'éventuel SNP candidats associés à celle-ci. Nous avons également fait l'analyse statistique en recherchant non pas des SNP associées à la PFS/MFS en terme de délai à la rechute, mais en terme de taux de rechutes, en comparant les patientes ayant rechutées versus celles indemnes de progression tumorale. Dans ce modèle statistique que nous avons pas présenté ici, les même SNP ont été mis en évidence sans différence entre les deux modèles. Le critère de jugement étant la PFS, nous avons gardé ce premier modèle qui en plus d'intégrer le paramètre progression, inclut la variable temps et délai à la rechute.

Ainsi, même si la PFS apparaît être un critère moins pur que la pCR avec ses limites intrinsèques, il s'agit du paramètre le plus utilisé et validé en pratique courante pour évaluer le bénéfice d'un traitement adjuvant.

## CONCLUSION

La chimiothérapie adjuvante est un standard dans la prise en charge du cancer du sein de la femme. Les progrès effectués ces dernières décennies jusqu'à l'avènement du schéma séquentiel anthracyclines-taxanes ont permis de réduire la mortalité par cancer du sein à 10 ans de 1/3. Les critères décisionnels cliniques, anatomopathologiques, biologiques et plus récemment moléculaires sont encore souvent insuffisants pour statuer sur le bénéfice formel de la chimiothérapie.

Pendant de nombreuses années, la recherche de facteurs pronostiques et prédictifs de réponse à la chimiothérapie s'est focalisée **sur des paramètres tumoraux** (taille T, envahissement ganglionnaire N, grade, index de prolifération, récepteurs hormonaux, le statu HER2, classification moléculaire), puis plus récemment sur des signatures génomiques tumorales pronostiques et prédictives du bénéfice de la chimiothérapie adjuvante. Or, nous constatons actuellement les limites de la classification moléculaire en pratique, ainsi que celles inhérentes aux signatures moléculaires.

Cette médecine personnalisée pourrait être optimisée en recherchant d'autres **facteurs prédictifs, liés à l'hôte** et non pas à la tumeur. Ainsi, des variants génétiques de type single nucleotide polymorphism (SNP) portant sur des enzymes, des transporteurs impliqués dans le métabolisme, le transport, l'élimination des cytotoxiques, peuvent impacter sur la réponse à la chimiothérapie et constituer ainsi de nouveaux facteurs prédictifs d'efficacité/non efficacité de la chimiothérapie adjuvante. Ainsi, ces nouveaux facteurs pourraient provenir de la pharmacogénomique. C'est dans ce contexte qu'est intervenue l'étude GENEOM portant sur la recherche de facteurs génétiques de type SNP associés à la réponse à la chimiothérapie adjuvante.

**Dans cette étude, nous avons identifié plusieurs SNP associés à la réponse et plus précisément à la survie sans progression (PFS) et /ou spécifiquement à la survie sans progression métastatique (MFS).**

Dans la population traitée uniquement par chimiothérapie sans thérapie ciblée anti-HER2, 2 SNP sont associés en analyse univariée à la PFS, **la cycline D1 rs9344 et SLCO1B3 rs11045585**, association qui n'est plus significative en analyse multivariée. Cependant, **5 SNP** sont retrouvés associés spécifiquement à la survie sans progression métastatique (MFS) : **SLCO1B3-rs11045585** qui intervient dans le transport du Docetaxel, **NOS3-rs1799983** intervenant dans le métabolisme oxydatif et l'effet cytotoxique du cyclophosphamide et des anthracyclines, **CYB2B6-rs2279345** dans l'activation du cyclophosphamide, **BRCA1-rs799917** dans la réparation des lésions de l'ADN et **CYP2D6-rs3892097** dans la transformation du Tamoxifène en forme active et donc finalement à la réponse à l'hormonothérapie adjuvante. Sur ces SNP, quatre, SLCO1B3 exclus, démontrent en multivarié un risque de rechute métastatique doublée, voire triplée en cas de génotype défavorable. Le modèle pronostique établi sur ces combinaisons des génotypes de SNP défavorables dénote un risque métastatique pouvant être multiplié jusqu'à un facteur 10, confirmant que c'est bien la combinaison de SNP défavorable qui impacte sur le pronostic.

Dans la population traitée par association chimiothérapie-immunothérapie anti-HER2, seule l'analyse de l'association avec la PFS et non la MFS, bien que plus adaptée, a été possible compte tenu du recul et du nombre d'événements insuffisant dans cette population. Cette analyse est ainsi **sous caution** et l'association de ces 4 SNP à la PFS devra être confirmée avec un recul plus suffisant. Il s'agit de SNP portant sur la **MTHFR-rs1801133**, jouant un rôle dans le métabolisme du 5FU, sur la carboxylesterase, **CES2-rs11075646**, jouant un rôle dans l'activation de la capecitabine en 5FU, de **CYP2B6-rs2279345** dans la transformation du cyclophosphamide en forme active, **et de ABCC4-rs9561778**, impliqué dans l'élimination urinaire du cyclophosphamide. En multivariée, sur ces 4 variants, deux, **ABCC4-rs9561778 et CYP2B6-rs2279345** impactent, avec la taille tumorale >T2+ sur la PFS avec un risque global de rechute compris entre 5 et 10 (9.67 et 5.62 respectivement). Le modèle pronostique, même si interprétable avec prudence compte tenu du faible nombre d'événements dans cette 2<sup>ème</sup> population, démontre toujours l'intérêt de la combinaison des SNP mais aussi l'intégration des paramètres tumoraux, comme la taille, aux paramètres liés à l'hôte.

Un seul SNP est commun à ces deux populations adjuvantes, **CYP2B6-rs2279345**, et avec la population néoadjuvante de l'étude, mais dans des combinaisons de génotypes différents.

**SLCO1B3 rs11045585, BRCA1 rs799917 et CYP2D6 rs3892097** sont également communs avec GENEOM néoadjuvant, dans des combinaisons génotypiques identiques ou non.

**Au total, cette étude GENEOM adjuvant ouvre la perspective vers l'utilisation des polymorphismes de nucléotides comme nouveaux facteurs prédictifs de réponse et à la chimiothérapie adjuvante, contribuant ainsi au développement d'une médecine personnalisée. En effet, de nombreuses limites intrinsèques à l'étude (recul et nombre d'évènements insuffisants, imperfection du critère de jugement PFS ou MFS) impliquent que ces résultats ne sont pas encore applicables en routine. Ainsi, l'idée est d'ici quelques années, avec un recul plus important, et en regroupant les données de l'adjuvant et du néoadjuvant, de confirmer ou d'infirmer ces SNP candidats, voire de faire émerger d'autres variants.**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Wiechec E, Hansen LL. The effect of genetic variability on drug response in conventional breast cancer treatment. *Eur J Pharmacol.* 2009 Dec ;625(1-3):122–30.
2. Nkondjock A, Ghadirian P. [Risk factors and risk reduction of breast cancer. *Médecine Sci MS.* 2005 Feb;21(2):175–80.
3. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005 May 14;365(9472):1687–717.
4. Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnatelli L, Brambilla C, et al. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med.* 1976 Feb 19;294(8):405–10.
5. Levine MN, Pritchard KI, Bramwell VHC, Shepherd LE, Tu D, Paul N, et al. Randomized trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer: update of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trial MA5. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005 Aug 1;23(22):5166–70.
6. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet.* 2012 Feb 4;379(9814):432–44.
7. Henderson IC, Berry DA, Demetri GD, Cirincione CT, Goldstein LJ, Martino S, et al. Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2003 Mar 15;21(6):976–83.
8. Roché H, Fumoleau P, Spielmann M, Canon J-L, Delozier T, Serin D, et al. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006 Dec 20;24(36):5664–71.
9. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla J-P, Weaver C, et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Jun 2;352(22):2302–13.

10. Martín M, Lluch A, Seguí MA, Ruiz A, Ramos M, Adrover E, et al. Toxicity and health-related quality of life in breast cancer patients receiving adjuvant docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide (TAC) or 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide (FAC): impact of adding primary prophylactic granulocyte-colony stimulating factor to the TAC regimen. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2006 Aug;17(8):1205–12.
11. Martín M, Seguí MA, Antón A, Ruiz A, Ramos M, Adrover E, et al. Adjuvant docetaxel for high-risk, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010 Dec 2;363(23):2200–10.
12. Eiermann W, Pienkowski T, Crown J, Sadeghi S, Martin M, Chan A, et al. Phase III Study of Doxorubicin/Cyclophosphamide With Concomitant Versus Sequential Docetaxel As Adjuvant Treatment in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Normal, Node-Positive Breast Cancer: BCIRG-005 Trial. *J Clin Oncol*. 2011 Oct 10 ;29(29):3877–84.
13. Mackey JR, Martin M, Pienkowski T, Rolski J, Guastalla J-P, Sami A, et al. Adjuvant docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide in node-positive breast cancer: 10-year follow-up of the phase 3 randomised BCIRG 001 trial. *Lancet Oncol*. 2013 Jan;14(1):72–80.
14. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
15. Silver SM, Ali HY, Blayney DW, Caughran J, Herman JG, Pettinga JE, et al. Use of a 21-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay to guide therapy in 14 Michigan Breast Oncology Quality Initiative (MiBOQI) sites. *J Clin Oncol*. 2010;28:15s(suppl; abstr 6039).
16. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, Mamounas EP, Fisher B, et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 May 1;24(13):2019–27.
17. Mamounas EP, Bryant J, Lembersky B, Fehrenbacher L, Sedlacek SM, Fisher B, et al. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Jun 1;23(16):3686–96.
18. French Adjuvant Study Group. Benefit of a high-dose epirubicin regimen in adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer patients with poor prognostic factors: 5-year follow-up results of French Adjuvant Study Group 05 randomized trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Feb 1;19(3):602–11.
19. Jones SE, Savin MA, Holmes FA, O'Shaughnessy JA, Blum JL, Vukelja S, et al. Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as adjuvant therapy for operable breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Dec 1;24(34):5381–7.

20. Group EBCTC, others. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *The Lancet* 2012 ;379(9814):432–44.
21. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2013 Sep;24(9):2206–23.
22. Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1989 Sep;7(9):1239–51.
23. Amar S, McCullough AE, Tan W, Geiger XJ, Boughey JC, McNeil RB, et al. Prognosis and Outcome of Small ( $\leq 1$  cm), Node-Negative Breast Cancer on the Basis of Hormonal and HER-2 Status. *The Oncologist*. 2010 Oct 1;15(10):1043–9.
24. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287–312.
25. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1994 May;12(5):888–94.
26. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1994;(16):35–42.
27. Gnerlich JL, Deshpande AD, Jeffe DB, Sweet A, White N, Margenthaler JA. Elevated breast cancer mortality in women younger than age 40 years compared with older women is attributed to poorer survival in early-stage disease. *J Am Coll Surg*. 2009 Mar;208(3):341–7.
28. Kwon JH, Kim YJ, Lee K-W, Oh D-Y, Park SY, Kim JH, et al. Triple negativity and young age as prognostic factors in lymph node-negative invasive ductal carcinoma of 1 cm or less. *BMC Cancer*. 2010;10:557.
29. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013 Oct 1;24(suppl 6):vi7–vi23.
30. Fisher B, Dignam J, Tan-Chiu E, Anderson S, Fisher ER, Wittliff JL, et al. Prognosis and treatment of patients with breast tumors of one centimeter or less and negative axillary lymph nodes. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(2):112–20.
31. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989 Jan 1;63(1):181–7.
32. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with

- long-term follow-up. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1993 Nov;11(11):2090–100.
33. Nemoto T, Natarajan N, Bedwani R, Vana J, Murphy GP. Breast cancer in the medial half. Results of 1978 National Survey of the American College of Surgeons. *Cancer*. 1983 Apr 15;51(8):1333–8.
34. Saez RA, McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Surg Oncol*. 1989;5(2):102–10.
35. Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer*. 1983 Nov 1;52(9):1551–7.
36. Coutant C, Rouzier R, Olivier C, Bezu C, Marpeau O, Delpech Y, et al. Modèles prédictifs d’envahissement des ganglions non sentinelles en cas de métastases des ganglions sentinelles dans le cancer du sein. *Gynécologie Obstétrique Fertil*. 2009 Feb;37(2):160–6.
37. Erb KM, Julian TB. Completion of axillary dissection for a positive sentinel node: necessary or not? *Curr Oncol Rep*. 2009;11(1):15–20.
38. Houvenaeghel G, Nos C, Giard S, Mignotte H, Esterni B, Jacquemier J, et al. A nomogram predictive of non-sentinel lymph node involvement in breast cancer patients with a sentinel lymph node micrometastasis. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2009 Jul;35(7):690–5.
39. Reed J, Rosman M, Verbanac KM, Mannie A, Cheng Z, Tafra L. Prognostic implications of isolated tumor cells and micrometastases in sentinel nodes of patients with invasive breast cancer: 10-year analysis of patients enrolled in the prospective East Carolina University/Anne Arundel Medical Center Sentinel Node Multicenter Study. *J Am Coll Surg*. 2009 Mar;208(3):333–40.
40. Weaver DL. The prognostic importance of isolated tumor cell clusters and micrometastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Invest*. 2009 Feb;27(2):121–8.
41. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *The Oncologist*. 2004;9(6):606–16.
42. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2014 Jul;465(1):1–14.
43. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LFA, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008 Oct;216(2):141–50.
44. 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 Sep;11(3):359–77.
45. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403–10.



46. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer*. 1989 Nov 1;64(9):1914–21.
47. Sahin AA, Ro J, Ro JY, Blick MB, el-Naggar AK, Ordonez NG, et al. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer*. 1991 Aug 1;68(3):549–57.
48. Railo M, Lundin J, Haglund C, von Smitten K, von Boguslawsky K, Nordling S. Ki-67, p53, Er-receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol Stockh Swed*. 1997;36(4):369–74.
49. Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC, et al. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1998 Aug;78(4):460–5.
50. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic Factors in Node-Negative Breast Cancer. *Ann Surg*. 2002 Jan;235(1):10–26.
51. Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A, et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker? *Cancer*. 2003 Mar 1;97(5):1321–31.
52. De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007 May 21;96(10):1504–13.
53. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Jan 17;99(2):167–70.
54. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, et al. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Feb 6;100(3):207–12.
55. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell'Orto P, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Dec 1;26(34):5569–75.
56. Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, Säve-Söderbergh J, Davis BW, Reed R, et al. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1992 May;10(5):696–705.
57. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Apr;120(2):293–308.

58. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Nov;76(1):27–36.
59. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1988 Jul;6(7):1076–87.
60. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;52(1-3):227–37.
61. Murphy LC, Watson P. Steroid receptors in human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Biomed Pharmacother Biomed Pharmacothérapie.* 2002 Mar;56(2):65–77.
62. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res BCR.* 2007;9(1):R6.
63. (EBCTCG) EBCTCG. Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet.* 2008 Jan 11;371(9606):29–40.
64. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet.* 2012 Feb 4;379(9814):432–44.
65. Horwitz KB, Koseki Y, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology.* 1978 Nov;103(5):1742–51.
66. Horwitz KB, McGuire WL. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids.* 1975 Apr;25(4):497–505.
67. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Powe DG, Gee J, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007 Oct 20;25(30):4772–8.
68. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, et al. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Sep 7;97(17):1254–61.
69. Bardou V-J, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2003 May 15;21(10):1973–9.

70. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*. 1998 May 16;351(9114):1451–67.
71. Olivetto IA, Truong PT, Speers CH, Bernstein V, Allan SJ, Kelly SJ, et al. Time to stop progesterone receptor testing in breast cancer management. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004 May 1;22(9):1769–70.
72. Allred DC. Commentary: hormone receptor testing in breast cancer: a distress signal from Canada. *The Oncologist*. 2008 Nov;13(11):1134–6.
73. Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A'Hern R, et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2006 May;17(5):818–26.
74. 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 Jan 9;235(4785):177–82.
75. Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 2002 Aug;82(8):1007–14.
76. Quénel N, Wafflart J, Bonichon F, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, et al. The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat*. 1995 Sep;35(3):283–91.
77. Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? *J Pathol*. 2003 Apr;199(4):411–7.
78. Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5697–704.
79. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Jan 1;25(1):118–45.
80. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Apr 15;19(8):2334–56.
81. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Fernö M, Fuqua SA, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res*. 1990 Jul 15;50(14):4332–7.
82. Winstanley J, Cooke T, Murray GD, Platt-Higgins A, George WD, Holt S, et al. The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1991 Mar;63(3):447–50.

83. Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, Paterson AH, Lees AW, Jamil N, et al. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 1991 Jan 15;51(2):556–67.
84. Clark GM, McGuire WL. Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* 1991 Feb 1;51(3):944–8.
85. Press MF, Finn RS, Cameron D, Di Leo A, Geyer CE, Villalobos IE, et al. HER-2 gene amplification, HER-2 and epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression, and lapatinib efficacy in women with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2008 Dec 1;14(23):7861–70.
86. 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 Oct 20;353(16):1659–72.
87. Ward S, Pilgrim H, Hind D. Trastuzumab for the treatment of primary breast cancer in HER2-positive women: a single technology appraisal. *Health Technol Assess Winch Engl.* 2009 Jun;13 Suppl 1:1–6.
88. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J-H, Davidson NE, Geyer CE, et al. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011 Sep 1;29(25):3366–73.
89. 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 Oct 6;365(14):1273–83.
90. Gianni L, Dafni U, Gelber RD, Azambuja E, Muehlbauer S, Goldhirsch A, et al. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2011 Mar;12(3):236–44.
91. Ravdin PM, Siminoff LA, Davis GJ, Mercer MB, Hewlett J, Gerson N, et al. Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2001 Feb 15;19(4):980–91.
92. Olivotto IA, Bajdik CD, Ravdin PM, Speers CH, Coldman AJ, Norris BD, et al. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005 Apr 20;23(12):2716–25.
93. Campbell HE, Taylor MA, Harris AL, Gray AM. An investigation into the performance of the Adjuvant! Online prognostic programme in early breast cancer for a cohort of patients in the United Kingdom. *Br J Cancer.* 2009 Oct 6;101(7):1074–84.
94. Mook S, Schmidt MK, Rutgers EJ, van de Velde AO, Visser O, Rutgers SM, et al. Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! program: a hospital-based retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2009 Nov;10(11):1070–6.

95. De Glas NA, van de Water W, Engelhardt EG, Bastiaannet E, de Craen AJM, Kroep JR, et al. Validity of Adjuvant! Online program in older patients with breast cancer: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014 Jun;15(7):722–9.
96. Hajage D, de Rycke Y, Bollet M, Savignoni A, Caly M, Pierga J-Y, et al. External Validation of Adjuvant! Online Breast Cancer Prognosis Tool. Prioritising Recommendations for Improvement. *PLoS ONE*. 2011 Nov 8;6(11):e27446.
97. Jung S-Y, Han W, Lee JW, Ko E, Kim E, Yu J-H, et al. Ki-67 expression gives additional prognostic information on St. Gallen 2007 and Adjuvant! Online risk categories in early breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2009 May;16(5):1112–21.
98. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Sep 6;98(17):1183–92.
99. Marchionni L, Wilson RF, Wolff AC, Marinopoulos S, Parmigiani G, Bass EB, et al. Systematic review: gene expression profiling assays in early-stage breast cancer. *Ann Intern Med*. 2008 Mar 4;148(5):358–69.
100. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Doyle PJ, Campbell FC, et al. A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1982 Mar ;45(3):361–6.
101. Todd JH, Dowle C, Williams MR, Elston CW, Ellis IO, Hinton CP, et al. Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1987 Oct;56(4):489–92.
102. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;22(3):207–19.
103. Blamey RW, Ellis IO, Pinder SE, Lee AHS, Macmillan RD, Morgan D a. L, et al. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990-1999. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2007 Jul;43(10):1548–55.
104. Van Belle V, Van Calster B, Brouckaert O, Vanden Bempt I, Pintens S, Harvey V, et al. Qualitative assessment of the progesterone receptor and HER2 improves the Nottingham Prognostic Index up to 5 years after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Sep 20;28(27):4129–34.
105. Rakha EA, Soria D, Green AR, Lemetre C, Powe DG, Nolan CC, et al. Nottingham Prognostic Index Plus (NPI+): a modern clinical decision making tool in breast cancer. *Br J Cancer*. 2014 Apr 1;110(7):1688–97.
106. Hearne BJ, Teare MD, Butt M, Donaldson L. Comparison of Nottingham Prognostic Index and Adjuvant Online prognostic tools in young women with breast cancer: review of a single-institution experience. *BMJ Open*. 2015 Jan 1;5(1):e005576.
107. Sonnenblick A, Fumagalli D, Sotiriou C, Piccart M. Is the differentiation into molecular subtypes of breast cancer important for staging, local and systemic therapy, and follow up? *Cancer Treat Rev*. 2014 Oct;40(9):1089–95.

108. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
109. Perou CM, Børresen-Dale A-L. Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Feb;3(2).
110. Sørlie 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 Sep 11;98(19):10869–74.
111. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418–23.
112. 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.
113. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Jul 10;28(20):3271–7.
114. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 May 20;101(10):736–50.
115. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo W-L, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*. 2006 Dec;10(6):529–41.
116. Gatz ML, Lucas JE, Barry WT, Kim JW, Wang Q, Crawford MD, et al. A pathway-based classification of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 13;107(15):6994–9.
117. Reis-Filho JS, Weigelt B, Fumagalli D, Sotiriou C. Molecular profiling: moving away from tumor philately. *Sci Transl Med*. 2010 Sep 1;2(47):47ps43.
118. Creighton CJ. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biol Targets Ther*. 2012;6:289–97.
119. Ellis MJ, Tao Y, Luo J, A'Hern R, Evans DB, Bhatnagar AS, et al. Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Oct 1;100(19):1380–8.
120. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160–7.
121. Staaf J, Ringnér M, Vallon-Christersson J, Jönsson G, Bendahl P-O, Holm K, et al. Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2--positive

breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Apr 10;28(11):1813–20.

122. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5678–85.

123. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*. 2006 Jul;49(1):22–34.

124. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2006 Feb;19(2):264–71.

125. Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D, Ashworth A, Lakhani SR, et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol*. 2006 Jul;59(7):729–35.

126. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012 Jun 21;486(7403):395–9.

127. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res BCR*. 2007;9(1):R4.

128. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Apr 1;15(7):2302–10.

129. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2011 Feb;24(2):157–67.

130. Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2009 Jun;9 Suppl 2:S73–81.

131. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013 Oct 1;19(19):5533–40.

132. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2750–67.

133. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2010;12(5):R68.

134. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*. 2005 Jul 7;24(29):4660–71.
135. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Nov 10;29(32):4273–8.
136. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Aug 1;31(22):2783–90.
137. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Aug 15;10(16):5367–74.
138. Alizart M, Saunus J, Cummings M, Lakhani SR. Molecular classification of breast carcinoma. *Diagn Histopathol*. 2012;18(3):97–103.
139. Guarneri V, Conte P. Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *The Oncologist*. 2009 Jul;14(7):645–56.
140. Heitz F, Harter P, Lueck H-J, Fissler-Eckhoff A, Lorenz-Salehi F, Scheil-Bertram S, et al. Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2009 Nov;45(16):2792–8.
141. Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012 Oct;38(6):698–707.
142. Hayes DF. Targeting adjuvant chemotherapy: a good idea that needs to be proven! *J Clin Oncol*. 2012;30(12):1264–7.
143. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160–7.
144. Chia SK, Bramwell VH, Tu D, Shepherd LE, Jiang S, Vickery T, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Aug 15;18(16):4465–72.
145. Gnant M, Dowsett M, Filipits M, Lopez-Knowles E, Greil R, Balic M, et al. Identifying clinically relevant prognostic subgroups in node-positive postmenopausal HR+ early breast cancer patients treated with endocrine therapy: A combined analysis of 2,485 patients from ABCSG-8 and ATAC using the PAM50 risk of



recurrence (ROR) score and intrinsic subtype. *J Clin Oncol*. 2013;31(suppl; abstr 506).

146. Eiermann W, Rezai M, Kümmel S, Kühn T, Warm M, Friedrichs K, et al. The 21-gene recurrence score assay impacts adjuvant therapy recommendations for ER-positive, node-negative and node-positive early breast cancer resulting in a risk-adapted change in chemotherapy use. *Ann Oncol*. 2013 Mar 1;24(3):618–24.

147. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *The Lancet* 2011;378(9805):1812–23.

148. Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530–6.

149. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19;347(25):1999–2009.

150. Drukker CA, Bueno-de-Mesquita JM, Retèl VP, van Harten WH, van Tinteren H, Wesseling J, et al. A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2013 Aug 15;133(4):929–36.

151. Bueno-de-Mesquita JM, van Harten WH, Retel VP, van't Veer LJ, van Dam FSAM, Karsenberg K, et al. Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER). *Lancet Oncol*. 2007 Dec;8(12):1079–87.

152. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Jul;116(2):295–302.

153. Knauer M, Cardoso F, Wesseling J, Bedard PL, Linn SC, Rutgers EJT, et al. Identification of a low-risk subgroup of HER-2-positive breast cancer by the 70-gene prognosis signature. *Br J Cancer*. 2010 Dec 7;103(12):1788–93.

154. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: today and tomorrow. *Cancer Treat Rev*. 2014 Apr;40(3):434–44.

155. Knauer M, Mook S, Rutgers EJT, Bender RA, Hauptmann M, van de Vijver MJ, et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Apr;120(3):655–61.

156. Goncalves R, Bose R. Using multigene tests to select treatment for early-stage breast cancer. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. 2013 Feb 1;11(2):174–182; quiz 182.

157. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Aug 10;24(23):3726–34.

158. Dowsett M, Cuzick J, Wale C, Forbes J, Mallon EA, Salter J, et al. Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Apr 10;28(11):1829–34.
159. Albain KS, Barlow WE, Shak S, Hortobagyi GN, Livingston RB, Yeh I-T, et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010 Jan;11(1):55–65.
160. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DSA, Nobel AB, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006 Aug 10;355(6):560–9.
161. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287–312.
162. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014 Aug 10;5(3):412–24.
163. Look MP, Putten WLJ van, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, et al. Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Jan 16;94(2):116–28.
164. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, et al. Randomized Adjuvant Chemotherapy Trial in High-Risk, Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients Identified by Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Jun 20;93(12):913–20.
165. Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, et al. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2013 May;49(8):1825–35.
166. Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JGM, Krüger A, et al. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res*. 2002 Aug 15;62(16):4617–22.
167. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287–312.
168. Kantelhardt EJ, Vetter M, Schmidt M, Veyret C, Augustin D, Hanf V, et al. Prospective evaluation of prognostic factors uPA/PAI-1 in node-negative breast

cancer: phase III NNBC3-Europe trial (AGO, GBG, EORTC-PBG) comparing 6×FEC versus 3×FEC/3×Docetaxel. *BMC Cancer*. 2011;11:140.

169. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):790–800.

170. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010 Jan;220(2):263–80.

171. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res BCR*. 2008;10(4):R65.

172. Tang G, Shak S, Paik S, Anderson SJ, Costantino JP, Geyer CE, et al. Comparison of the prognostic and predictive utilities of the 21-gene Recurrence Score assay and Adjuvant! for women with node-negative, ER-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 May;127(1):133–42.

173. Tang G, Cuzick J, Wale C, Costantino JP, Cramer M, Shak S, et al. Recurrence risk of node-negative and ER-positive early-stage breast cancer patients by combining recurrence score, pathologic, and clinical information: A meta-analysis approach. *ASCO Meet Abstr*. 2010 May 20;28(15\_suppl):509.

174. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DSA, Nobel AB, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006 Aug 10;355(6):560–9.

175. Reyal F, van Vliet MH, Armstrong NJ, Horlings HM, de Visser KE, Kok M, et al. A comprehensive analysis of prognostic signatures reveals the high predictive capacity of the proliferation, immune response and RNA splicing modules in breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2008;10(6):R93.

176. Iwamoto T, Bianchini G, Booser D, Qi Y, Coutant C, Shiang CY-H, et al. Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Feb 2;103(3):264–72.

177. Iwamoto T, Pusztai L. Predicting prognosis of breast cancer with gene signatures: are we lost in a sea of data? *Genome Med*. 2010;2(11):81.

178. Hübner C, Petermann I, Browning BL, Shelling AN, Ferguson LR. Triallelic Single Nucleotide Polymorphisms and Genotyping Error in Genetic Epidemiology Studies: MDR1 (ABCB1) G2677/T/A as an Example. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Jun 1;16(6):1185–92. A

179. International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):851–61.

180. Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, et al. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical

outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Dec 20;23(36):9312–8.

181. Wegman P, Vainikka L, Stål O, Nordenskjöld B, Skoog L, Rutqvist L-E, et al. Genotype of metabolic enzymes and the benefit of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res BCR*. 2005;7(3):R284–290.

182. Colomer R, Monzo M, Tusquets I, Rifa J, Baena JM, Barnadas A, et al. A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Feb 1;14(3):811–6.

183. Gehrman M, Schmidt M, Brase JC, Roos P, Hengstler JG. Prediction of paclitaxel resistance in breast cancer: is CYP1B1\*3 a new factor of influence? *Pharmacogenomics*. 2008 Jul;9(7):969–74.

184. Marsh S, Somlo G, Li X, Frankel P, King CR, Shannon WD, et al. Pharmacogenetic analysis of paclitaxel transport and metabolism genes in breast cancer. *Pharmacogenomics J*. 2007 Oct;7(5):362–5.

185. Bewick MA, Conlon MSC, Lafrenie RM. Polymorphisms in manganese superoxide dismutase, myeloperoxidase and glutathione-S-transferase and survival after treatment for metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Sep;111(1):93–101.

186. Fagerholm R, Hofstetter B, Tommiska J, Aaltonen K, Vrtel R, Syrjäkoski K, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1\*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet*. 2008 Jul;40(7):844–53.

187. Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, et al. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol*. 2003 May;22(5):1117–21.

188. Lal S, Wong ZW, Jada SR, Xiang X, Chen Shu X, Ang PCS, et al. Novel SLC22A16 polymorphisms and influence on doxorubicin pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Pharmacogenomics*. 2007 Jun;8(6):567–75.

189. Tan S-H, Lee S-C, Goh B-C, Wong J. Pharmacogenetics in Breast Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*. 2008 Dec 15;14(24):8027–41.

190. Westbrook K, Stearns V. Pharmacogenomics of breast cancer therapy: An update. *Pharmacol Ther*. 2013 Jul;139(1):1–11.

191. Largillier R, Etienne-Grimaldi M-C, Formento J-L, Ciccolini J, Nebbia J-F, Ginot A, et al. Pharmacogenetics of capecitabine in advanced breast cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006 Sep 15;12(18):5496–502.

192. Jaremko M, Justenhoven C, Schroth W, Abraham BK, Fritz P, Vollmert C, et al. Polymorphism of the DNA repair enzyme XRCC1 is associated with treatment prediction in anthracycline and cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil-based chemotherapy of patients with primary invasive breast cancer. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Jul;17(7):529–38.

193. Ambrosone CB, Ahn J, Singh KK, Rezaishiraz H, Furberg H, Sweeney C, et al. Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res.* 2005 Feb 1;65(3):1105–11.
194. Choi J-Y, Barlow WE, Albain KS, Hong C-C, Blanco JG, Livingston RB, et al. Nitric oxide synthase variants and disease-free survival among treated and untreated breast cancer patients in a Southwest Oncology Group clinical trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009 Aug 15;15(16):5258–66.
195. Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Cole M, Verrill M, Jamieson D, et al. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br J Cancer.* 2010 Mar 16;102(6):1003–9.
196. Parmar S, Stingl JC, Huber-Wechselberger A, Kainz A, Renner W, Langsenlehner U, et al. Impact of UGT2B7 His268Tyr polymorphism on the outcome of adjuvant epirubicin treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res BCR.* 2011;13(3):R57.
197. Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF, Thompson PA, McClure GY, Korourian S, et al. Polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTM1 and GSTT1) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7130–5.
198. Ambrosone CB, Barlow WE, Reynolds W, Livingston RB, Yeh I-T, Choi J-Y, et al. Myeloperoxidase genotypes and enhanced efficacy of chemotherapy for early-stage breast cancer in SWOG-8897. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Oct 20;27(30):4973–9.
199. Pinto N, Ludeman SM, Dolan ME. Drug focus: Pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy. *Pharmacogenomics.* 2009 Dec;10(12):1897–903.
200. Yao S, Barlow WE, Albain KS, Choi J-Y, Zhao H, Livingston RB, et al. Gene polymorphisms in cyclophosphamide metabolism pathway, treatment-related toxicity, and disease-free survival in SWOG 8897 clinical trial for breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010 Dec 15;16(24):6169–76.
201. Khoury T, Ademuyiwa FO, Chandrasekhar R, Chandrasekhar R, Jabbour M, Deleo A, et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 expression in breast cancer is associated with stage, triple negativity, and outcome to neoadjuvant chemotherapy. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2012 Mar;25(3):388–97.
202. Pourquier P. [Alkylating agents]. *Bull Cancer (Paris).* 2011 Nov;98(11):1237–51.
203. Kiyotani K, Mushiroda T, Kubo M, Zembutsu H, Sugiyama Y, Nakamura Y. Association of genetic polymorphisms in SLCO1B3 and ABCC2 with docetaxel-induced leukopenia. *Cancer Sci.* 2008 May;99(5):967–72.
204. Baker SD, Verweij J, Cusatis GA, van Schaik RH, Marsh S, Orwick SJ, et al. Pharmacogenetic pathway analysis of docetaxel elimination. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Feb;85(2):155–63.
205. Bergmann TK, Brasch-Andersen C, Gréen H, Mirza M, Pedersen RS, Nielsen F, et al. Impact of CYP2C8\*3 on paclitaxel clearance: a population pharmacokinetic and

- pharmacogenomic study in 93 patients with ovarian cancer. *Pharmacogenomics J.* 2011 Apr;11(2):113–20.
206. Hertz DL, Motsinger-Reif AA, Drobish A, Winham SJ, McLeod HL, Carey LA, et al. CYP2C8\*3 predicts benefit/risk profile in breast cancer patients receiving neoadjuvant paclitaxel. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jul;134(1):401–10.
207. Marsh S, Somlo G, Li X, Frankel P, King CR, Shannon WD, et al. Pharmacogenetic analysis of paclitaxel transport and metabolism genes in breast cancer. *Pharmacogenomics J.* 2007 Oct;7(5):362–5.
208. Chang H, Rha SY, Jeung H-C, Im C-K, Ahn JB, Kwon WS, et al. Association of the ABCB1 gene polymorphisms 2677G>T/A and 3435C>T with clinical outcomes of paclitaxel monotherapy in metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2009 Feb;20(2):272–7.
209. Ribelles N, Lopez-Siles J, Sanchez A, Gonzalez E, Sanchez M, Carabantes F, et al. A Carboxylesterase 2 Gene Polymorphism as Predictor of Capecitabine on Response and Time to Progression. *Curr Drug Metab.* 2008 May 1;9(4):336–43.
210. Shim HJ, Yun JY, Hwang JE, Bae WK, Cho SH, Lee JH, et al. BRCA1 and XRCC1 polymorphisms associated with survival in advanced gastric cancer treated with taxane and cisplatin. *Cancer Sci.* 2010 May;101(5):1247–54.
211. Isla D, Sarries C, Rosell R, Alonso G, Domine M, Taron M, et al. Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 2004 Aug;15(8):1194–203.
212. Chew S-C, Singh O, Chen X, Ramasamy RD, Kulkarni T, Lee EJD, et al. The effects of CYP3A4, CYP3A5, ABCB1, ABCC2, ABCG2 and SLCO1B3 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel in nasopharyngeal carcinoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Jun;67(6):1471–8.
213. Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Cole M, Verrill M, Jamieson D, et al. Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br J Cancer.* 2010 Mar 16;102(6):1003–9.
214. Jamieson D, Lee J, Cresti N, Jackson R, Griffin M, Sludden J, et al. Pharmacogenetics of adjuvant breast cancer treatment with cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014 Oct;74(4):667–74.
215. Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, et al. Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol.* 2003 May;22(5):1117–21.
216. Xu Y, Yao L, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, et al. p53 Codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with

breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005 Oct 15;11(20):7328–33.

217. Henríquez-Hernández LA, Murias-Rosales A, González-Hernández A, de León AC, Díaz-Chico N, Fernández-Pérez L. Distribution of TYMS, MTHFR, p53 and MDR1 gene polymorphisms in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Epidemiol.* 2010 Oct;34(5):634–8.

218. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X-S, et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet.* 2014;

219. Di Leo A, Curigliano G, Diéras V, Malorni L, Sotiriou C, Swanton C, et al. New approaches for improving outcomes in breast cancer in Europe. *The Breast.* 2015 Mar;

220. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clin Med Res.* 2009 Jun 1;7(1-2):4–13.

221. Choi JR, Kim J-O, Kang DR, Shin J-Y, Zhang XH, Oh JE, et al. Genetic Variations of Drug Transporters Can Influence on Drug Response in Patients Treated with Docetaxel Chemotherapy. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc.* 2014 Dec 16;

222. Absenger G, Benhaim L, Szkandera J, Zhang W, Yang D, Labonte MJ, et al. The cyclin D1 (CCND1) rs9344 G>A polymorphism predicts clinical outcome in colon cancer patients treated with adjuvant 5-FU-based chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2014 Apr;14(2):130–4.

223. Coate L, Cuffe S, Horgan A, Hung RJ, Christiani D, Liu G. Germline genetic variation, cancer outcome, and pharmacogenetics. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2010 Sep 10;28(26):4029–37.

224. Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene.* 1995 Sep 7;11(5):1005–11.

225. Gautschi O, Hugli B, Ziegler A, Bigosch C, Bowers NL, Ratschiller D, et al. Cyclin D1 (CCND1) A870G gene polymorphism modulates smoking-induced lung cancer risk and response to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Lung Cancer Amst Neth.* 2006 Mar;51(3):303–11.

226. Zhang W, Azuma M, Lurje G, Gordon MA, Yang D, Pohl A, et al. Molecular predictors of combination targeted therapies (cetuximab, bevacizumab) in irinotecan-refractory colorectal cancer (BOND-2 study). *Anticancer Res.* 2010 Oct;30(10):4209–17.

227. Zhang W, Gordon M, Press OA, Rhodes K, Vallböhmer D, Yang DY, et al. Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in patients

with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 Jul;16(7):475–83.

228. Li Z, Jiao X, Wang C, Shirley LA, Elsaleh H, Dahl O, et al. Alternative cyclin D1 splice forms differentially regulate the DNA damage response. *Cancer Res*. 2010 Nov 1;70(21):8802–11.

229. Nakajima M, Komagata S, Fujiki Y, Kanada Y, Ebi H, Itoh K, et al. Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Jun;17(6):431–45.

230. Barrière J, Formento J-L, Milano G, Ferrero J-M. [CYP2D6 polymorphisms and tamoxifen: therapeutic perspectives in the management of hormonodependent breast cancer patients]. *Bull Cancer (Paris)*. 2010 Mar;97(3):311–20.

231. Gor PP, Su HI, Gray RJ, Gimotty PA, Horn M, Aplenc R, et al. Cyclophosphamide- metabolizing enzyme polymorphisms and survival outcomes after adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res BCR*. 2010;12(3):R26.

232. Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM, et al. Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5187–93.

233. Lim H-S, Ju Lee H, Seok Lee K, Sook Lee E, Jang I-J, Ro J. Clinical implications of CYP2D6 genotypes predictive of tamoxifen pharmacokinetics in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007 Sep 1;25(25):3837–45.

234. Kiyotani K, Mushiroda T, Sasa M, Bando Y, Sumitomo I, Hosono N, et al. Impact of CYP2D6\*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Sci*. 2008 May;99(5):995–9.

235. Xu Y, Sun Y, Yao L, Shi L, Wu Y, Ouyang T, et al. Association between CYP2D6 \*10 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen treatment. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2008 Aug;19(8):1423–9.

236. Nowell SA, Ahn J, Rae JM, Scheys JO, Trovato A, Sweeney C, et al. Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Jun;91(3):249–58.

237. Wegman P, Elingarami S, Carstensen J, Stål O, Nordenskjöld B, Wingren S. Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2007;9(1):R7.

238. Cass I, Baldwin RL, Varkey T, Moslehi R, Narod SA, Karlan BY. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer*. 2003 May 1;97(9):2187–95.



239. Goffin JR, Chappuis PO, Bégin LR, Wong N, Brunet J-S, Hamel N, et al. Impact of germline BRCA1 mutations and overexpression of p53 on prognosis and response to treatment following breast carcinoma: 10-year follow up data. *Cancer*. 2003 Feb 1;97(3):527–36.
240. Lee SY, Kang H-G, Yoo SS, Kang YR, Choi YY, Lee WK, et al. Polymorphisms in DNA repair and apoptosis-related genes and clinical outcomes of patients with non-small cell lung cancer treated with first-line paclitaxel-cisplatin chemotherapy. *Lung Cancer*. 2013 Nov 1;82(2):330–9.
241. Choi J-Y, Barlow WE, Albain KS, Hong C-C, Blanco JG, Livingston RB, et al. Nitric oxide synthase variants and disease-free survival among treated and untreated breast cancer patients in a Southwest Oncology Group clinical trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Aug 15;15(16):5258–66.
242. Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, et al. The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Jan;101(1):113–21.
243. Custodio A, Moreno-Rubio J, Aparicio J, Gallego-Plazas J, Yaya R, Maurel J, et al. Pharmacogenetic predictors of outcome in patients with stage II and III colon cancer treated with oxaliplatin and fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2014 Sep;13(9):2226–37.
244. Henríquez-Hernández LA, Murias-Rosales A, González-Hernández A, de León AC, Díaz-Chico N, Fernández-Pérez L. Distribution of TYMS, MTHFR, p53 and MDR1 gene polymorphisms in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Epidemiol*. 2010 Oct;34(5):634–8.
245. Toffoli G, Veronesi A, Boiocchi M, Crivellari D. MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2000 Mar;11(3):373–4.
246. Tian Q, Zhang J, Tan TMC, Chan E, Duan W, Chan SY, et al. Human multidrug resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins. *Pharm Res*. 2005 Nov;22(11):1837–53.
247. Bagley CM, Bostick FW, DeVita VT. Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Res*. 1973 Feb;33(2):226–33.
248. Low S-K, Kiyotani K, Mushiroda T, Daigo Y, Nakamura Y, Zembutsu H. Association study of genetic polymorphism in ABCC4 with cyclophosphamide-induced adverse drug reactions in breast cancer patients. *J Hum Genet*. 2009 Oct;54(10):564–71.
249. Islam MS, Islam MS, Parvin S, Ahmed MU, Sayeed MSB, Uddin MMN, et al. Effect of GSTP1 and ABCC4 gene polymorphisms on response and toxicity of cyclophosphamide-epirubicin-5-fluorouracil-based chemotherapy in Bangladeshi breast cancer patients. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2015 Feb 13;

250. Martin M, Martinez N, Ramos M, Calvo L, Lluch A, Zamora P, et al. Standard Versus Continuous Administration of Capecitabine in Metastatic Breast Cancer (GEICAM/2009-05): A Randomized, Noninferiority Phase II Trial With a Pharmacogenetic Analysis. *The Oncologist*. 2015 Feb 1;20(2):111–2.
251. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Apr 10;26(11):1789–96.
252. Beauclair S, Formento P, Fischel JL, Lescaut W, Largillier R, Chamorey E, et al. Role of the HER2 [Ile655Val] genetic polymorphism in tumorigenesis and in the risk of trastuzumab-related cardiotoxicity. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2007 Aug;18(8):1335–41.

## ANNEXES

### Annexe 1 : Classification TNM du cancer du sein, 7<sup>ème</sup> édition 2010

<b>Tumeur Primaire T</b>
Tx : la tumeur primitive ne peut pas être évaluée
T0 : la tumeur primitive n'est pas palpable
• Tis : carcinome in situ
• Tis (DCIS) : carcinome canalaire in situ
• Tis (CLIS) : carcinome lobulaire in situ
• Tis (Paget) : maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente
• NB : la maladie de Paget associée à une tumeur est classée en fonction de la taille de la tumeur
T1 : tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
T1mic : micro-invasion ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension
• T1a : 1 mm <tumeur ≤ 5 mm dans sa plus grande dimension
• T1b : 5 mm <tumeur ≤ 1 cm dans sa plus grande dimension
• T1c : 1 cm <tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
T2 : 2 cm <tumeur ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
T3 : tumeur >5 cm dans sa plus grande dimension
T4 : tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b)
• T4a : extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral
• T4b : œdème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau du même sein
• T4c : T4a + T4b
• T4d : cancer inflammatoire
<b>Ganglions lymphatiques régionaux pN</b>
Nx : l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué (par exemple déjà enlevés chirurgicalement ou non disponibles pour l'analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement)
N0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées
• N0(i-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, étude immunohistochimique négative (IHC)
• N0(i+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, IHC positive, avec des amas cellulaires ≤ 0,2 mm (considéré comme sans métastase ganglionnaire)
• N0(mol-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire négative (RT-PCR : reverse transcriptase polymérase chaîne réaction)
• N0(mol+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire positive (RT-PCR)
N1mi : micro métastases >0,2 mm et ≤ 2 mm
N1 : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
• N1a : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires
• N1b : envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
• N1c : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique (pN1a +pN1b)
N2 : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire
• N2a : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire >2 mm
• N2b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire
N3 : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux.

**Annexe 2 : Stadification du cancer du sein selon l'UICC**

Stade 0
Tis N0 M0
Stade I
I T1 N0 M0
Stade II
IIA T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0
IIB T2 N1 M0 ; T3 N0 M0
Stade III
IIIA T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0
IIIB T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0
IIIC Tous T N3 M0
IV Tous T Tous N M1

**AUTEUR : Nom : DUCOULOMBIER Prénom : Agnès**

**Date de Soutenance : le 25 juin 2015**

**Titre de la Thèse : « Recherche de Single Nucleotide Polymorphism (SNP) prédictifs de la réponse à la chimiothérapie adjuvante dans le cancer du sein »**

**Thèse - Médecine - Lille 2015**

**Cadre de classement : Oncologie Médicale**

**DES + spécialité : Oncologie Médicale**

**Mots-clés : Cancer du sein; Chimiothérapie adjuvante; SNP; survie ;Facteurs prédictifs**

## **Résumé**

**Contexte:** La chimiothérapie adjuvante (CTA) par anthracyclines-taxanes est un standard de prise en charge du cancer du sein (CS). Des polymorphismes de nucléotides (SNP) de gènes impliqués dans le métabolisme, le transport des cytotoxiques peuvent affecter l'efficacité de la CTA. L'objectif de l'étude était d'identifier des SNPs associés à la réponse à la CTA.

**Méthodes:** 418 patientes (pts) avec un CS traitées par CTA, ont été incluses entre 01/2008 et 01/2012. 309 pts ont reçu du FEC100-Docetaxel (population 1), 109 du FEC100-Docetaxel-Trastuzumab (population 2). 46 SNPs ont été génotypés sur de l'ADN germinale (prélèvement sanguin de 5 ml) par PCR, via 2 types de sondes, SNPtype (Fluidigm) / Taqman (Life technologies) sur une plateforme BioMark (Fluidigm). L'équilibre de Hardy Weinberg (HW) a été vérifié sur une population saine de l'EFS par comparaison des fréquences alléliques/génotypiques à la dbSNP database (test de Chi<sup>2</sup>/Fisher). L'association entre les survies sans progression (PFS) et sans métastase (MFS) (Kaplan Meier) et les facteurs clinicopathologiques (FCP) a été évaluée par test du Log-Rank. Les PFS/MFS ont été corrélées aux FCP et aux génotypes, isolés et combinés (Modèle de Cox univarié/multivarié). Un score pronostique a été établi.

**Résultats:** Dans la population 1, 5SNPs sont associés en univarié à la MFS avec les génotypes, HR, IC et p value respectifs suivants: SLCO1B3-rs11045585 GG 7.73 (1.83-32.7)p=0.001, NOS3-rs1799983 GT 0.32(0.14-0.76)p=0.006, CYB2B6-rs2279345 TT 2.29(1.02-5.13)p=0.04, BRCA1-rs799917 CT 0.41(0.19-0.89)p=0.02, CYP2D6-rs3892097 AG 2.14(1.05-4.36)p=0.03. En multivarié, 4SNPs restent associés à la MFS: NOS3 GG-TT 3.11(1.33-7.27)p=0.009, CYB2B6-rs2279345 TT 2.38(1.05-5.41)p=0.038, BRCA1-rs799917 CC-TT 2.21(1.01-4.85)p=0.047, CYP2D6-rs3892097 AG 2.14(1.04-4.40)p=0.039. Le modèle pronostique dénote un risque métastatique de 10.25(1.29-81.31) si ces 4 génotypes coexistent. Dans la population 2, 4SNPs sont associés en univarié à la PFS, mais seul 2 vérifient l'équilibre de HW: CYB2B6-rs2279345 CT 5.73(1.22-27)p=0.01, MTHFR-rs1801133 CT 4.61(0.98-21.7)p=0.03. En multivarié, CYP2B6 CT 9.67(1.82-51.28)p=0.008, MTHFR CT 10.78 (2.12-54.90)p=0.004, et la taille≥T2 10.78(2.12-54.90)p=0.004 sont associés à la PFS.

**Conclusion:** Des SNPs de gènes impliqués dans le stress oxydatif, le transport du Docetaxel, le métabolisme du cyclophosphamide et du 5FU, la réparation des lésions de l'ADN impactent sur la survie des pts traitées par CTA

## **Composition du Jury :**

**Président : Pr Jacques Bonneterre**

**Assesseurs : Pr Jean Philippe Peyrat, Pr Mohamed Hebbar, Pr Pierre Collinet**