

Université de Montréal

**Inhibiteurs de PARP: leur Rôle Potentiel en Monothérapie et en Combinaison en Cancer du
Sein Triple-Négatif**

Par

Michèle Beniey

Programmes de cycles supérieurs en sciences biomédicales, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences en sciences
biomédicales, option médecine expérimentale

Décembre 2020

© Michèle Beniey, 2020

Université de Montréal

Programmes de cycles supérieurs en sciences biomédicales, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Inhibiteurs de PARP: leur Rôle Potentiel en Monothérapie et en Combinaison en Cancer du
Sein Triple-Négatif**

Présenté par

Michèle Beniey

2020

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Francis Rodier

Président-rapporteur

Saima Hassan

Directrice de recherche

Mai-Kim Gervais

Membre du jury

Résumé

Quatorze femmes canadiennes meurent chaque jour du cancer du sein. Le cancer du sein triple-négatif (CSTN) détient un mauvais pronostic. De nombreux efforts sont fournis afin d'offrir à ces patientes des traitements ciblés, comme les inhibiteurs de poly (adenosine diphosphate-ribose) polymérase inhibiteurs (PARPi) afin d'améliorer leur survie et de minimiser la toxicité liée à la chimiothérapie. Le sous-groupe de CSTN qui pourrait bénéficier des PARPi reste à être identifié. De plus, différentes stratégies d'administration des PARPi et de la chimiothérapie pourraient améliorer leur efficacité thérapeutique tout en diminuant la toxicité. Nous avons précédemment dérivé une signature génétique de 63 gènes prédisant la réponse aux PARPi avec une précision globale élevée. Nos objectifs sont 1) d'évaluer les implications cliniques de la signature génétique; et 2) de déterminer la séquence optimale d'administration du talazoparib et du carboplatin *in vivo* en cancer du sein triple-négatif BRCA^{WT}.

D'abord, nous avons évalué la fréquence mutationnelle des 63 gènes dans différents contextes cliniques. Deux bases de données publiques furent utilisées. Puis, nous avons comparé trois cohortes de xélogreffes orthotopiques: A) talazoparib en premier, combiné au carboplatin le jour 3; carboplatin en premier suivi du talazoparib B) un jour après; et C) sept jours après.

La fréquence mutationnelle des 63 gènes était élevée chez les tumeurs lumineales B et celles de mauvais pronostic. Les patientes lumineales B mutées avaient une moindre survie que les patientes non mutées. Aussi, l'inhibition tumorale et métastatique était similaire pour les cohortes A et B, cependant la cohorte B avait moins de toxicité.

Les PARPi pourraient avoir un rôle chez les tumeurs lumineales B et celles de mauvais pronostic. Deuxièmement, le prétraitement avec le carboplatin semble améliorer la sensibilité au talazoparib et diminuer la toxicité.

Mots-clés : signature génétique, cancer du sein, cancer du sein triple-négatif, chimiothérapie, thérapie ciblée, inhibiteurs de PARP, xélogreffe orthotopique, métastases, toxicité, combinaison de traitement.

Abstract

Fourteen Canadian women die every day from breast cancer. Triple-negative breast cancer (TNBC) has a poor prognosis. Numerous efforts are made to offer these patients targeted therapies such as poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitors (PARPi) to improve survival and minimize chemotherapy-related toxicity. It is not well understood which subset of TNBC patients will benefit from PARPi; and if different sequencing strategies of PARPi and chemotherapy can improve therapeutic efficacy and decrease toxicity. We previously derived a 63-gene signature predicting response to PARPi with a high overall accuracy. Our objectives are 1) to evaluate the clinical implications of the 63-gene signature; and 2) to determine the optimal sequence of administration of talazoparib and carboplatin *in vivo* in BRCA^{WT} TNBC.

First, we evaluated the mutational frequency of the 63 genes in different clinical settings using two publically-available datasets. Second, we compared three cohorts of orthotopic xenografts: A) talazoparib first, combined with carboplatin on day 3; carboplatin first, followed by talazoparib B) one day later; and C) seven days later.

We found that the mutational frequency was high in breast cancer subtypes of poor prognosis. Mutated luminal B patients had a lower survival than non-mutated patients. We also found that tumoral and metastatic inhibition were similar between cohorts A and B, but cohort B had less toxicity.

In conclusion, there is potential for PARPi efficacy in luminal B and poor prognosis tumors. Second, pretreatment with carboplatin may be an effective approach with less toxicity.

Keywords: gene signature, breast cancer, triple-negative breast cancer, chemotherapy, targeted therapy, PARP inhibitors, orthotopic xenograft, metastasis, toxicity, combination treatment.

Table des matières

Résumé	5
Abstract.....	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux	15
Liste des figures	17
Liste des sigles et abréviations.....	19
Remerciements.....	25
Chapitre 1 – INTRODUCTION	27
1. Le cancer du sein.....	27
1.1. Épidémiologie du cancer du sein	27
1.1. Anatomie du sein	27
1.1.1. Anatomie fonctionnelle et histologie.....	27
1.1.2. Vascularisation sanguine et lymphatique	28
1.2. Facteurs de risque du cancer du sein.....	30
1.2.1. Facteurs de risque démographiques et métaboliques.....	30
1.2.2. Facteurs de risque environnementaux et habitudes de vie.....	31
1.2.3. Facteurs de risque génétiques héréditaires.....	31
1.3. Risque de cancer du sein.....	32
1.3.1. Lésions à haut risque.....	32
1.3.2. Cancer pré-invasif	34
1.3.3. Carcinomes <i>in situ</i>	34
1.3.4. Carcinomes infiltrants	34

1.4.	Facteurs pronostiques du cancer du sein	36
1.4.1.	Statut des récepteurs cellulaires.....	36
1.4.1.1.	Récepteurs des hormones stéroïdiennes.....	36
1.4.1.2.	Récepteurs du facteur de croissance HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2)	37
1.4.2.	Facteurs pronostiques pathologiques.....	38
1.4.3.	Facteurs pronostiques génomiques	39
1.4.3.1.	Classification en sous-groupes intrinsèques (PAM50)	39
1.4.3.2.	Classification selon le risque de récurrence (Oncotype DX)	41
1.4.3.3.	Autres classifications génomiques	42
1.5.	Stades du cancer du sein.....	44
1.5.1.	Taille de la tumeur primaire.....	45
1.5.2.	Envahissement ganglionnaire	46
1.5.2.1.	Classification clinique.....	46
1.5.2.2.	Classification pathologique	47
1.5.3.	Métastases à distance	48
2.	Le cancer du sein triple-négatif.....	49
2.1.	Définition	49
2.2.	Épidémiologie	49
2.3.	Présentation clinique et diagnostique	50
2.4.	Caractéristiques moléculaires.....	50
2.5.	Traitement du cancer du sein triple-négatif	52
2.5.1.	Principes généraux.....	52
2.5.2.	Chimiothérapie	53

2.5.2.1.	Mécanisme d'action et efficacité du carboplatin.....	53
2.5.3.	Mécanismes de réponse aux traitements endommageant l'ADN	56
3.	Les inhibiteurs de Poly (Adenosine diphosphate Ribose) Polymerase (PARP).....	60
3.1.	Les Poly (Adenosine diphosphate Ribose) Polymérases	60
3.2.	Mécanisme d'action des inhibiteurs de PARP.....	64
3.3.	Efficacité des inhibiteurs de PARP	67
3.3.1.	Cancers du sein ayant une mutation germinale BRCA1/2	68
3.3.2.	Cancers du sein n'ayant pas de mutation germinale BRCA1/2	69
4.	La relation entre le carboplatin et les inhibiteurs de PARP.....	74
5.	Problématiques, hypothèses et objectifs.....	75
5.1.	Implications cliniques de la signature génétique de 63 gènes.....	75
5.1.1.	Problématiques	75
5.1.2.	Hypothèses	76
5.1.3.	Objectifs	76
5.2.	Séquence optimale d'administration du carboplatin et du talazoparib <i>in vivo</i>	77
5.2.1.	Problématiques	77
5.2.2.	Hypothèses	77
5.2.3.	Objectifs	78
Chapitre 2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES		79
1.	Implications cliniques de la signature génétique de 63 gènes.....	79
1.1.	Cohortes et base de données	79
1.2.	Analyse statistique	80
2.	Séquence optimale d'administration du talazoparib et du carboplatin <i>in vivo</i>	82
2.1.	Culture cellulaire	82

2.2.	Xénogreffes orthotopiques	84
2.3.	Devis expérimental et groupes de traitements	84
2.4.	Projet pilote	85
2.5.	Protocole de traitement	86
2.6.	Suivi et données	88
2.7.	Analyse des données.....	89
Chapitre 3 – RÉSULTATS.....		93
1.	Implications cliniques de la signature génétique de 63 gènes.....	93
1.1.	Expression génique et facteurs pronostiques.....	93
1.2.	Mutations et facteurs pronostiques	94
2.	Séquence optimale d'administration du talazoparib et du carboplatin <i>in vivo</i>	100
2.1.	Projet pilote	100
2.2.	Étude expérimentale.....	105
2.2.1.	MDAMB231.....	105
2.2.1.1.	Croissance tumorale primaire.....	106
	Efficacité thérapeutique différentielle des trois cohortes	106
	Efficacité thérapeutique de la cohorte A	112
2.2.1.2.	Développement de métastases	114
	Efficacité thérapeutique différentielle des trois cohortes	114
	Efficacité thérapeutique de la cohorte A	116
2.2.1.3.	Toxicité.....	117
	Toxicité différentielle des trois cohortes	117
	Toxicité de la cohorte A	120
2.3.	HCC1806.....	124

2.3.1.	Croissance tumorale primaire.....	124
2.3.2.	Toxicité.....	126
Chapitre 4 –	DISCUSSION	129
1.	Implications cliniques de la signature génétique de 63 gènes.....	129
1.1.	Expression génique et facteurs pronostiques.....	129
1.2.	Mutations et facteurs pronostiques	129
2.	Séquence optimale d'administration du talazoparib et du carboplatin <i>in vivo</i>	131
2.1.	Projet pilote	131
2.2.	Étude expérimentale.....	135
2.2.1.	Croissance tumorale primaire.....	135
2.2.2.	Développement de métastases	139
2.2.3.	Toxicité.....	141
2.3.	Conclusion.....	142
Références bibliographiques	147

Liste des tableaux

Tableau 1. Lésions prolifératives à haut risque de cancer du sein. Adapté de Kumar et al.(36)	33
Tableau 2. Sous-types histologiques principaux du carcinome mammaire infiltrant(46).	34
Tableau 3. Sous-groupes intrinsèques du cancer du sein(61, 63).	40
Tableau 4. Score de récurrence et bénéfice de la chimiothérapie(67).	41
Tableau 5. Classification de la tumeur primaire. Adapté de la huitième édition du manuel de l'AJCC (American Joint Committee on Cancer)(55)	45
Tableau 6. Classification clinique de l'envahissement ganglionnaire. Adapté de la huitième édition du manuel de l'AJCC(55)	47
Tableau 7. Classification pathologique de l'envahissement ganglionnaire. Adapté de la huitième édition du manuel de l'AJCC(55)	48
Tableau 8. Classification de l'envahissement métastatique à distance. Adapté de la huitième édition du manuel de l'AJCC(55)	49
Tableau 11. Activité du véliparib, de l'olaparib et du talazoparib(136, 137).	68
Tableau 12. Gènes de la signature génétique et voies cellulaires fonctionnelles associées. Adapté de Hassan et al.(146)	73
Tableau 13. Description des cohortes employées pour l'évaluation de la signature génétique(160-162).	79
Tableau 14. Concentrations de cellules injectées pour chaque étape de l'étude.	83
Tableau 15. Caractéristiques moléculaires des lignées cellulaires et mutations somatiques de gènes associés au cancer du sein(91, 146, 174, 175).	83
Tableau 16. Association entre la signature d'expression génique et les facteurs pronostiques	94
Tableau 17. Analyse de survie chez les patientes ayant une mutation dans au moins un des 63 gènes par rapport aux patientes sans mutation	96
Tableau 18. Proportion de souris atteintes de micrométastases pulmonaires pour le projet pilote.	103
Tableau 19. Formule sanguine complète des souris du pilote 2.	105

Tableau 20. Différences de volumes tumoraux médians entre chaque combinaison de traitement et le groupe contrôle pour MDAMB231.	108
Tableau 22. Proportion de souris avec des métastases dans le projet pilote comparativement à Iorns et al.(166)	133
Tableau 23. Résumé des études évaluant un sel de platine combiné à un inhibiteur de PARP.	136

Liste des figures

Figure 1. Le sein adulte	28
Figure 2. Représentation schématique des ganglions régionaux du sein	29
Figure 3. Représentation de différentes catégories de tumeurs primaires selon la classification TNM.	46
Figure 4. Structures du cisplatine et du carboplatine. Adapté de Weber(105).	54
Figure 5. Mécanismes de réparation de l'ADN. Adapté de Lord et Ashworth(121).	56
Figure 6. Fonctions des protéines PARP. Adapté de Sonnenblick et al.(84)	61
Figure 7. Fonction de PARP1	62
Figure 8. Architecture des domaines de PARP1. Adapté de McCann et al.(126) et Dawicki et al.(127)	63
Figure 9. Létalité synthétique de l'activité des inhibiteurs de PARP. Adapté de Brower(134). .	65
Figure 10. Séquestration des complexes PARP-ADN. Inspiré de Murai et al.(128)	66
Figure 11. Potentiel de séquestration des différents inhibiteurs de PARP. Adapté de Lord et al. 2017(130)	67
Figure 12. Structure du véliparib, de l'olaparib et du talazoparib.(136, 137).	67
Figure 13. Développement de la signature génétique de 63 gènes. Adapté de Beniey et al.(150)	72
Figure 14. Glandes mammaires des souris. Adapté de Finn et al.(176)	84
Figure 15. Xénotreffes orthotopiques	85
Figure 16. Séquences de traitement des trois cohortes A, B et C	87
Figure 17. Données principales de l'étude	88
Figure 18. Proportion de patientes avec des mutations parmi les différents sous-groupes intrinsèques	95
Figure 19. Survie spécifique au cancer du sein chez les patientes avec et sans mutation dans au moins un des 63 gènes	97
Figure 20. Proportion d'échantillons tumoraux mutés dans différents contextes cliniques	98

Figure 21. Proportion d'échantillons métastatiques avec des mutations pour différents sites de métastases	99
Figure 22. Gènes fréquemment mutés parmi les cohortes avec des fréquences mutationnelles élevées.....	100
Figure 23. Croissance tumorale par souris pour le projet pilote	101
Figure 24. Volumes tumoraux moyens pour le projet pilote.....	102
Figure 25. Envahissement métastatique des souris du projet pilote	103
Figure 26. Photographies des tumeurs, poumons et foies du projet pilote.....	104
Figure 27. Réponse tumorale primaire pour les trois cohortes MDAMB231.	107
Figure 28. Réponse tumorale primaire pour chacune des cohortes MDAMB231.....	109
Figure 29. A) Réponse tumorale primaire à la nécropsie et B) photographies de tumeurs représentatives pour les trois cohortes MDAMB231.....	111
Figure 30. Réponse tumorale primaire chez la cohorte A MDAMB231.....	113
Figure 31. Réponse tumorale primaire au jour de la nécropsie chez la cohorte A MDAMB231.	114
Figure 32. Réponse tumorale métastatique au niveau pulmonaire pour l'ensemble des cohortes de traitement MDAMB231.	115
Figure 33. Réponse tumorale métastatique chez la cohorte A MDAMB231.....	116
Figure 34. Effet des trois séquences de traitement sur le poids moyen pour MDAMB231.....	117
Figure 35. Différences de poids entre les trois séquences de traitement pour MDAMB231. .	118
Figure 36. Toxicité hématologique des trois séquences de traitement pour MDAMB231.....	120
Figure 37. Poids moyen en fonction des jours post injection pour la cohorte A MDAMB231.	121
Figure 38. Différences de poids pour la cohorte A MDAMB231.	122
Figure 39. Toxicité hématologique chez la cohorte A.	123
Figure 40. Croissance tumorale primaire pour HCC1806.	124
Figure 41. Réponse tumorale primaire à la nécropsie pour HCC1806.	125
Figure 42. Poids moyen en fonction des jours post injection pour HCC1806.....	126
Figure 43. Différence de poids pour HCC1806.....	127

Liste des sigles et abréviations

53BP1: p53 binding protein 1

ADN : acide desoxyribonucléique

ADP: Adenosine diphosphate

AJCC : American Joint Committee on Cancer

AKT: (v-akt murine thymoma viral oncogene homologue)

AKT1: AKT Serine/Threonine Kinase 1

AP: apurinique/aprimidinique

APC: Adenomatous Polyposis Coli

ARID1A: AT-Rich Interaction Domain 1A

ARID2: AT-Rich Interaction Domain 2

ARN : acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messenger

ART: ADP-ribosyltransferase

BRCT: BRCA1 C-terminus

ASXL1: ASXL Transcriptional Regulator 1

ATCC: American Type Culture Collection

ATM: Ataxia-Telangiectasia mutated

BAP1: BRCA1 Associated Protein 1

BL1: Basal Like 1

BL2: Basal Like 2

BRCA1: breast cancer gene 1

BRCA2: breast cancer gene 2

BRCT: BRCA1 Terminus

C: concentration

c-ABL: v-abl Abelson murine leukaemia viral oncogene homologue 1

CDH1: Cadherin 1

CHUM: Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

Da : dalton

dATP: désoxyadénosine triphosphate

dTTP: désoxythymidine triphosphate

dGTP: désoxyguanosine triphosphate

dCTP: désoxycytidine triphosphate

dl: degrés de liberté

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

ECM: extracellular matrix

ER : Estrogen Receptor

ERCC1: Excision Repair Cross-Complementing Protein 1

ERK: extracellular signal-regulated kinase

F: finger

FBS: Fetal Bovine Serum

FDA: Food and Drug Administration

FDR: False discovery rate

GATA3: GATA Binding Protein 3

GEMM: Genetically Engineered Mouse Models

H2b: histone 2B

H1: histone 1

HD: Helical Domain

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HOXB13: homeobox B13

HR: Hazard Ratio

IC : intervalle de confiance

IC50: inhibitory concentration 50

IL17BR: interleukine 17B receptor

IL(2, 4, 7, 9, 15, 21): interleukine (2, 4, 7, 9, 15, 21)

IM: immunomodulateur

IMC: indice de masse corporelle

JNK: c-Jun NH2-terminal kinase

Ki67: Kiel 67

KRAS: Kirsten rat sarcoma 2 viral

LAR: low androgen receptor

M: mesenchymal

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MAP2K4: Mitogen-activated protein kinase kinase 4

mESC: mouse embryonic stem cells

METABRIC: Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium

MINDACT: Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy

MLH1: MutL homolog 1

MLL2: Mixed-lineage Leukemia 2

MLL3: Mixed-lineage Leukemia 3

MN: moyenne normale

MSKCC: Memorial Sloan Kettering Cancer Center

MSL: Mesenchymal Stem-Like

MSH2: MutS Homolog 2

na: non applicable

NAD⁺ : Nicotinamide Adenide Dinucleotide

NF1: neurofibromatosis type 1

NLS: Nuclear localization site

NUDT5: nudix-type modif 5

p53: protein p53

PAR: Poly ADP-Ribose

PARP: Poly(ADP-Ribose) Polymérase

PARPi : inhibiteur de PARP

PALB2: Partner And Localizer of BRCA2

PAM50: Predictor Analysis of Microarray 50

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

Phase G0: phase gap 0

Phase G1: phase gap 1

Phase G2: phase gap 2

Phase M: phase de mitose

Phase S: phase de synthèse

PR : Progesterone Receptor

PTEN: Phosphatase And Tensin Homolog

RB1: Retinoblastoma Transcriptional corepressor 1

RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

SETD2: SET domain-containing 2

SF3B1: Splicing Factor 3b Subunit 1

SG: survie globale

SMAD4: small mothers against decapentaplegic 4

STK11: Serine/threonine kinase 11

STR: Single Tandem Repeat

SSP: survie sans progression

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TLE1: transducin-like enhancer protein 1

TP53: tumor protein p53

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

WGR: tryptophan-glycine–arginine-rich

Wnt: Wingless-related integration site

XRCC1 : X-Ray Repair Cross Complementing 1

Remerciements

Je remercie tout d'abord ma superviseuse, Dre Saima Hassan, clinicienne-chercheuse à l'Université de Montréal qui m'a accueillie dans son laboratoire les bras ouverts. Dre Hassan, sans vous ce mémoire n'aurait tout simplement pas eu lieu. Merci de m'avoir appris toutes les bases de la recherche, le raisonnement scientifique, la rigueur scientifique, le travail soigné, la patience, l'honnêteté intellectuelle, l'endurance et de m'avoir guidé dans ce projet. Je remercie Dre Takrima Haque, assistante de recherche, pour son soutien et son aide précieuse dans la mise au point des expériences et la résolution de nombreux défis. Merci pour ta patience, tes conseils et ton amitié. Merci à Korotoum Welle Diallo, étudiante au baccalauréat pour son assistance lorsque j'avais besoin de renfort pour mes expériences.

Je tiens également à remercier les professionnels de la plateforme de l'animalerie du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) pour leur temps, ressources et efforts. La plateforme de l'animalerie a joué un rôle prépondérant pour l'exécution de mes expériences et a été très réactive pour trouver des solutions aux problèmes. Je remercie particulièrement Suzanne Vincent qui a été la technicienne principale sur mon projet de maîtrise, Dre Maryse Boulay et Dre Hélène Héon, les vétérinaires. Merci à Geneviève Lauzon pour tous ses enseignements et pour le don de soi. Merci à Alice Michallet-Roy et à tous les autres techniciens pour leur patience et leur contribution toujours dans la bonne humeur et le respect.

Merci à Marguerite Buchanan (laboratoire du Dr Mark Basik, Lady Davis Institute) qui a apporté son expérience et ses conseils pratiques pour tout ce qui a trait aux souris.

Je souhaite également signifier ma gratitude aux laboratoires voisins du CRCHUM qui m'ont offert plusieurs précieux conseils en partageant leur expertise. Un énorme merci au laboratoire d'Anne-Marie Mes-Masson, notamment à Kim Leclerc-Desaulniers qui a répondu à mes nombreuses questions logistiques et m'a aidé à bâtir les bases de mon protocole logistique. Merci à la plateforme de pathologie moléculaire, notamment à Gabriella, Véronique et Liliane pour leur

grande disponibilité et leur flexibilité. Merci à Dr Roy Hajjar pour son aide. Un grand merci à Dr Rodier et à son laboratoire pour avoir répondu à mes questions et pour leur générosité. Je tiens à remercier Dre Dominique Trudel et Feryel Azzi pour leur temps, réflexion et leurs conseils lors de l'optimisation de l'analyse pathologique. Merci beaucoup à tous pour les prêts de matériel.

Merci au laboratoire de Dr Louis Gaboury pour sa contribution aux analyses et à Dr Danh Tran-Thanh, pathologiste au CHUM pour la lecture des lames H and E.

Je remercie tous mes excellents directeurs de programme qui se sont penchés personnellement sur mon parcours et ont eu à cœur mes objectifs. Merci pour la défense des intérêts et ambitions des résidents, sans vous tout aurait été plus ardu. Merci infiniment à Dr Dang Nguyen, directeur du programme de clinicien-chercheur (PCC), pour son écoute, sa sagesse et sa bienveillance, son temps et sa recherche de solution. Merci à Dr Pierre Dubé, directeur de programme de chirurgie générale pour son soutien complice et sa présence dans tous les moments clés. Merci à Dr Jacques Lacroix, ancien directeur du PCC et personne de confiance pour son orientation et son dévouement.

Enfin, je tiens à dire un grand merci à mes parents, ma famille et à Luc Anthony pour leur présence, leur oreille attentive, leur foi, leurs conseils et leur patience dans tous les moments où je célébrais des victoires, m'inquiétais pour des défis, ou quand je rédigeais et je travaillais au lieu d'être disponible pour eux.

Chapitre 1 – INTRODUCTION

1. Le cancer du sein

1.1. Épidémiologie du cancer du sein

À l'échelle mondiale, le cancer du sein est le deuxième cancer le plus fréquent avec environ 2.1 millions de nouveaux cas en 2018(1). Au Canada, une femme sur huit sera atteinte du cancer du sein au cours de sa vie(2). Le cancer du sein compte pour 25% de tous les nouveaux cas annuels de cancer(2). Les taux d'incidence les plus élevés sont en Amérique du Nord, en Australie/Nouvelle-Zélande et en Europe occidentale et septentrionale(3). Les plus faibles taux se situent en Asie et en Afrique subsaharienne. Ces différences internationales sont vraisemblablement liées aux changements sociétaux résultant de l'industrialisation(4). Pour l'année 2020 aux États-Unis le nombre de nouveaux cas estimés de cancers du sein s'élève à 276 480 nouveaux cas(5).

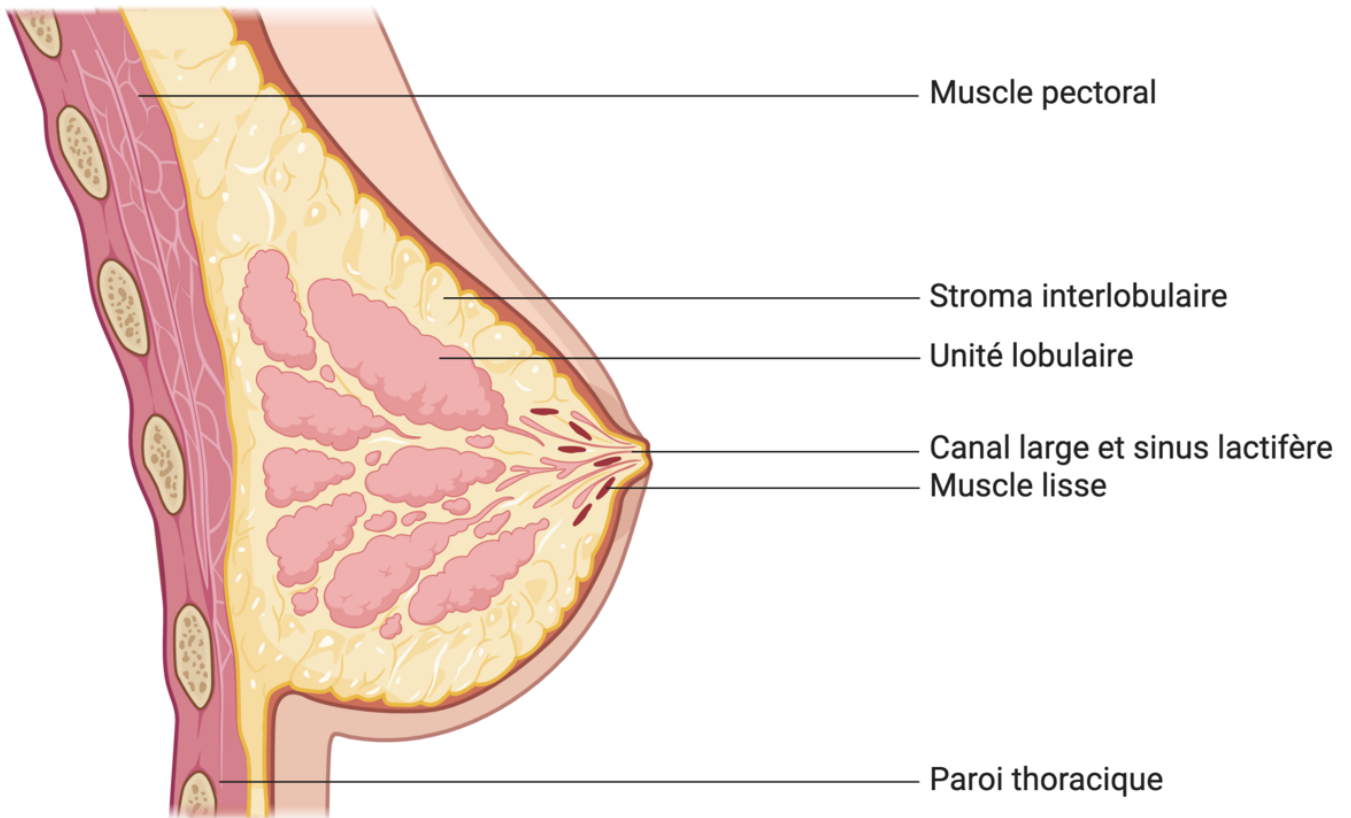
Le cancer du sein est aussi la cinquième cause de décès chez les femmes dans le monde (627 000 décès)(1). Il est responsable de 15% des décès(1). Chaque jour, 14 femmes canadiennes meurent du cancer du sein(2).

1.1. Anatomie du sein

1.1.1. Anatomie fonctionnelle et histologie

Le sein (**Figure 1**) comprend trois structures principales : la peau, le tissu sous-cutané et le tissu mammaire, qui est composé à la fois d'éléments épithéliaux et stromaux. Les éléments épithéliaux sont des canaux de ramification qui relient les unités structurales et fonctionnelles du sein (les lobules) au mamelon.

Figure 1. Le sein adulte



**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Chaque lobule du sein se termine dans un canal lactifère majeur (2–4 mm de diamètre) qui s'ouvre par un orifice rétréci (0.4–0.7 mm de diamètre) dans l'ampoule du mamelon(6). Chaque canal majeur se termine dans une portion dilatée appelée un sinus lactifère. Les sinus lactifères sont recouverts d'épithélium squameux stratifié. Les canaux majeurs sont recouverts de deux couches de cellules cubiques. Les canaux mineurs sont recouverts d'une seule couche de cellules cubiques.

1.1.2. Vascularisation sanguine et lymphatique

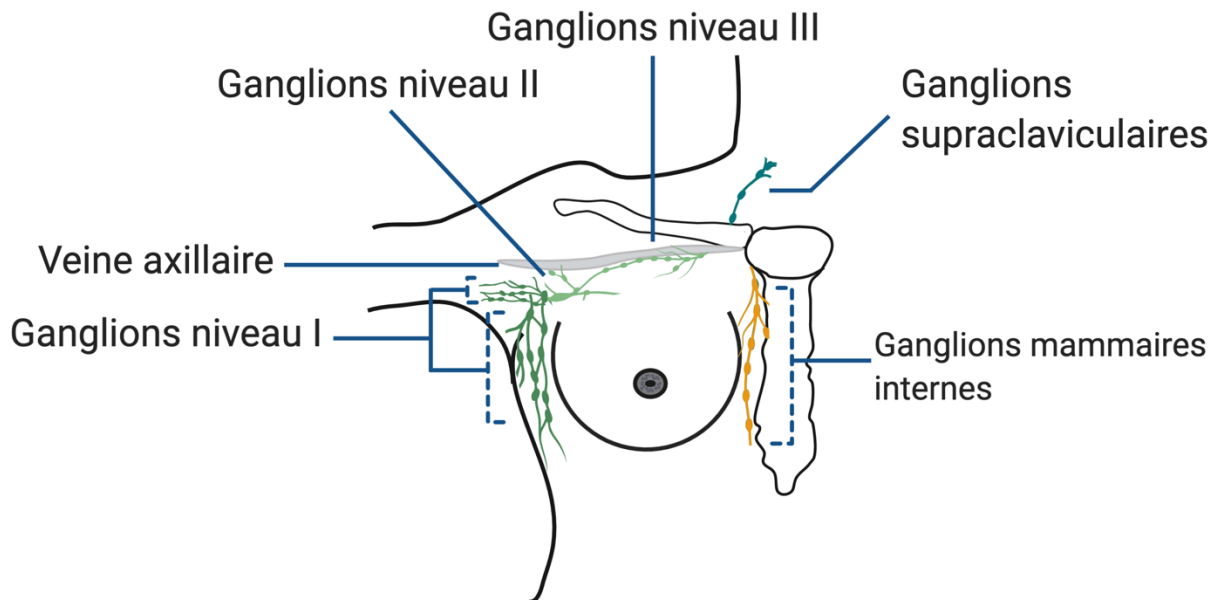
Le sein reçoit son apport sanguin principal de: a) branches perforantes de l'artère mammaire interne; b) branches latérales des artères intercostales postérieures; c) branches de l'artère axillaire(6). Ces dernières incluent les branches de l'artère thoracoacromiale.

Les veines du sein et de la paroi thoracique suivent le parcours des artères. Le drainage veineux se jette dans l'aisselle. Les trois principales branches veineuses sont: a) les branches perforantes

de la veine thoracique interne; b) les branches perforantes des veines intercostales postérieures; et c) les tributaires de la veine axillaire(6).

Les ganglions sont classés selon une nomenclature organisée en trois niveaux: niveau I, niveau II et niveau III (**Figure 2**). Les ganglions situés latéralement et inférieurement au rebord du petit pectoral sont dits de niveau I. Cela inclut les ganglions des groupes: latéral, antérieur et postérieur. Les ganglions situés postérieurement au petit pectoral et inférieurement à la veine axillaire appartiennent au niveau II. Cela inclut les groupes: central et interpectoral. Les ganglions situés médialement ou supérieurement au rebord du petit pectoral appartiennent au niveau III. Ils sont inférieurs à la clavicule. Cela inclut le groupe sous-claviculaire. Plus de 75% du drainage lymphatique du sein va dans l'aisselle. Le reste est surtout dérivé de l'aspect médial du sein et se dirige vers les ganglions parasternaux (i.e., mammaires internes).

Figure 2. Représentation schématique des ganglions régionaux du sein



**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Légende : Les ganglions de niveau I sont latéro-inférieurs au petit pectoral, les ganglions de niveau II sont postérieurs au petit pectoral, les ganglions de niveau III sont médiaux ou supérieurs au petit pectoral.

1.2. Facteurs de risque du cancer du sein

1.2.1. Facteurs de risque démographiques et métaboliques

Le risque de cancer du sein augmente avec l'âge. Aux États-Unis, La probabilité de développer le cancer du sein pour une femme passe de 2% avant 49 ans à 6.7% à partir de 70 ans(5). La hausse du taux d'incidence de cancer du sein aux États-Unis coïncide avec une baisse des taux de fertilité et une augmentation des cas d'obésité(5). Un indice de masse corporel élevé ou un gain de poids dans le contexte de la périménopause est fortement associé à un risque accru de développer le cancer du sein(7-10). Cela pourrait être expliqué par des concentrations sériques d'œstrogènes plus élevées résultant de la conversion des lipides des tissus adipeux en œstrogène(11).

Facteurs de risque hormonaux

Chez les femmes pré-ménopausées et post-ménopausées, des concentrations endogènes d'œstrogènes élevées augmentent le risque de cancer du sein(12-14). Cela est particulièrement avéré pour les cancers hormonosensibles, ayant une surexpression des récepteurs d'œstrogènes (ER). La prise d'œstrogènes exogènes contribue également au développement du cancer du sein, notamment la pilule contraceptive et l'hormonothérapie de remplacement à long terme(15).

Un autre facteur de risque est la haute densité mammaire. La densité mammaire est une mesure de l'étendue du tissu fibroglandulaire radiodense par rapport à celle du tissu adipeux. À la mammographie (i.e., radiographie du sein), les femmes ayant une densité mammaire élevée (i.e., $\geq 75\%$ de tissu dense) ont jusqu'à cinq fois plus de risque de cancer du sein comparativement aux femmes du même âge ayant moins de tissu dense(16). Cette association augmente avec la densité mammaire(16).

En termes de facteurs de risque liés à la reproduction, une ménarche précoce et une ménopause tardive augmentent la probabilité de cancer du sein(17, 18). Dans une étude, avec chaque année de délai de début de la ménarche, une réduction de 5% du risque de cancer du sein fut démontrée(18). La nulliparité est également un facteur de risque ainsi qu'un âge avancé lors de la première grossesse(19).

1.2.2. Facteurs de risque environnementaux et habitudes de vie

Le risque populationnel attribuable à la consommation d'alcool varie de 2% à 11% selon le pays(20-22). Le risque de cancer du sein est plus élevé autant chez les femmes qui consomment beaucoup d'alcool (≥ 3 verres par jour) que celles qui en consomment peu (< 1 verre par jour)(23, 24). Il y a une relation dose-effet significative à partir de consommations aussi faibles que trois à six verres par semaine. De fortes consommations épisodiques, en particulier chez les consommatrices modérées d'alcool, semblent conférer un risque aux femmes qui ont une sœur ayant des antécédents de cancer du sein(25).

Plusieurs études démontrent également une augmentation modeste du risque de cancer du sein avec le tabagisme (26, 27). Le risque est présent notamment chez les fumeuses de longue date.

Par ailleurs, deux études principales démontrent une association entre le travail nocturne et le cancer du sein(28, 29).

L'exposition aux rayonnements ionisants de la poitrine à un jeune âge, comme cela se produit chez les survivants de cancer, de bombe atomique ou d'accident de centrale nucléaire (i.e., Chernobyl), est associée à un risque accru de cancer du sein(30, 31).

1.2.3. Facteurs de risque génétiques héréditaires

Le cancer du sein est le plus souvent sporadique mais dans environ 5% des cas, il est attribuable à des mutations génétiques spécifiques héréditaires(32). Les gènes les plus souvent impliqués sont BRCA1, BRCA2, p53, RAD51C, RAD51D, STK11, CDH1, PALB2, PTEN, CHEK2 et les gènes de réparation des mésappariements. Ces gènes sont impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN.

Des mutations germinales dans les gènes BRCA1/2 (BRCA1 ou BRCA2) comptent pour 15% des cancers du sein familiaux chez les femmes(33). BRCA1 et BRCA2 sont deux gènes suppresseurs de tumeur prédisposant au cancer du sein et situés sur les chromosomes 17 et 13 respectivement. Ils sont cruciaux pour la recombinaison homologue de l'ADN(34). La recombinaison homologue de l'ADN est un mécanisme de réparation des bris à l'ADN double-brin(35). C'est le mécanisme le plus fiable de réparation. La pénétrance des gènes BRCA1/2 varie de 30% à 90% selon la mutation

spécifique(36) et le mode de transmission est autosomal dominant. Les femmes atteintes développent le cancer à un jeune âge, le plus souvent. Le risque cumulatif de cancer du sein à 80 ans est de 72% (IC 95% 65–79) pour le gène BRCA1 et 69% (IC 95% 36–53) pour BRCA2(37). La fréquence de cette mutation est particulièrement accrue chez les juifs Ashkénazes(38).

Lorsque les gènes BRCA1/2 sont mutés, d'autres formes de réparation de l'ADN surviennent et peuvent résulter en des erreurs dans la réparation, introduisant des mutations. Lorsque ces mutations surviennent dans des gènes associés au cancer, elles entraînent la tumorigenèse(35). D'autres fonctions des gènes BRCA semblent aussi impliquées dans la suppression tumorale, telles que le remodelage de la chromatine et le contrôle de la transcription(35, 39). Les tumeurs des femmes ayant une mutation germinale BRCA présentent une instabilité génomique, caractérisée par une fréquence élevée de délétions de l'ADN et de réarrangements chromosomiques(35).

1.3. Risque de cancer du sein

1.3.1. Lésions à haut risque

Certains de ces changements prolifératifs sont à haut risque (**Tableau 2**) car les cellules présentent de l'atypie (i.e., anomalie structurelle cellulaire). Les lésions prolifératives avec atypie comprennent l'hyperplasie canalaire atypique, l'hyperplasie lobulaire atypique et le carcinome lobulaire *in situ*. Ces lésions sont considérées à haut risque car elles sont associées à une augmentation du risque futur de cancer du sein infiltrant, dit aussi cancer du sein invasif (i.e., lorsque les cellules cancéreuses ont migré à l'extérieur du canal)(40).

Tableau 1. Lésions prolifératives à haut risque de cancer du sein. Adapté de Kumar et al.(36)

Lésion	Histologie	Risque de cancer
Hyperplasie canalaire atypique	Prolifération uniforme de cellules épithéliales monomorphes et régulièrement espacées. Similaire au carcinome canalaire <i>in situ</i> . Limitée en étendue(36).	Risque relatif égal à 4(41).
Hyperplasie lobulaire atypique	Prolifération de cellules dyscohésives avec un noyau rond et un petit nucléole, identiques au carcinome lobulaire <i>in situ</i> . Limitée à moins de 50% des acini dans un lobule. Peut aussi impliquer les canaux contigus(36).	Risque relatif égal à 4(41).
Carcinome lobulaire <i>in situ</i>	Cellules dyscohésives avec un noyau rond et un petit nucléole. Les cellules n'ont pas la protéine d'adhérence E-cadhérine, résultant en des cellules libres les unes des autres. Distorsion architecturale rare(36).	Risque relatif égal à 6.9(42).

Certaines évidences supportent le fait que ces lésions sont des précurseurs directs de cancer car elles coexistent dans une proportion élevée de cas de cancer du sein(43, 44). Cependant le cancer du sein peut survenir dans une région distincte ou même dans le sein controlatéral, donc ces lésions sont considérées comme des facteurs de risque en clinique(44). La perte de l'hétérozigosité est rarement détectée au sein des changements prolifératifs sans atypie mais est plus fréquente chez les lésions prolifératives atypiques. Les caractéristiques morphologiques et biologiques de ces lésions ressemblent beaucoup à celles des carcinomes infiltrants(44).

1.3.2. Cancer pré-invasif

La plupart des cancers du sein proviennent d'éléments épithéliaux et sont classés comme des carcinomes. Les carcinomes du sein constituent un groupe de lésions diverses qui diffèrent par leur aspect microscopique et leur comportement biologique.

1.3.3. Carcinomes *in situ*

Les carcinomes canauxiers *in situ* (CCIS) englobent un groupe hétérogène de lésions qui diffèrent par leur présentation clinique, leur aspect histologique et leur potentiel biologique. Le CCIS est caractérisé par la prolifération de cellules épithéliales malignes dans le système canalaire mammaire, sans aucune preuve d'invasion dans le stroma environnant lors d'un examen au microscope optique(45). Le carcinome canalaire *in situ* diffère du carcinome lobulaire *in situ* en ce qui concerne ses caractéristiques radiologiques, sa morphologie et son comportement biologique.

1.3.4. Carcinomes infiltrants

Les carcinomes mammaires infiltrants se composent de plusieurs sous-types histologiques (Tableau 2).

Tableau 2. Sous-types histologiques principaux du carcinome mammaire infiltrant(46).

Types de cancer du sein	Prévalences estimées(46)
Carcinome canalaire infiltrant	76%
Carcinome lobulaire infiltrant	8%
Carcinome canalaire/lobulaire	7%
Carcinome mucineux	2.4%
Tubulaire	1.5%
Médullaire	1.2%
Papillaire	1%
Autres (métaplasique, micropapillaire)	5%

Les deux sous-types principaux sont le carcinome canalaire infiltrant et le carcinome lobulaire infiltrant. Le carcinome canalaire infiltrant (CCI) est le plus commun des carcinomes infiltrants (70 à 80%)(36). Il est également appelé carcinome infiltrant sans type particulier ou carcinome infiltrant non spécifié(36). À la macroscopie, ces lésions sont généralement des masses dures, irrégulières granuleuses qui envahissent les tissus environnants en forme caractéristique d'étoile. Elles sont caractérisées au microscope par des cordons et des nids de cellules tumorales avec des quantités variables de formations glandulaires. Les cellules malignes induisent de la fibrose lorsqu'elles infiltrent le parenchyme mammaire. Cette réaction est responsable de la masse cliniquement palpable et de la densité radiologique des CCI.

Les carcinomes canaux infiltrants sont divisés en trois catégories basées sur une combinaison de caractéristiques architecturales et cytologiques, généralement évaluées à l'aide d'un système de notation basé sur trois paramètres(47) :

- Différencié (grade 1) : cellules qui s'infiltrent dans le stroma sous forme de nids de glandes solides. Les noyaux sont relativement uniformes, avec peu ou pas d'activité mitotique.
- Modérément différencié (grade 2) : cellules qui s'infiltrent sous forme de nids solides avec une certaine différenciation glandulaire. Il existe un certain pléomorphisme nucléaire et un taux de mitotique modéré.
- Faiblement différenciées (grade 3) : nids solides de cellules néoplasiques sans formation de glandes. Il existe une atypie nucléaire marquée et une activité mitotique considérable.

Les carcinomes lobulaires infiltrants constituent le deuxième type de cancer du sein invasif le plus fréquent, représentant environ 5 à 10% des lésions invasives. Ces tumeurs sont caractérisées au microscope par de petites cellules qui s'infiltrent insidieusement dans le stroma mammaire et le tissu adipeux, individuellement. Elles se développent souvent dans une configuration de type cible autour des canaux mammaires normaux, n'induisant souvent qu'une réaction fibreuse minime.

Il existe une association entre les mutations du gène de la cadhérine (CDH1) et les carcinomes lobulaires infiltrants. Plus de la moitié des carcinomes lobulaires contiennent des altérations dans

l'un des trois gènes clés de la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase, PIK3CA, PTEN et AKT1, et 56% des cancers du sein lobulaires sporadiques contiennent des mutations de E-cadhérine(48).

1.4. Facteurs pronostiques du cancer du sein

Un facteur pronostique donne de l'information sur l'issue clinique d'un patient au moment du diagnostic.

1.4.1. Statut des récepteurs cellulaires

1.4.1.1. Récepteurs des hormones stéroïdiennes

Les hormones jouent un rôle important dans le développement et la progression du cancer du sein. L'œstrogène, les métabolites de l'œstrogène et les autres hormones stéroïdiennes comme la progestérone, sont des hormones stéroïdiennes associées au développement du cancer du sein(6, 49). Ces hormones sont impliquées dans la régulation de la croissance et de la différenciation du tissu épithélial mammaire normal(49). Le risque de cancer du sein est augmenté quand l'exposition aux hormones est prolongée ou à haute dose(49).

La molécule d'œstrogène hydrophobe diffuse à travers la membrane cellulaire. L'œstrogène se lie alors à ER-alpha, localisé soit dans le cytoplasme soit dans le noyau cellulaire. La liaison entraîne un changement de conformation du récepteur, celui-ci se dimérise et le dimère est transloqué à travers la membrane nucléaire. Le dimère lie, dans le noyau, des facteurs de transcription spécifiques et interagit avec l'ADN pour activer ou inhiber la transcription de gènes impliqués dans la réponse aux œstrogènes(49).

Le récepteur ER-alpha peut aussi se localiser à la membrane plasmique(49). Ainsi, il est capable d'initier des voies de signalisation cellulaire via l'activation de kinases. Via l'activation de second messagers issus d'une cascade de signalisation, cela résulte en la stimulation de la prolifération cellulaire et la suppression de l'apoptose(49).

L'évaluation de la surexpression des récepteurs d'œstrogène et de progestérone détermine un statut pour ces récepteurs. Initialement, une évaluation biochimique de la tumeur fraîche était réalisée(6). Aujourd'hui, cependant, les récepteurs d'œstrogènes et de progestérone sont évalués par immunohistochimie sur des tissus enrobés en paraffine. L'état des récepteurs hormonaux

peut également être mesuré dans les échantillons obtenus par biopsie à l'aiguille fine ou au trocart, ce qui peut aider à orienter la planification du traitement(6). Les tests de dépistage des récepteurs d'œstrogène et de progestérone doivent être effectués sur tous les spécimens de cancer du sein primaire infiltrant et pour le carcinome canalaire *in situ*(49). Les cancers du sein qui ont 1% et plus de cellules marquées positivement pour les récepteurs sont considérés positifs pour les récepteurs hormonaux(49).

1.4.1.2. Récepteurs du facteur de croissance HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*)

Le HER2 est le récepteur d'un facteur de croissance faisant partie de la famille des récepteurs EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). La liaison du ligand entraîne l'homodimérisation du récepteur et sa phosphorylation par des domaines tyrosine kinase(6). La phosphorylation par les tyrosines kinases entraîne une transduction de signal qui résulte en des changements dans la cellule(6).

Lorsqu'il est surexprimé en cancer du sein, HER2 favorise une croissance et une prolifération accrues, et augmente les capacités invasives et métastatiques. Des études ont montré que les patientes présentant une surexpression de HER2 avaient des hauts taux de prolifération, et une augmentation du risque de récurrence et de décès(6, 50).

La détermination du statut HER2 est également recommandée de routine pour tous les cancers du sein infiltrants (51). On dit que le statut HER2 d'une tumeur est soit positif (i.e., HER2 surexprimé), soit négatif. Ce statut peut être déterminé par la quantification du nombre de copies du gène HER2 au moyen de l'hybridation *in situ* ou par immunohistochimie. HER2 est positif lorsqu'au moins 10% des cellules tumorales évaluées par immunohistochimie ont un marquage membranaire homogène d'HER2 ou que le gène HER2 est amplifié par hybridation *in situ*(51).

La surexpression de HER2 (i.e., tumeurs HER2-positives) est donc synonyme de mauvais pronostic(50, 52). La surexpression de HER2 prédit également une bonne réponse aux thérapies ciblées anti-HER2(51).

1.4.2. Facteurs pronostiques pathologiques

- Taille de la tumeur : la taille de la tumeur (T), représente le plus grand diamètre de la tumeur primaire au niveau du sein. Elle a été reconnue très tôt comme un facteur pronostique important dans le cancer du sein(53).
- Envahissement ganglionnaire : l'envahissement ganglionnaire (i.e., dissémination des cellules tumorales dans la chaîne ganglionnaire qui draine la lymphe du sein) est un facteur de mauvais pronostic fort et indépendant(5).
- Métastases à distance : la présence de métastases à distance est un facteur de mauvais pronostic(5).
- Grade tumoral : le grade du cancer du sein est attribué selon le système de classification Elston-Ellis, qui caractérise le degré de différenciation de la tumeur par le pourcentage de formation de tubules, le pléomorphisme nucléaire et l'activité mitotique(54). Pour chacun des éléments, le grade histologique combiné de Nottingham attribue un score allant de 1 (favorable) à 3 (non favorable)(55).
- Envahissement lymphovasculaire : la détection de cellules tumorales dans les espaces lymphatiques ou les vaisseaux sanguins dans la zone péri-tumorale est un marqueur de développement métastatique potentiel car c'est une étape de la migration des cellules tumorales dans les ganglions ou organes à distance(56). Cela est associé à un mauvais pronostic(56).
- Réponse pathologique à la chimiothérapie néoadjuvante (i.e., préopératoire): une réponse pathologique complète à la chimiothérapie néoadjuvante (i.e., absence de tumeur) est un facteur pronostique important. La réponse pathologique complète est associée à une survie sans maladie et une survie globale favorables chez les cancers de stade précoce(57-59).
- Sous-type histologique: le taux de survie à 30 ans des femmes atteintes de carcinomes invasifs de types spéciaux (tubulaire, mucineux, médullaire, lobulaire et papillaire) est de plus de 60%, comparativement à moins de 20% pour les femmes avec un carcinome canalaire(36, 60).

1.4.3. Facteurs pronostiques génomiques

L'hétérogénéité cellulaire et moléculaire du cancer du sein, tout comme le grand nombre de gènes impliqués dans la croissance, la mort et la différenciation des cellules indiquent l'importance d'étudier les multiples altérations génétiques ensemble. Le profilage général de l'expression des gènes permet de mesurer simultanément l'activité (i.e., expression) de milliers de gènes dans une cellule de cancer du sein. Basé sur l'expression génique, plusieurs classifications des cancers du sein existent dans la littérature.

1.4.3.1. *Classification en sous-groupes intrinsèques (PAM50)*

Les études sur l'expression des gènes ont permis d'identifier plusieurs sous-types distincts de cancer du sein qui diffèrent sensiblement en termes de pronostic et de cibles thérapeutiques exprimées. La liste des gènes qui différencient ces sous-groupes est appelée la liste intrinsèque. Elle est composée de plusieurs groupes de gènes relatifs à l'expression des récepteurs d'œstrogènes (i.e., le groupe luminal), à l'expression de HER2 et à celle d'un groupe unique de gènes appelé le groupe basal. D'autres gènes sont en cours d'identification car les chercheurs continuent d'étudier les données génomiques dérivées des échantillons de cancer du sein.

Les sous-groupes intrinsèques se séparent en deux groupes qui correspondent à l'expression de gènes liés aux récepteurs hormonaux. Cette ségrégation est conforme à la littérature et à l'expérience clinique qui montrent que les cancers ER-positifs et ER-négatifs définissent des phénotypes biologiquement distincts qui peuvent dériver de différentes cellules progénitrices(61). Cependant, la validité analytique et l'utilité clinique de la détermination des sous-groupes intrinsèques dépendent du test spécifique et de l'utilisation clinique précise dans laquelle le test est appliqué. Le Predictor Analysis of Microarray 50 (PAM50, par Prosigna) évalue les sous-groupes intrinsèques(62).

La classification en sous-groupes intrinsèques(61, 63) est décrite dans le **tableau 3**. Cette classification est basée sur un profil moléculaire issu des données de séquençage de l'ARN et a une signification pronostique(61).

Tableau 3. Sous-groupes intrinsèques du cancer du sein(61, 63).

Sous-groupe	Prévalence	Phénotype	Risque de récurrence
Basal	20%	Triple-négatif	Élevé
HER2	10%	ER-négatif	Élevé
Luminal A	40%	ER-positif	Faible
Luminal B	20%	ER-positif	Élevé
Normal	10%	Mixte	Intermédiaire

Les tumeurs basales ont le moins bon pronostic, suivi des tumeurs HER2-positives et lumorales B(61). Les tumeurs basales sont appelées ainsi en raison d'une certaine similitude dans l'expression des gènes avec les cellules épithéliales basales du tissu mammaire normal. Elles se caractérisent par une faible expression des gènes des sous-groupes luminal et HER2. Pour cette raison, ces tumeurs sont généralement ER-négatif, PR-négatif et HER2-négatif au niveau de l'immunohistochimie.

Les tumeurs HER2 se caractérisent par une forte expression des groupes de gènes HER2 et de gènes de prolifération. Ces tumeurs ont une faible expression de gènes des sous-groupes luminal et basal. Ainsi, ces tumeurs sont le plus souvent négatives pour les récepteurs d'œstrogène et de progestérone. Ces tumeurs sont souvent positives pour le HER2 clinique (i.e., déterminé par immunohistochimie ou hybridation *in situ*). Cependant, le sous-groupe intrinsèque HER2 n'est pas directement synonyme de cancer du sein cliniquement HER2-positif. Alors que les cancers du sein cliniquement HER2-positifs ont généralement une expression génique élevée d'HER2, un pourcentage important d'entre eux n'en démontre pas(64).

Les tumeurs lumorales comprennent deux groupes : luminal A et luminal B. Le nom luminal vient de la similarité de l'expression des gènes entre ces tumeurs et l'épithélium canalaire du sein normal. Ce sont les sous-types les plus courants, qui constituent la majorité des cancers du sein ER-positifs, et sont caractérisés par l'expression du récepteur d'œstrogène, du récepteur de progestérone et d'autres gènes associés à l'activation du récepteur d'œstrogène. Bien qu'ils représentent la majorité des cancers du sein ER-positifs, les sous-types lumorales A et B présentent des distinctions moléculaires et pronostiques importantes. Les tumeurs lumorales A ont une forte expression des gènes liés au récepteur œstrogénique(65, 66). Elles sont moins

agressives que les tumeurs luminales B et ont moins d'expression des gènes de prolifération cellulaire(61). Les tumeurs luminales B ont une expression relativement faible de gènes liés au récepteur œstrogénique et une expression élevée des gènes de prolifération. Le sous-type normal est un groupe moins défini et hétérogène composé de tumeurs ayant un contenu stromal élevé, une infiltration lymphocytaire élevée, et celles qui présentent une contamination par des cellules épithéliales normales et une faible teneur en cellules malignes(63).

Cette classification est davantage utilisée en recherche et est peu utilisée en clinique chez les patientes. D'autres classifications existent et sont plus répandues en clinique, l'option la plus acceptée et largement utilisée est le risque de récurrence.

1.4.3.2. Classification selon le risque de récurrence (Oncotype DX)

Le score de récurrence de 21 gènes Oncotype DX (**Tableau 4**) est le test pronostique le mieux validé(67-71). Il fut évalué à la fois comme test pronostique et prédictif. Il permet d'identifier les patientes ayant un cancer ER-positif/HER2-négatif dont le pronostic est si favorable que les avantages de la chimiothérapie adjuvante (i.e., après la chirurgie) sont très faibles. À l'heure actuelle, il est indiqué pour les cancers du sein inférieurs ou égal à 5 cm, sans envahissement ganglionnaire, ER-positif/HER2-négatif qui recevront une thérapie endocrine. Le score de récurrence a été développé en identifiant les 250 gènes candidats les plus prometteurs décrits dans la littérature(71). Les chercheurs ont ensuite utilisé une méthode RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) pour générer des niveaux d'expression de ces gènes dans les tissus enrobés de paraffine de 447 patients. Une formule mathématique comprenant 16 gènes (plus 5 gènes de référence) a ensuite été générée pour optimiser la prédiction de la récurrence à distance malgré l'administration de thérapie endocrine(71). La survie globale des patients était aussi prédite(71). La somme de ce calcul fournit un score de récurrence.

Tableau 4. Score de récurrence et bénéfice de la chimiothérapie(67).

Score de récurrence					
Âge	0-10	11-15	16-20	21-25	26-100
> 50 ans	Absence de bénéfice				Bénéfice large
≤ 50 ans	Absence de bénéfice	≅ 1.6% de bénéfiques	≅ 6.5% de bénéfiques	Bénéfice large	

- Score de récurrence inférieur à 26

Les patientes ayant un score de récurrence entre 0 et 10 ont moins de 4% de risque de récurrence et n'ont aucun bénéfice à recevoir la chimiothérapie adjuvante. Entre 11 et 25 le bénéfice varie comme suit. Celles ayant un score entre 11 et 15 n'ont aucun bénéfice à recevoir la chimiothérapie adjuvante par rapport à la thérapie endocrine. Entre 16 et 20, les patientes de plus de 50 ans n'ont aucun bénéfice à recevoir la chimiothérapie, tandis que celles de 50 ans et moins ont 1.6% de bénéfices sur leur risque de récurrence(67). En effet, chez les patientes âgées de 50 ans et moins, la chimiothérapie confère un avantage par rapport à la thérapie endocrine avec moins de récurrences à distance(67). Entre 21 et 25, les patientes de plus de 50 ans n'ont aucun bénéfice à recevoir la chimiothérapie, tandis que celles de 50 ans et moins ont 6.5% de bénéfices sur leur risque de récurrence.

- Score de récurrence entre 26 et 30 (inclusivement)

Chez ces patientes, l'omission de la chimiothérapie ne fut pas étudiée de manière prospective et la décision est prise selon des facteurs cliniques et pathologiques additionnels(67). En clinique, il n'y a pas une grande distinction entre les patientes de score situé entre 26 et 30, et celles dont le score est supérieur à 30. La chimiothérapie est généralement administrée pour ces deux groupes de patientes.

- Score de récurrence supérieur à 31

Le risque de récurrence est élevé et la chimiothérapie adjuvante est indiquée(60).

1.4.3.3. Autres classifications génomiques

- Profil pronostique de 70 gènes d'Amsterdam (MammaPrint)

Sur la base de l'essai clinique randomisé MINDACT (Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy), MammaPrint est l'un des nombreux essais qui pourraient être utilisés pour déterminer le pronostic des personnes présentant un risque clinique élevé, un cancer du sein positif pour les récepteurs hormonaux, HER2-négatif et un envahissement ganglionnaire nul à faible (un à trois ganglions métastatiques) afin d'éclairer les décisions concernant l'administration de la chimiothérapie(72-74). Cependant, les personnes présentant un risque clinique faible ont

peu de bénéfiques à tirer d'une chimiothérapie, quels que soient les résultats de ce test. Pour celles qui présentent une atteinte ganglionnaire et un faible risque selon le profil pronostique de 70 gènes, il convient de fournir des conseils afin d'éviter d'exclure un bénéfice de la chimiothérapie, en particulier chez les patientes ayant plus d'un ganglion lymphatique atteint.

Le profil génétique de 70 gènes a été développé à partir d'une analyse supervisée de l'expression génique sur des micropuces tissulaires provenant de 98 tumeurs mammaires primaires(75). Un modèle mathématique fut utilisé pour calculer un score qui stratifie les patientes comme ayant un cancer du sein avec un mauvais ou un bon pronostic associé.

La validité clinique du profil pronostique de 70 gènes a été démontrée dans de nombreuses études(74, 76-78). Les résultats de l'étude MINDACT suggèrent que ce profil génétique peut identifier des sous-ensembles de patientes qui ont une faible probabilité de récurrence à distance malgré des caractéristiques cliniques à haut risque(74). Parmi les patientes de la population en intention de traitement qui présentaient un risque clinique élevé de récurrence mais un risque faible selon le profil pronostique de 70 gènes, les taux de survie à cinq ans sans métastases à distance étaient similaires avec et sans chimiothérapie. Cependant, l'étude MINDACT n'avait pas la puissance statistique nécessaire pour exclure un bénéfice de la chimiothérapie(76).

- EndoPredict

Un autre test pronostique est basé sur l'ARN et utilise une RT-PCR de 11 gènes (dont trois gènes de référence) pour calculer un score de pronostic. Le test EndoPredict a été validé en utilisant les données de deux études autrichiennes sur le cancer du sein (ABCSG-6 et ABCSG-8), et sa valeur pronostique s'est avérée indépendante des facteurs de pronostic conventionnels(79). Ce test fut validé sur 3746 tumeurs traitées par thérapie endocrine avec ou sans chimiothérapie. EndoPredict est utile pour l'identification des patientes atteintes de tumeurs HER2-négatives/ER-positives qui présentent un très faible risque de récurrence sans chimiothérapie adjuvante(80). EndoPredict identifie aussi les patientes à faible risque de récurrence tardive(80). Un score supérieur à 3.33 établit un risque de récurrence élevé et un score égal ou inférieur à 3.33 établit un risque faible. Dans les études, les patientes étant dans le groupe de faible risque avaient un risque de récurrence à 10 ans égal à 4%(79). Ce test peut être effectué de manière fiable dans les laboratoires

de pathologie moléculaire de routine en utilisant des échantillons fixés au formol et enrobés de paraffine(81). Il peut être réalisé avec des tissus provenant soit de biopsies ou d'échantillons chirurgicaux(82).

- Breast Cancer Index

Le Breast Cancer Index est une combinaison de deux profils. Le premier profil est le rapport d'expression (rapport H:I) de l'homéobox antiapoptotique B13 (HOXB13) et du récepteur de l'interleukine 17B (IL17BR) et le Molecular Grade Index. Grâce à l'analyse des micropuces d'ADN à l'échelle du génome, trois gènes exprimés de manière différentielle ont été associés à un risque accru de progression chez les cancers ER-positifs traités au tamoxifène : HOXB13 (surexprimé dans les cas de récidives post tamoxifène); et IL17BR et ESTAI240933 (tous deux surexprimés dans les cas de non-récidives post tamoxifène)(83). Comparé aux facteurs de pronostic clinique (par exemple, l'âge, la taille de la tumeur, le grade de la tumeur et l'état des ganglions lymphatiques), le rapport H:I était significativement et indépendamment corrélé avec le résultat.

Le seuil utilisé pour déterminer le risque de récurrence tardive est égal à 5. Les patientes ayant un score entre 0 et 5 ont un faible risque et celles ayant un score entre 5.1 et 10 ont un haut risque(60). Contrairement aux patientes qui ont un risque élevé, celles qui ont un faible risque ne bénéficient pas d'une thérapie prolongée(60).

1.5. Stades du cancer du sein

Le système de classification du cancer du sein TNM (Tumor Node Metastasis) est un système international permettant de déterminer le stade d'un cancer du sein(55). Cette classification est utilisée pour déterminer le pronostic et orienter la prise en charge des patientes. Il est également utilisé pour faciliter les discussions sur le traitement et le pronostic entre les professionnels qui collaborent, ainsi qu'entre les professionnels et les patients.

Le système de classification TNM met en corrélation les caractéristiques importantes des tumeurs avec les données de survie. Il est basé sur une analyse rétrospective de la survie dans divers échantillons de patients représentant tous les stades de la maladie.

La détermination du stade dépend traditionnellement de la taille de la tumeur, de l'implication des ganglions lymphatiques et de la présence de métastases. La huitième édition intègre des marqueurs biologiques, qui améliorent la discrimination pronostique par rapport à la seule classification anatomique(55).

1.5.1. Taille de la tumeur primaire

La classification de la tumeur primaire (i.e., située au niveau du sein) est la même, que ce soit cliniquement ou pathologiquement (**Tableau 5, Figure 3**).

Tableau 5. Classification de la tumeur primaire. Adapté de la huitième édition du manuel de l'AJCC (American Joint Committee on Cancer)(55).

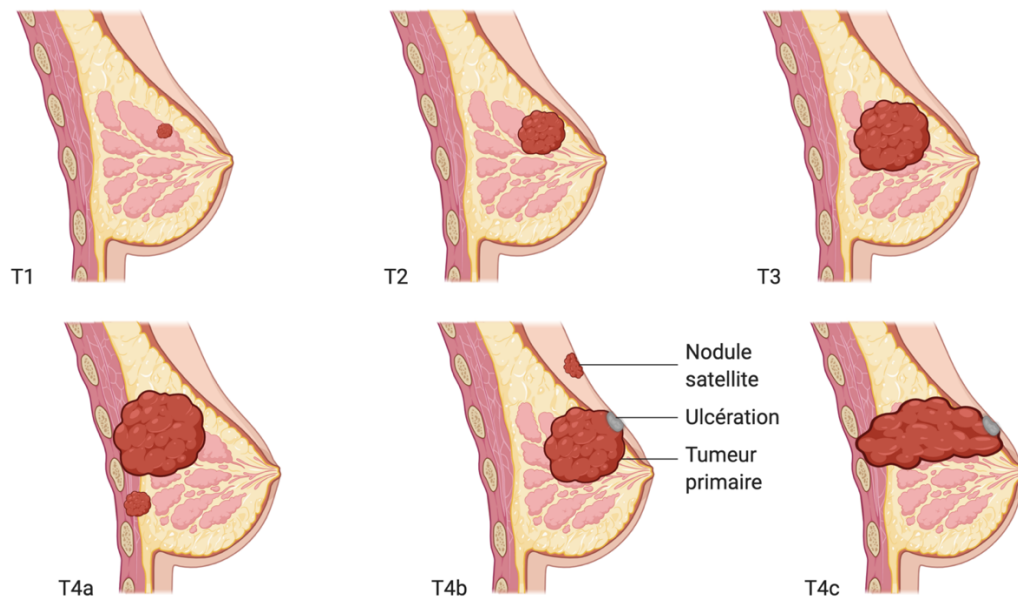
Catégorie T	Critère
TX	La tumeur primaire ne peut pas être évaluée
T0	Aucune évidence de tumeur primaire
Tis(CCIS)*	Carcinome canalaire <i>in situ</i>
Tis(Paget)	Maladie de Paget du mamelon non associée avec du CCIS ou du carcinome infiltrant.
T1	Tumeur ≤ 20 mm
T2	Tumeur > 20 mm mais ≤ 50 mm
T3	Tumeur > 50 mm
T4	Tumeur de n'importe quelle taille avec une extension directe à la paroi thoracique et/ou la peau (ulcération ou nodule). L'invasion isolée du derme ne qualifie pas pour T4.

Légende :

Les mesures de taille tumorale considèrent le plus grand diamètre.

*Le carcinome lobulaire *in situ* est considéré une entité bénigne.

Figure 3. Représentation de différentes catégories de tumeurs primaires selon la classification TNM.



**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Légende:

Les tumeurs T2 mesurent 2-5 cm, les tumeurs T3 mesurent plus de 5 cm, les tumeurs T4 ont une extension directe à la paroi thoracique et/ou la peau (ulcération ou nodule). L'invasion isolée du derme ne qualifie pas pour T4. Les tumeurs T4a ont une extension à la paroi thoracique excluant le grand pectoral. Les tumeurs T4b ont une ulcération ou des nodules macroscopiques ipsilatéraux avec ou sans œdème de la peau. Les tumeurs T4c ont les caractéristiques à la fois des tumeurs T4b et de T4c.

1.5.2. Envahissement ganglionnaire

1.5.2.1. Classification clinique

Une classification clinique de l'envahissement ganglionnaire est fournie au **tableau 6**.

Tableau 6. Classification clinique de l'envahissement ganglionnaire. Adapté de la huitième édition du manuel de l'AJCC(55).

Catégorie N*	Critère clinique
cNX	Les ganglions régionaux ne peuvent pas être évalués (e.g., précédemment enlevés)
cN0	Aucune évidence d'envahissement ganglionnaire
cN1	Métastases à des ganglions axillaires mobiles ipsilatéraux niveaux I, II
cN2	Métastases à des ganglions axillaires fixes ou amassés niveaux I, II; ou dans les ganglions mammaires internes ipsilatéraux en l'absence de métastases axillaires
cN3	Métastases dans les ganglions ipsilatéraux infraclaviculaires (niveau III) avec ou sans métastases aux niveaux I, II; ou dans les ganglions mammaires internes ipsilatéraux avec des métastases à des ganglions axillaires ipsilatéraux niveaux I, II; ou dans les ganglions supraclaviculaires ipsilatéraux avec ou sans métastases dans les ganglions mammaires internes

Légende :

*La lettre « c » inscrite en minuscule pour chaque catégorie signifie clinique.

1.5.2.2. Classification pathologique

Une classification pathologique de l'envahissement ganglionnaire est fournie au **tableau 7**.

Tableau 7. Classification pathologique de l'envahissement ganglionnaire. Adapté de la huitième édition du manuel de l'AJCC(55).

Catégorie N*	Critère pathologique
pNX	Les ganglions régionaux ne peuvent pas être évalués (e.g., précédemment enlevés)
pN0	Aucune évidence d'envahissement ganglionnaire ou cellules tumorales isolées uniquement (i.e., cellules malignes en amas de moins de 0.2 mm dans des ganglions régionaux)
pN0(i+)	Cellules tumorales isolées uniquement
pN0(mol+)	Changements moléculaires positifs par RT-PCR
pN1	Micrométastases ou métastases à 1-3 ganglions axillaires; et/ou des métastases dans des ganglions mammaires internes sentinelles** sans trouvaille clinique
pN2	Métastases à des ganglions axillaires fixes ou amassés niveaux I, II; ou dans les ganglions mammaires internes ipsilatéraux en l'absence de métastases axillaires
pN3	Métastases dans au moins 10 ganglions axillaires; ou dans les ganglions infraclaviculaires; ou dans les ganglions mammaires internes ipsilatéraux (par imagerie) avec des métastases à des ganglions axillaires ipsilatéraux niveaux I, II; ou dans plus de trois ganglions axillaires avec des métastases dans les ganglions mammaires internes ipsilatéraux sentinelles (sans trouvaille clinique)

Légende :

*La lettre « p » inscrite en minuscule pour chaque catégorie signifie pathologique.

**Les ganglions sentinelles sont les premiers ganglions dans lesquels des cellules cancéreuses sont les plus susceptibles de se propager à partir de la tumeur primaire.

1.5.3. Métastases à distance

On parle de métastases à distance lorsque des cellules de cancer du sein se disséminent à l'extérieur du sein et de son réseau lymphatique régional. La classification est à la fois clinique et pathologique (**Tableau 8**).

Tableau 8. Classification de l'envahissement métastatique à distance. Adapté de la huitième édition du manuel de l'AJCC(55).

Catégorie M*	Critère pathologique
cM0	Aucune évidence clinique ou radiographique de métastases à distance
cM0(i+)	Aucune évidence clinique ou radiographique de métastases à distance en présence de cellules tumorales ou de dépôts de moins de 0.2 mm détectés microscopiquement ou par techniques moléculaires dans la circulation sanguine, la moelle osseuse, ou d'autres tissus non régionaux chez un patient sans signes ou symptômes de métastases
cM1	Métastases à distance détectées de manière clinique et radiographique
pM1	N'importe quelle métastase prouvée histologiquement (> 0.2 mm) dans un organe à distance; ou dans des ganglions non régionaux.

Légende :

*La lettre « c » inscrite en minuscule pour les catégories signifie clinique. La lettre « p » inscrite en minuscule signifie pathologique.

2. Le cancer du sein triple-négatif

2.1. Définition

Le cancer du sein triple négatif (CSTN) est un terme qui a été historiquement appliqué aux cancers du sein qui n'ont pas l'expression du récepteur d'œstrogène, du récepteur de progestérone et du récepteur HER2. Le CSTN a tendance à se comporter de manière plus agressive que les autres types de cancer du sein et a un moins bon pronostic(84). Bien que les principes de base du diagnostic et du traitement du CSTN soient similaires à ceux du cancer du sein en général, de nombreux aspects, comme les facteurs de risque, les caractéristiques moléculaires et pathologiques, l'histoire naturelle et la sensibilité à la chimiothérapie, sont uniques au CSTN.

2.2. Épidémiologie

Le CSTN représente environ 15 à 20% des cancers du sein diagnostiqués dans le monde(2, 84, 85). Par rapport au cancer du sein à récepteurs hormonaux positifs, CSTN est plus souvent diagnostiqué chez les femmes de moins de 40 ans. En outre, le cancer du sein triple-négatif

semble être relativement plus fréquent chez les femmes noires que chez les femmes blanches(86).

Les autres facteurs de risque principaux pour le cancer du sein triple-négatif sont les mutations BRCA1/2, la race, et le statut pré-ménopausé. Jusqu'à 20% des patientes atteints de CSTN présentent une mutation BRCA, en particulier BRCA1(87). En revanche, moins de 6% de tous les cancers du sein sont associés à une mutation du gène BRCA(32, 84). Le statut pré-ménopausique a été associé à une incidence accrue du diagnostic de CSTN par rapport au statut post-ménopausique(88). Les femmes pré-ménopausées peuvent fréquemment présenter une maladie ER-positif et/ou HER2-positif, et il est essentiel de tester leurs tumeurs pour ces marqueurs.

Plusieurs études ont démontré que les femmes afro-américaines ont un risque plus élevé de CSTN que les femmes non afro-américaines(89). L'obésité est aussi associée au sous-type triple-négatif(86). Parmi les autres facteurs associés, on retrouve le surpoids, le jeune âge lors de la première grossesse à terme et une naissance récente(86).

2.3. Présentation clinique et diagnostique

Les cancers du sein triple-négatif se développent rapidement et sont plus susceptibles d'être diagnostiqués cliniquement que par mammographie par rapport aux cancers ER-positifs(90). Les patientes atteintes de cancer du sein triple-négatif développent des récurrences précoces (i.e., moins d'un an après le diagnostic initial), notamment sous la forme de métastases viscérales(85).

2.4. Caractéristiques moléculaires

Une des premières caractéristiques moléculaires trouvée est le fait que les CSTN surviennent souvent chez des patientes ayant une mutation BRCA1(91).

En ce qui concerne les sous-groupes intrinsèques, les CSTN est un groupe majoritairement composé de tumeurs du sous-type intrinsèque basal (**Tableau 3**)(91, 92). Mais les deux groupes ne sont pas synonymes pour autant(92). Les CSTN de sous-type basal et les tumeurs BRCA-muté partagent des caractéristiques communes comme le statut des récepteurs hormonaux négatif, une baisse de l'expression de la protéine BRCA, une mutation P53 et une sensibilité aux agents de chimiothérapie endommageant l'ADN(84, 85, 93).

Par ailleurs, une classification existe au sein des tumeurs triple-négatives car le CSTN est une entité hétérogène(91). Cette classification est le résultat de l'analyse de l'expression génique de 587 tumeurs triple-négatives(91). Six sous-types, démontrant chacun un profil d'expression génique unique furent découverts. L'ontologie de chacun de ces sous-types est également différente car les voies d'enrichissement génique sont distinctes(91). Ces sous-types sont: basal 1 (BL1), basal 2 (BL2), immunomodulateur (IM), mésoenchymateux (M), mésoenchymateux type cellule souche (MSL) et récepteur d'androgène (LAR).

- BL1 et BL2: Ces sous-types sont très enrichis au niveau des voies du cycle cellulaire et de la division cellulaire. L'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire y est élevée. Les voies des gènes tels que ATR et BRCA, impliqués dans la réponse aux dommages d'ADN sont enrichies dans ces sous-types. Le sous-type BL2 démontre une ontologie particulière avec des gènes impliqués dans la signalisation des facteurs de croissance, la glycolyse et la gluconéogenèse.
- IM: Ce sous-type est enrichi au niveau des voies immunitaires incluant la signalisation des cellules immunitaires, des cytokines, la présentation des antigènes, et les voies centrales de transduction du signal. Le carcinome médullaire est associé à ce sous-type.
- M et MSL: Le sous-type mésoenchymateux détient une variété de voies enrichies en mobilité cellulaire, interaction avec le récepteur ECM (extracellular matrix) et en différenciation cellulaire. Le sous-type MSL partage la même ontologie et a, de manière unique, un enrichissement dans les voies de signalisation de facteurs de croissance, l'angiogenèse et la signalisation immunitaire. Les voies de signalisation enrichies dans les sous-types M et MSL partagent des caractéristiques communes avec le cancer du sein métaplasique qui est très faiblement différencié.
- LAR: malgré le fait que le CSTN soit ER-négatif, le sous-type LAR est fortement enrichi dans les voies impliquées dans la régulation hormonale incluant la synthèse des stéroïdes, le métabolisme de la porphyrine et celui des androgènes/oestrogènes. De plus l'ARNm du récepteur d'androgène est très exprimé (i.e., 9 fois plus que les autres types), ainsi que les co-activateurs et les cibles du récepteur.

2.5. Traitement du cancer du sein triple-négatif

2.5.1. Principes généraux

Les principes de traitement du cancer du sein triple-négatif se recoupent avec ceux du cancer du sein en général. Le traitement du cancer du sein triple-négatif diffère selon le stade.

Pour les cancers au stade précoce (stade I ou II), le traitement primaire est une chirurgie mammaire. Une tumorectomie ou une mastectomie peuvent être réalisées. La tumorectomie correspond à l'excision de la tumeur en marges saines (i.e., exemptes de néoplasie) et la mastectomie consiste en l'ablation complète du sein. Les ganglions régionaux sont retirés (i.e., biopsie des ganglions sentinelles ou dissection axillaire) avec ou sans radiothérapie adjuvante. Après un traitement local définitif, une thérapie systémique peut être proposée en fonction des caractéristiques primaires de la tumeur, telles que la taille de la tumeur, son grade, le nombre de ganglions lymphatiques envahis. Toutefois, certaines patientes atteintes d'un cancer du sein à un stade précoce peuvent être traitées d'abord par une thérapie avant la chirurgie (i.e., néoadjuvante), suivie d'une intervention chirurgicale. Une forte corrélation existe pour le CSTN de stade précoce, entre la réponse pathologique complète à la thérapie néoadjuvante et la survie à long terme(57-59). La réponse pathologique complète est associée à une meilleure survie globale et une meilleure survie sans maladie.

La plupart des patientes atteintes d'un cancer du sein localement avancé (i.e., stade III, lésions T3 ou T4) et certaines à un stade plus précoce de la maladie ont un haut risque de récurrence. De ce fait, elles sont traitées par une thérapie systémique néoadjuvante. L'objectif du traitement est d'induire une réponse tumorale avant l'opération et de permettre, entre autres, la conservation du sein. La chimiothérapie néoadjuvante fournit également des informations sur la réponse au traitement qui peuvent être utiles à un moment ultérieur quant au pronostic de la patiente(94), si la tumeur récidive. La réduction de la taille tumorale peut permettre une intervention chirurgicale moins importante sur le sein et/ou l'aisselle, en améliorant les résultats esthétiques et en réduisant les complications postopératoires(94-96).

2.5.2. Chimiothérapie

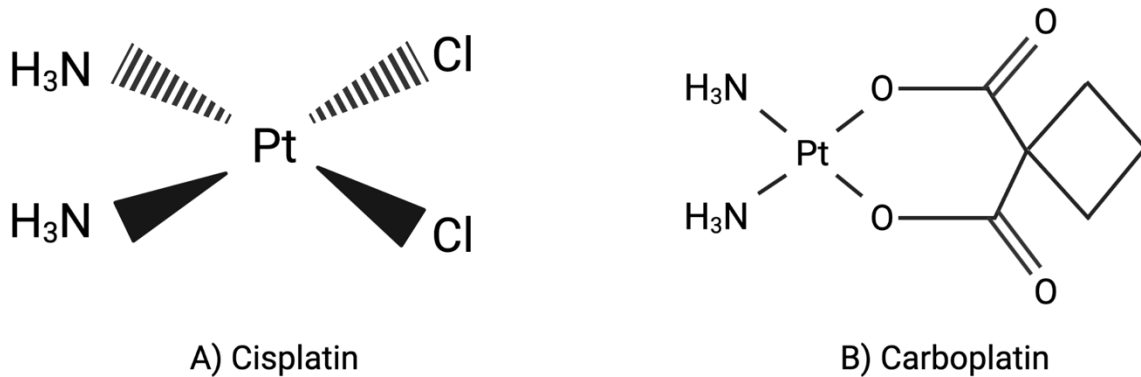
La chimiothérapie à base d'anthracyclines (e.g., doxorubicine), d'alkylants (e.g., cyclophosphamide) et de taxanes (e.g., taxol) est la thérapie adjuvante standard pour le CSTN (survie sans récurrence de 69% et survie globale de 75% à 10 ans)(60, 97, 98). Les anthracyclines inhibent la synthèse de l'ADN par intercalation entre les paires de bases de l'ADN et par inhibition de la topoisomérase II(99, 100). Les agents alkylants empêchent la division cellulaire en réticulant les brins d'ADN. Les taxanes favorisent l'assemblage des microtubules et les stabilisent(101). Les taxanes entraînent la suppression de la dynamique fuseau-microtubule, menant au ralentissement ou au blocage de la mitose(101).

Dans le contexte adjuvant, lorsque la réponse tumorale n'est pas complète suite à la chimiothérapie néoadjuvante, la capecitabine a démontré une amélioration de la survie globale et de la survie sans maladie dans l'étude CREATE-X(102). La capecitabine est un agent antimétabolite. C'est un promédicament du fluorouracile. Il subit une hydrolyse dans le foie et les tissus pour former le fluorouracile qui est la partie active(103). Le fluorouracile est un antimétabolite pyrimidine fluoré qui inhibe la thymidylate synthétase, limitant la disponibilité des nucléotides thymidines pour la synthèse de l'ADN et de l'ARN(103, 104).

2.5.2.1. Mécanisme d'action et efficacité du carboplatin

Les chimiothérapies composées de sels de platine modifient les bases de l'ADN de manière covalente(105, 106). Le carboplatin (cis-diammine(cyclobutane-1,1-dicarboxylate-O, O')platinum II) et le cisplatine (cis-diamminedichloroplatinum II, cis-DDP) sont deux chimiothérapies composées de sels de platine faisant partie de la classe des agents alkylants (**Figure 4**)(105). L'activité anticancéreuse du cisplatine fut découverte dans les années 1960 par Barnett Rosenberg et a précédé le développement du carboplatin, un dérivé du cisplatine qui a une importante activité anti-tumorale, une meilleure stabilité et une moindre néphrotoxicité(105-108). Les chimiothérapies composées de sels de platine sont réparties en deux groupes structurels: le groupe cis-[Pt(amine)₂X₂] et le groupe polynucléaire PtIV. Le carboplatin et le cisplatine font partie du groupe cis-[Pt(amine)₂X₂](105).

Figure 4. Structures du cisplatine et du carboplatine. Adapté de Weber(105).



**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Légende :

Abréviations : Pt, platine. Cela représente sur cette figure l'entité essentielle de platine.

Les connaissances qui existent sur le mécanisme d'action des chimiothérapies composées de sels de platine sont en grande partie issues des études sur le cisplatine et sont encore en voie d'acquisition. Une fois dans la cellule, le carboplatine lie principalement la glutathione dans le cytoplasme et l'ADN dans le noyau, au niveau du site de liaison du nucléosome(109). L'interaction du carboplatine avec l'ADN repose sur un processus d'hydrolyse par lequel un ligand du carboplatine est perdu et remplacé par une molécule d'eau(105, 107, 109, 110). Les produits de cette hydrolyse sont des complexes réactifs de platine qui réagissent principalement avec l'ADN dans le noyau(109). Cette hydrolyse entraîne la fixation de complexes réactifs de platine sur une base dans l'ADN au niveau du site cyclobutane-1,1-dicarboxylate du carboplatine(107). Les complexes réactifs de platine se lient à des groupes nucléophiles, tels que les sites riches en guanine-cytosine de l'ADN(105). Ils induisent des mono-adduits, des liaisons covalentes intra-brin, inter-brin; et des liaisons covalentes entre l'ADN et les protéines(105). Ces liaisons entraînent le chevauchement des brins d'ADN ou des cassures de l'ADN résultant de tentatives de réparation(106). Les complexes réactifs de platine empêchent la réplication, la transcription, la croissance et la prolifération cellulaire(106, 109).

Le mécanisme majeur de cytotoxicité des sels de platine est l'apoptose(109). L'apoptose est caractérisée par la condensation de la chromatine, la rétraction de la cellule et la fragmentation de l'ADN(106, 110). L'ADN endommagé et lié aux complexes réactifs de cisplatine active puissamment les voies de transduction de signal capables d'activer l'apoptose telles que AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homologue), c-ABL (v-abl Abelson murine leukaemia viral oncogene homologue 1), p53, MAPK (mitogen-activated protein kinase)/JNK (c-Jun NH2-terminal kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase)(105). Cet ADN endommagé active aussi les points de contrôle du cycle cellulaire et cause un arrêt marqué en phase G2 (i.e., gap 2, phase qui permet à l'ADN d'être réparé) par les voies ATR et ATM(110, 111). Lorsque la réparation échoue ou est inadéquate, la cellule entre en apoptose(110).

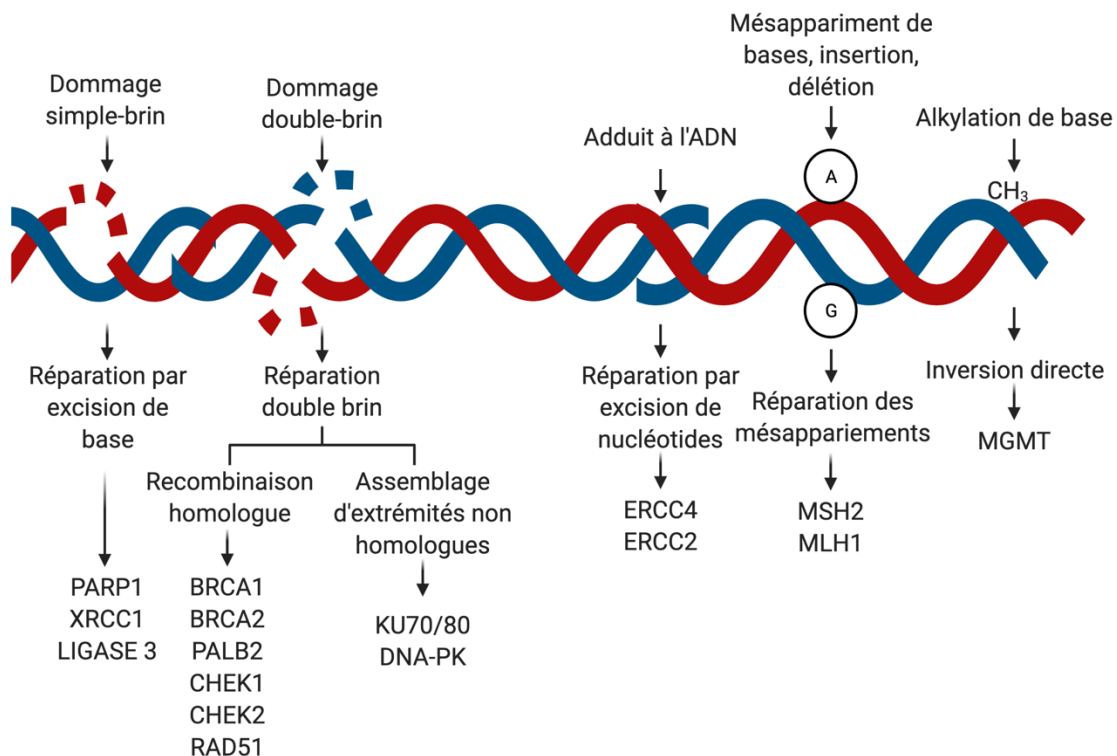
Initialement, les sels de platine ont démontré de l'efficacité en cancers testiculaire et ovarien(105). Le carboplatin a été approuvé en clinique en 1989(105). Parmi de nombreux analogues des sels de platine, le carboplatin a une utilisation très répandue en clinique(112). En cancer du sein triple-négatif, il ne fait pas partie des traitements standards. L'ajout du carboplatin à la chimiothérapie standard néoadjuvante pour le CSTN est une controverse. Plusieurs essais cliniques randomisés démontrent une amélioration de la réponse pathologique complète avec l'ajout de carboplatin en néoadjuvant(113-115). Cependant, cela est associé à des effets secondaires hématologiques et neurologiques et il n'y a pas d'amélioration de la survie globale. Le carboplatin peut entraîner une neutropénie (20-31%), des diarrhées (24%), une thrombocytopénie (12-22%), une neuropathie périphérique (33-41%), de la fatigue (29-51%) et des arthralgies (10%)(114, 115).

Une combinaison de chimiothérapie contenant un sel de platine ou un taxane fut démontré efficace chez les patientes atteintes de cancer du sein triple-négatif(116). En première ligne de chimiothérapie la combinaison paclitaxel/carboplatin constitue une option efficace (survie sans progression = 30 mois avec le carboplatin versus 13 mois avec la gemcitabine)(117-119). Pour les patientes de stade IV avec une mutation germinale BRCA, le carboplatin a démontré une meilleure réponse tumorale et une meilleure survie sans maladie comparativement au docetaxel(120).

2.5.3. Mécanismes de réponse aux traitements endommageant l'ADN

La chimiothérapie endommage l'ADN et peut mener à une instabilité génomique. Les dommages à l'ADN peuvent être des lésions directes ou des mutations qui surviennent lorsque l'ADN est mal réparé(121). La variété et la fréquence des lésions de l'ADN correspondent à la complexité des mécanismes qui contrecarrent ces menaces à l'intégrité génomique(121). Collectivement, ces mécanismes sont connus sous le nom de réponse aux dommages de l'ADN. La réponse aux dommages de l'ADN englobe plusieurs mécanismes fonctionnels qui sont définis par le type de lésion qu'ils adressent(121) (**Figure 5**).

Figure 5. Mécanismes de réparation de l'ADN. Adapté de Lord et Ashworth(121).



**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Légende :

L'ADN est continuellement exposé à une série d'agressions qui provoquent une série de lésions, allant des cassures monobrans aux événements d'alkylation des bases. Le choix du mécanisme de réparation est largement défini par le

type de lésion, mais d'autres facteurs tels que le stade du cycle cellulaire jouent également un rôle. Les protéines clés impliquées dans chaque mécanisme de réparation sont présentés.

La plupart des voies de la réponse aux dommages de l'ADN englobent un ensemble similaire de processus étroitement coordonnés : la détection des lésions de l'ADN, l'accumulation de facteurs de réparation de l'ADN sur le site des lésions et enfin la réparation physique de la lésion. La plupart des modifications subtiles de l'ADN, telles que les lésions oxydatives, les produits d'alkylation et les dommages à un brin unique, sont réparées par une série de mécanismes que l'on appelle réparation par excision de base(121).

La réparation par excision de bases, corrige des dommages de l'ADN non volumineux survenus par oxydation, déamination ou alkylation(122). Elle se fait en quatre grandes étapes: reconnaissance de la lésion par une glycosylase d'ADN, excision de la base endommagée, synthèse du nouvel ADN et ligature(121). D'abord une glycosylase d'ADN reconnaît le dommage de l'ADN. Cette enzyme clive le lien glycosydique qui unit la base au désoxyribose et une endonuclease AP (apurinique/aprimidinique) lyse le squelette d'ADN, laissant un déficit(123). Puis, la polymérase β synthétise le nouvel ADN au site du déficit(123). Enfin, une ligase cimenter l'espace résiduel(124). Lorsque la réparation par excision de base est compromise, la cellule est davantage sensible aux agents alkylants comme le carboplatin et le cisplatine(125).

Certaines des lésions monobrin plus volumineuses qui déforment la structure hélicoïdale de l'ADN sont traitées par excision de nucléotides(121). La réparation par excision de nucléotides se divise en deux groupes: 1) couplée à la transcription, qui se produit lorsque la lésion bloque et est détectée par l'ARN polymérase; et 2) génome global, dans lequel la lésion est détectée non pas dans le cadre d'un processus de transcription bloqué mais parce qu'elle perturbe l'appariement des bases et déforme l'hélice d'ADN(121). Bien que ces processus détectent les lésions en utilisant des mécanismes différents, ils les réparent de manière similaire : l'ADN entourant la lésion est excisé, puis remplacé par le mécanisme normal de réplication de l'ADN. La protéine ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementing Protein 1) est la clé de cette étape d'excision.

Les principaux mécanismes qui permettent de faire face aux dommages double-brin sont la recombinaison homologue et l'assemblage d'extrémités non-homologues(121). La

recombinaison homologue agit principalement dans les phases S et G2 du cycle cellulaire, et est un processus conservateur en ce sens qu'elle tend à restaurer la séquence d'ADN d'origine sur le site de la lésion. Une partie de la séquence d'ADN autour du dommage double-brin est retirée (i.e., résection) et la séquence d'ADN sur une chromatide sœur homologue est utilisée comme modèle pour la synthèse d'un nouvel ADN(121). Les protéines cruciales impliquées dans la médiation de la recombinaison homologue comprennent celles codées par les gènes BRCA1, BRCA2, RAD51 et PALB2. Contrairement à la recombinaison homologue, l'assemblage d'extrémités non-homologues se produit tout au long du cycle cellulaire. Plutôt que d'utiliser une séquence d'ADN homologue pour guider la réparation de l'ADN, l'assemblage d'extrémités non-homologues intervient dans la réparation en ligaturant directement ensemble les extrémités d'un dommage double-brin(121). Ce processus peut parfois entraîner la délétion ou la mutation de séquences d'ADN. Par conséquent, comparé à la recombinaison homologue l'assemblage d'extrémités non-homologues est souvent mutagène.

La réparation des mésappariements fait partie de la réponse aux dommages de l'ADN. Elle concerne principalement la mauvaise incorporation du desoxynucléotide triphosphate et la formation de boucles d'insertion et de suppression qui se forment pendant la réplication de l'ADN(121). Ces erreurs provoquent des mésappariements de bases dans la séquence d'ADN qui déforment la structure hélicoïdale de l'ADN et sont donc reconnus comme des lésions(121). La reconnaissance de cette distorsion déclenche une série d'événements qui aboutissent à l'excision de l'ADN nouvellement synthétisé, englobant le site de discordance et la resynthèse de l'ADN à sa place. Les protéines codées par les gènes homologues mutS et mutL, tels que MSH2 et MLH1, sont la clé du processus de réparation des mésappariements(121).

La synthèse translésionnelle et le changement de modèle permettent à l'ADN de continuer à se répliquer en présence de lésions de l'ADN qui, autrement, stopperaient le processus(121). La synthèse translésionnelle et le changement de modèle sont donc généralement considérés comme faisant partie de la réponse aux dommages de l'ADN. Dans la synthèse translésionnelle, les polymérases de réplication d'haute-fidélité sont remplacées transitoirement par des polymérases de basse-fidélité. Celles-ci sont capables de synthétiser de l'ADN en utilisant un brin qui comprend une lésion de l'ADN(121). Une fois que la fourchette de réplication a passé le site

de la lésion, les polymérases de basse-fidélité sont normalement remplacées par l'enzyme d'haute-fidélité habituelle, ce qui permet à la synthèse de l'ADN de se poursuivre normalement.

Dans le cas du changement de modèle, la lésion de l'ADN est contournée au niveau de la fourchette de réplication en laissant simplement un vide dans la synthèse de l'ADN en face de la lésion(121). Une fois passé la fourchette de réplication, l'espace simple brin est réparé en utilisant l'ADN modèle sur une chromatide sœur, de manière similaire au processus utilisé lors de la recombinaison homologue.

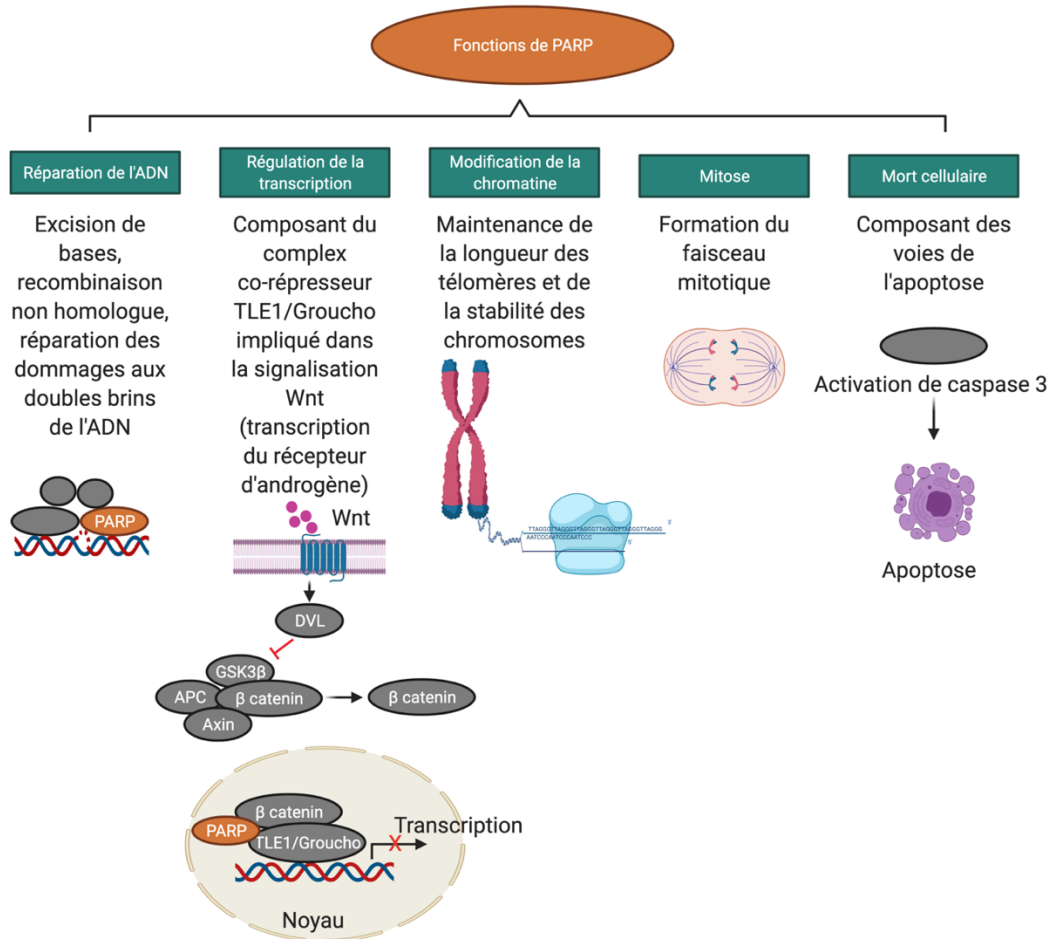
Bien que parfois considérés comme distincts de la réponse aux dommages d'ADN, les mécanismes qui contrôlent l'intégrité de l'ADN télomérique à l'extrémité de chaque chromosome humain sont également une barrière contre l'instabilité génomique(121). Plutôt que d'être une structure à double hélice d'ADN exposée à l'extrémité du chromosome, l'ADN télomérique comprend une série de séquences d'ADN répétitives riches en guanine. Celles-ci permettent à l'ADN télomérique d'être lié à une série de protéines qui forment une structure de recouvrement qui empêche les extrémités exposées des différents chromosomes d'être fusionnées ensemble. Dans la plupart des cellules somatiques, la longueur de l'ADN télomérique est réduite à chaque cycle cellulaire, un processus appelé attrition télomérique. Finalement, les télomères atteignent une longueur qui empêche la formation d'une structure de recouvrement. Dans les cellules normales, cette défaillance induit une réponse médiée par p53 qui entraîne la sénescence cellulaire, un mécanisme qui empêche une prolifération cellulaire illimitée(121). Lorsque la réponse de p53 est abrogée, des fusions terminales se produisent, ce qui conduit à la formation de chromosomes à deux centromères(121). Lors de la mitose, chaque centromère d'un chromosome dicentrique s'attache à un pôle opposé du fuseau. Le stress physique des forces opposées pendant la séparation des chromosomes cisaille les chromosomes dicentriques, ce qui entraîne la rupture des extrémités des chromosomes.

3. Les inhibiteurs de Poly (Adenosine diphosphate Ribose) Polymerase (PARP)

3.1. Les Poly (Adenosine diphosphate Ribose) Polymérases

Les PARP font partie des protéines cellulaires impliquées dans le système de réponse aux dommages de l'ADN en vue du maintien de l'intégrité du génome. Les PARP sont une grande famille de 17 enzymes avec diverses fonctions (**Figure 6**)(126). Ces fonctions incluent l'excision de base, la régulation de la transcription, la cohésion des télomères, la formation du faisceau mitotique, le trafic intracellulaire, le métabolisme énergétique et l'apoptose(84). En effet, PARP1 joue aussi un rôle dans la mort cellulaire quand l'ADN ne peut être réparé. Il le fait de deux manières: comme participant direct dans le processus de l'apoptose et indirectement en épuisant les réserves de la cellule en nicotinamide, nécessaire pour la respiration cellulaire(126).

Figure 6. Fonctions des protéines PARP. Adapté de Sonnenblick et al.(84)

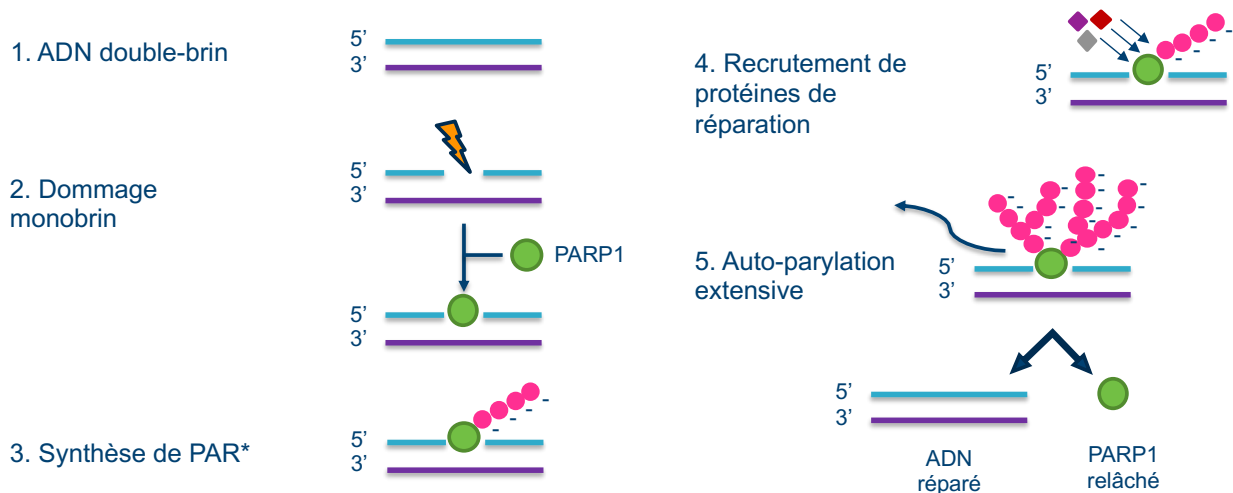


**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Légende : En plus de l'activité classique de PARP dans la réparation par excision de base, les membres de la famille PARP ont diverses fonctions dans d'autres processus biologiques, y compris la régulation transcriptionnelle, la modification de la chromatine, la mitose (formation du fuseau mitotique) et l'apoptose, ainsi que le trafic intracellulaire et le métabolisme énergétique (non montré)(84). PARP1 et, dans une moindre mesure, PARP2 sont importants dans le maintien de la longueur des télomères et de la stabilité chromosomique. PARP1 fait également partie du complexe corépresseur Groucho/TLE1 (transducin-like enhancer protein 1), et a été impliqué comme régulateur transcriptionnel de l'expression du récepteur des androgènes(84). D'autres PARP fonctionnent dans la réparation des dommages double-brins et dans la progression de la mitose (PARP3), et certaines ont des rôles potentiels dans la signalisation Wnt (Wingless-related integration site) et le maintien des télomères (PARP5 et PARP6)(84). PARP1 est également un régulateur de la réparation par assemblage d'extrémités non homologues, un mécanisme de réparation des dommages double-brins(84).

PARP1 et PARP2 ont pour fonction principale la réparation des dommages à l'ADN simple brin par excision de base(84, 127). PARP1 a aussi un rôle dans l'assemblage d'extrémités non homologues(84). PARP1 est la protéine PARP la plus abondante, PARP2 est moins abondante mais contribue à 5-10% de l'activité totale des PARP(128). PARP2 est essentielle à la survie de souris chez qui le gène PARP1 est inactivé(128). L'action de PARP1 pour la réparation des dommages à un brin de l'ADN est décrite à la **figure 7**.

Figure 7. Fonction de PARP1



Légende:

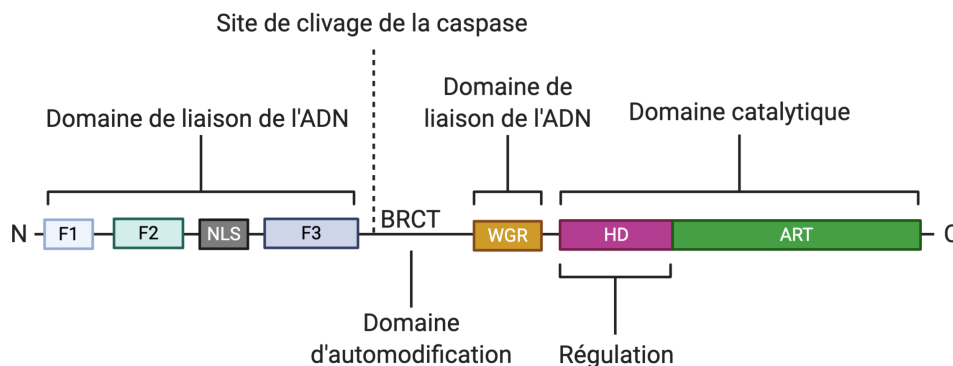
Abréviation : PAR, Poly ADP-Ribose

Lorsqu'il y a un dommage monobrin, PARP1 est recruté au site de dommage et synthétise des chaînes PAR chargées négativement. Cela entraîne le recrutement et la liaison de protéines de réparation. Puis, PARP1 synthétise des chaînes PAR en grande quantité sur lui-même. Cela le dissocie de l'ADN réparé.

PARP1 et PARP2 agissent comme des détecteurs de l'ADN endommagé. PARP1 et 2 reconnaissent les dommages à un brin de l'ADN, les dommages aux doubles brins de l'ADN, les liaisons covalentes, les dommages à la superhélice et les arrêts de la fourchette de réplication(126). Elles vont au noyau et des changements de conformation surviennent pour leur activation catalytique lorsqu'elles lient l'ADN endommagé(126).

PARP1 lie l'ADN avec son extrémité N-terminale en doigt de zinc, ce qui active son domaine catalytique à l'extrémité C-terminale(128) (**Figure 8**). Quand elles sont activées, les enzymes PARP1 utilisent le nicotinamide comme substrat pour catalyser des chaînes Poly ADP-Ribose sur des protéines cibles dans un processus appelé la "PARylation"(126). Ces protéines sont celles de la chromatine(128). Ces chaînes PAR sont chargées négativement. La PARylation des histones H2B et H1 relaxent la chromatine et permet d'accéder à l'ADN pour le réparer(126). Le point de contrôle G2/M est activé pour donner le temps à l'ADN d'être réparé, des protéines de réparation de l'ADN sont recrutées et la transcription est temporairement cessée(126, 128). PARP1 et 2 finissent par "s'autoPARyler" de manière extensive. Dû à la haute charge négative des polymères PAR, cette autoPARylation engendre leur dissociation de l'ADN(128).

Figure 8. Architecture des domaines de PARP1. Adapté de McCann et al.(126) et Dawicki et al.(127)



**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Légende:

Abréviations: ART, ADP-ribosyltransferase; BRCT, BRCA1 C-terminus; F, finger; HD, Helical Domain; NLS, Nuclear localization site; WGR, tryptophan-glycine-arginine-rich.

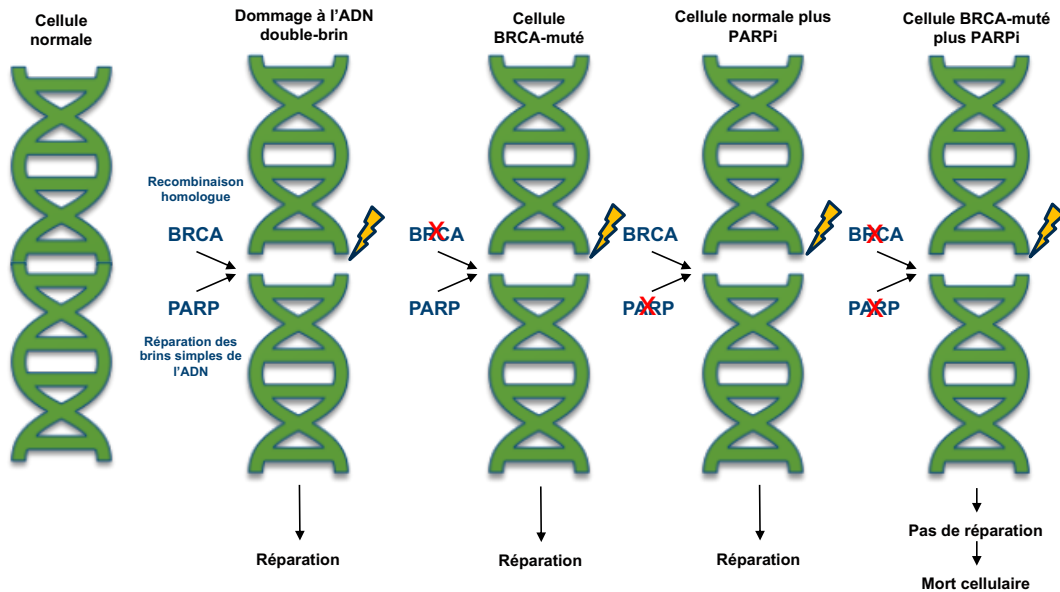
Les protéines PARP1 et PARP2 comprennent des domaines en doigt de zinc (F) de liaison à l'ADN et un signal de localisation nucléaire sur l'extrémité N-terminale(126). Leur domaine catalytique avec le site de liaison NAD⁺ est situé sur l'extrémité C-terminale. La protéine PARP1 possède un domaine BRCT unique, sur lequel elle s'auto-PARyle, subissant un changement de conformation qui la libère de l'ADN. PARP1 possède aussi un site de clivage par les caspases qui sépare les domaines de liaison à l'ADN du domaine d'automodification(126).

Les domaines protéiques de PARP1 et 2 incluent un domaine en doigt de zinc de liaison de l'ADN (comprenant des sous-domaines F1, F2, F3) et un signal de localisation nucléaire (NLS) sur l'extrémité N-terminale (**Figure 8**). Les sous-domaines F1, F2 et F3 lient une variété de structure y compris l'ADN endommagé(127). F3 permet aussi le contact avec les autres domaines de PARP, ce qui est crucial pour l'activation catalytique(127). Le domaine WGR participe à la liaison de l'ADN et au contact avec les autres domaines. Le domaine catalytique comprend deux sous-domaines: HD (Helical Domain) et ART (ADP-ribosyltransferase). Le domaine catalytique est situé à l'extrémité C-terminale et comprend un site de liaison du NAD⁺ (Nicotinamide Adenide Dinucleotide). Il existe un domaine BRCT (BRCA1 C-Terminus) uniquement sur PARP1. C'est sur ce domaine que PARP1 "s'autoPARyle". PARP1 détient aussi un domaine de clivage de caspase séparant le site de liaison de l'ADN des autres sites impliqués dans la fonction de réparation de l'ADN.

3.2. Mécanisme d'action des inhibiteurs de PARP

Les inhibiteurs de PARP ont deux mécanismes d'action principaux : la létalité synthétique et la formation de complexes cytotoxiques entre PARP1/2 et l'ADN(129). La létalité synthétique est un concept introduit par des généticiens(130). Il est défini par une situation où la combinaison de deux délétions géniques compromet de manière significative la viabilité cellulaire, tandis que la délétion d'un seul des deux gènes ne compromet pas la viabilité cellulaire(131) (**Figure 9**). Certaines délétions géniques germinales rendent la cellule tumorale vulnérable, comme les délétions dans les gènes BRCA1 ou BRCA2(130). L'action des PARPi est synthétiquement létale en présence d'une délétion BRCA1 ou BRCA2(132, 133). Ces délétions BRCA1/2 constituent le premier « hit ». La létalité synthétique des inhibiteurs de PARP s'appuie sur cette vulnérabilité issue de ce premier « hit ». Les inhibiteurs de PARP engendrent un deuxième « hit » en inhibant PARP1/2(130).

Figure 9. Létalité synthétique de l'activité des inhibiteurs de PARP. Adapté de Brower(134).



Légende:

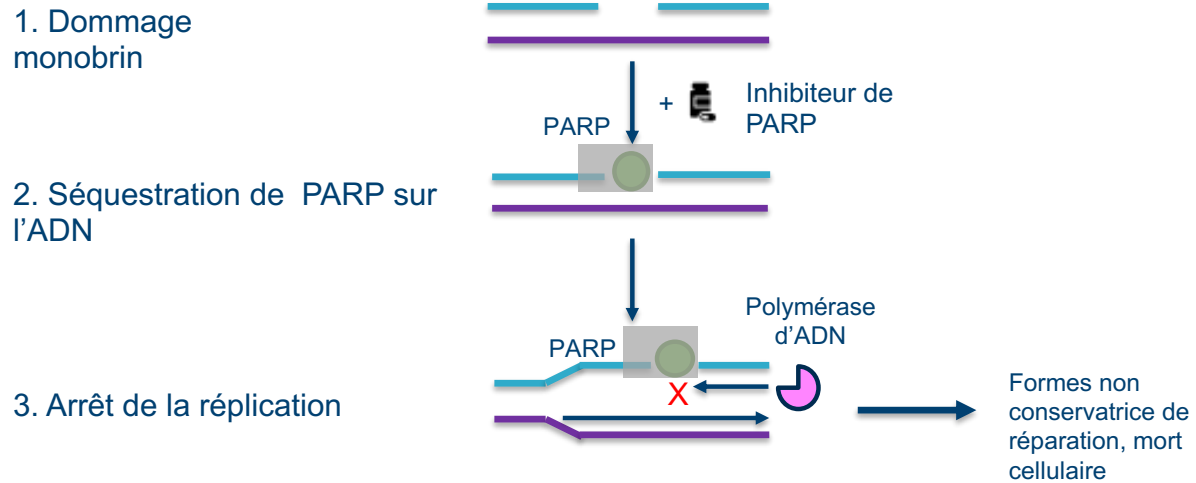
Abréviations: BRCA, Breast Cancer susceptibility gene; PARPi, inhibiteur de PARP

Les cellules cancéreuses dépourvues de protéines BRCA fonctionnelles (délétion BRCA1/2 germinale) peuvent encore réparer les dommages causés à l'ADN par des voies alternatives(126). Mais l'administration de thérapies ciblées pour inhiber les enzymes PARP s'est avérée synthétiquement létale en présence d'une mutation BRCA. Ainsi la mutation BRCA constitue le premier « hit » et l'inhibition de PARP par les PARPi constitue le deuxième « hit ». Sans enzymes PARP fonctionnelles les dommages monobrins mènent à des dommages double-brins. Les dommages double-brins doivent être réparés par recombinaison homologue; or, en l'absence de BRCA, la réparation par recombinaison homologue est déficiente. La cellule est donc sujette à d'autres formes de réparation qui amènent des erreurs et des réarrangements génomiques importants pouvant mener à la mort cellulaire.

Il a également été démontré que les inhibiteurs de PARP agissent comme des pièges et séquestrent PARP1/2 sur l'ADN endommagé (**Figure 10**). Ces complexes PARP-ADN sont cytotoxiques(128, 135). Ils agissent de deux manières(128):

1. Les inhibiteurs de PARP inhibent la liaison du nicotinamide, ce qui empêche l'autoPARylation extensive de PARP1/2 et entraîne la séquestration de PARP sur l'ADN.
2. En bloquant le site de liaison du nicotinamide, les inhibiteurs de PARP causent une activation allostérique de la liaison entre PARP et l'ADN.

Figure 10. Séquestration des complexes PARP-ADN. Inspiré de Murai et al.(128)



Légende :

La séquestration de complexes PARP-ADN dans le noyau empêche la progression de la polymérase d'ADN et arrête la réplication. D'autres voies de réparation qui sont non conservatrices de la séquence d'ADN initiale entrent donc en jeu et cela peut mener à une instabilité génomique et à la mort cellulaire.

Les deux mécanismes d'action des PARPi sont imbriqués : la létalité synthétique et la séquestration de complexes PARP/ADN dans le noyau. Les complexes nucléoprotéiques PARP/ADN séquestrés empêchent la polymérase d'ADN de répliquer l'ADN et de réparer les lésions monobrins(130). Cela conduit à des lésions double-brins. Dans une cellule normale, ces lésions double-brins sont réparées par recombinaison homologue à l'aide de BRCA1/2 et de plusieurs autres protéines de réparation(130). La réparation par recombinaison homologue est le processus optimal de réparation des lésions double-brins de l'ADN. En l'absence de protéines BRCA1/2 fonctionnelles, la recombinaison homologue ne peut pas avoir lieu et d'autres formes non conservatrices de réparation se mettent en place dans la cellule tumorale(130). Ces processus de réparation peuvent entraîner des réarrangements génomiques considérables, menant souvent (et non exclusivement) à la mort cellulaire et à la létalité synthétique(130).

3.3. Efficacité des inhibiteurs de PARP

Les inhibiteurs de PARP sont la première thérapie ciblée approuvée qui exploite la létalité synthétique(130). Les cinq inhibiteurs de PARP bien connus sont le talazoparib, le niraparib, l'olaparib, le rucaparib et le véliparib. La **figure 11** démontre les différents potentiels de séquestration des inhibiteurs de PARP. Le talazoparib a une activité de séquestration des complexes PARP/ADN 100 fois plus puissante que le niraparib(130). Le niraparib est plus puissant pour la séquestration que l'olaparib et le rucaparib(130). Le véliparib a la plus faible capacité de séquestration(130). Les trois inhibiteurs de PARP les plus communément étudiés en cancer du sein triple-négatif sont l'olaparib, le véliparib et le talazoparib (**Figure 12 et Tableau 11**).

Figure 11. Potentiel de séquestration des différents inhibiteurs de PARP. Adapté de Lord et al. 2017(130)

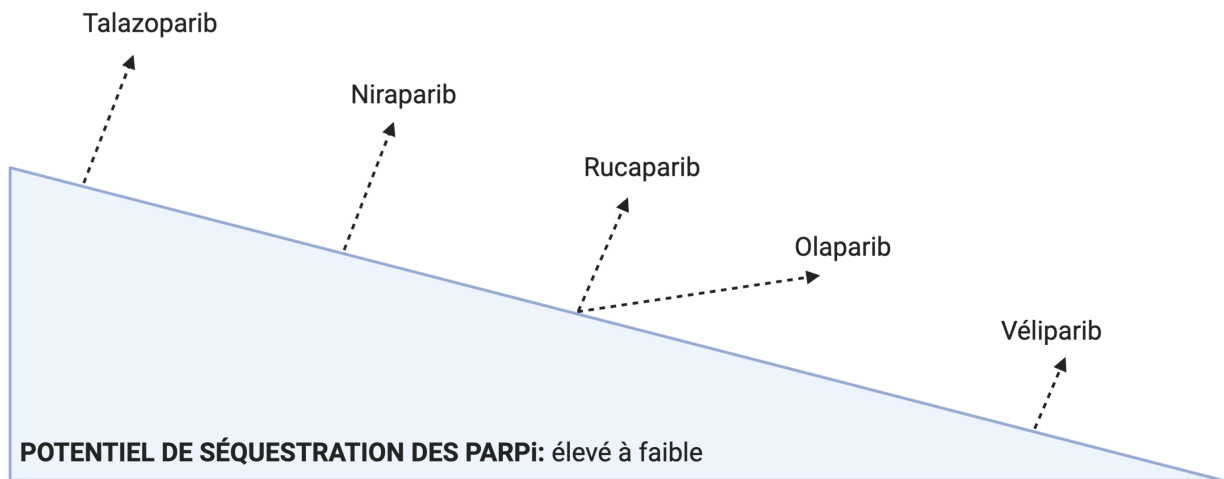
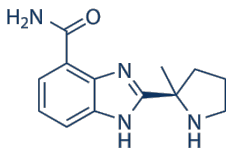
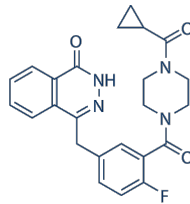


Figure 12. Structure du véliparib, de l'olaparib et du talazoparib.(136, 137).

A Véliparib



B Olaparib



C Talazoparib

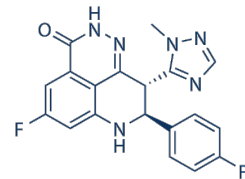


Tableau 9. Activité du véliparib, de l'olaparib et du talazoparib(136, 137).

	Activité catalytique (nmol/L)	Activité de séquestration (μmol/L)
Véliparib	4.7	50
Olaparib	1.9	10
Talazoparib	0.6	0.1

L'efficacité des inhibiteurs de PARP a été démontrée chez des tumeurs ayant un défaut au niveau de la réparation par recombinaison homologue de l'ADN(130, 138, 139). Les inhibiteurs de PARP ont été démontrés efficaces chez les patientes ayant des mutations germinales BRCA1/2 en mélanome, cancer de la prostate, de l'ovaire et du sein(130, 139-141). Le rucaparib et l'olaparib ont été étudié au début du développement clinique des inhibiteurs de PARP(130). Les premiers essais cliniques de phase I/Ib à avoir prouvé le concept de la létalité synthétique au niveau clinique ont démontré que les patientes avaient une réponse clinique soutenue avec l'olaparib(139-141). La toxicité des inhibiteurs de PARP est inférieure à celle de la chimiothérapie(130). En plus de leur faible toxicité les inhibiteurs de PARP sont disponibles par voie orale, ce qui représente un avantage pour les patientes.

3.3.1. Cancers du sein ayant une mutation germinale BRCA1/2

L'olaparib, puis le talazoparib furent approuvés en monothérapie par Santé Canada pour la prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein métastatique HER2-négatif. Le talazoparib fut aussi approuvé en adjuvant pour les tumeurs localement avancées HER2-négatives ne se prêtant pas à des traitements curatifs par radiothérapie ou chirurgie. Cela fait suite à deux essais cliniques randomisés de phase III démontrant leur supériorité par rapport à la chimiothérapie standard(132, 133). Il s'agit de l'étude OlympiAD(132) et de l'étude EMBRACA(133).

L'étude OlympiAD compara deux interventions (N=302): l'olaparib en monothérapie versus la chimiothérapie standard(132). L'issue primaire de l'étude était la survie sans progression. Les participantes étaient des femmes de 22 à 76 ans atteintes de cancer du sein métastatique HER2-négatif. Les participantes n'avaient pas reçu plus de deux lignes de chimiothérapie. Les résultats démontrèrent que la survie médiane sans progression était supérieure dans le groupe traité à

l'olaparib (7 mois vs 4.2 mois, HR=0.57, P<0.001). Les taux de réponse objective, évalué par les critères RECIST(142) étaient de 59.9% chez le groupe olaparib versus 28.8% chez les patientes qui ont reçu la chimiothérapie(132).

Des résultats similaires furent également rapportés dans l'essai EMBRACA(133). Les patientes étaient atteintes de cancer du sein métastatique ou localement avancé(51). Aucune participante n'avait reçu plus de deux lignes de chimiothérapie avant l'étude. La survie médiane sans progression était supérieure dans le groupe traité au talazoparib (8.6 mois vs 5.6 mois; HR=0.54, P<0.001). Les taux de réponse objective, selon les critères RECIST, étaient aussi plus élevés avec le talazoparib en monothérapie : 62.6% versus 27.7%.

3.3.2. Cancers du sein n'ayant pas de mutation germinale BRCA1/2

Certaines patientes ont une mutation somatique dans des gènes importants pour la réparation par recombinaison homologue, conférant à ces tumeurs un phénotype similaire à celui des tumeurs BRCA-muté au niveau germinale. Ce sont les tumeurs démontrant le phénotype "BRCAness". Par exemple, des mutations somatiques dans BRCA1 ou BRCA2 résultent en une copie partielle du phénotype des tumeurs transmises héréditairement par mutation germinale(130). D'autres exemples sont l'hyperméthylation somatique du promoteur de BRCA1 ou des mutations dans d'autres gènes importants pour la réparation des dommages aux double-brins de l'ADN (e.g., ATM, ATR, PALB2)(130). La sensibilité des inhibiteurs de PARP pour ces tumeurs a été démontré dans des modèles précliniques(35, 143). Ainsi, en présence de ces mutations, les inhibiteurs de PARP peuvent avoir une activité synthétiquement létale car la réparation par recombinaison homologue ne peut pas avoir lieu. La cellule tumorale passe alors à des formes non conservatrices de réparation amenant souvent des réarrangements génomiques considérables et la mort cellulaire. Il n'y a pas de test clinique ou de critères diagnostiques pour le "BRCAness".

La sensibilité du cancer du sein triple-négatif BRCA non-muté aux inhibiteurs de PARP est peu comprise. Quelques études précliniques ont démontré une efficacité des inhibiteurs de PARP chez un sous-groupe de tumeurs BRCA non-muté dans des lignées cellulaires et des modèles de

croissance tumorale *in vivo*(91, 144-146). Cependant, il est difficile de tirer des conclusions des études cliniques.

En 2011, un essai clinique de phase II multicentrique évalua l'efficacité de l'olaparib en monothérapie chez 26 cancers du sein triple-négatif(147). L'issue primaire était la réponse objective tumorale. Les participantes étaient atteintes de cancer du sein récidivant avancé ou métastatique et ont reçu la dose standard efficace d'olaparib. Parmi les 26 tumeurs triple-négatives, 16 étaient BRCA non-muté et 10 BRCA-muté. Aucune réponse objective à l'olaparib ne fut élicité chez les tumeurs triple-négatives (BRCA muté et non muté). L'analyse de ces résultats est modulée par le fait que le pronostic des participantes était d'emblée réservé avant leur inclusion dans l'étude(147). Celles-ci avaient reçues avant l'étude jusqu'à sept lignes de chimiothérapie, ce qui sous-entend une résistance thérapeutique de leurs tumeurs(147). De plus, tel que le souligne les auteurs, l'absence de résultat positif peut être expliqué par le seul fait du hasard, compte-tenu de la petite taille de l'échantillon(147). Malgré un taux d'adhérence au traitement élevé, 31% des patientes ont dû avoir une diminution de leur dose ou une interruption thérapeutique, à cause d'effets secondaires. Par ailleurs, l'essai n'était pas randomisé, donc le devis même de l'étude n'était pas optimisé pour répondre à la question de recherche.

En 2016, l'essai clinique randomisé de phase II I-SPY 2 compara l'effet du véliparib, associé au carboplatin, à la chimiothérapie standard préopératoire en cancer du sein HER2-négatif(148). L'issue primaire de cette étude était la réponse pathologique complète. Les sujets étaient des patientes de stade tumoral II ou III(51). Le taux de réponse pathologique complète était de 33% dans le groupe expérimental versus 22% dans le groupe contrôle. Ce bénéfice était concentré chez les tumeurs triple-négatives (51% vs 26%)(148).

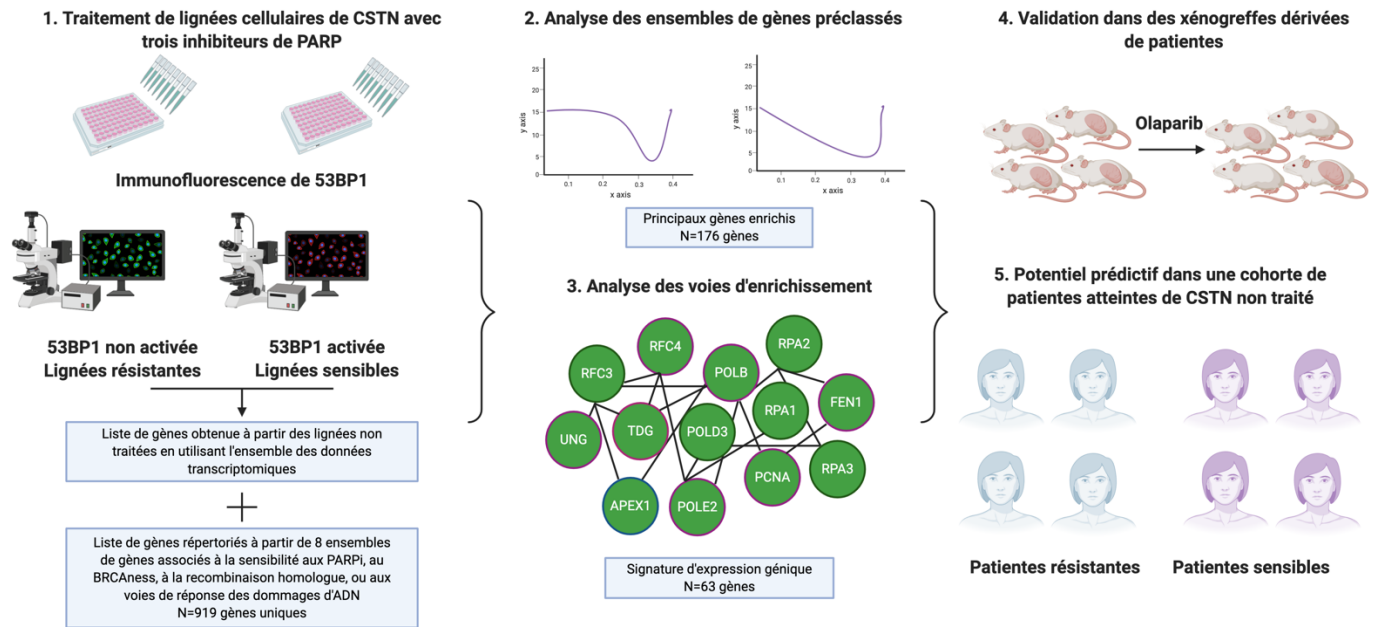
Cependant, les résultats de cet essai clinique furent remis en question en 2018 par l'étude BrighTNess(115). Celle-ci fut construite pour évaluer le rôle isolé du véliparib, indépendamment du carboplatin, sur les taux de réponses pathologiques complètes de 634 patientes atteintes de CSTN. L'essai BrighTNess est un essai randomisé contrôlé de phase III dans 15 pays. Celui-ci évalua trois groupes de traitement: le veliparib, le veliparib-carboplatin, et le veliparib-carboplatin associé à la chimiothérapie. Tout comme l'étude I-SPY 2, les patientes étaient de stade tumoral II

ou III. L'addition de veliparib au carboplatin et à la chimiothérapie n'eut aucun effet sur la réponse pathologique complète. Les taux de réponse menant à une conversion de la chirurgie à une chirurgie de conservation mammaire étaient supérieurs chez le groupe ayant reçu du véliparib (62% vs 44%)(115). Dans cette étude, les agents thérapeutiques étaient administrés simultanément, or la séquence d'administration du carboplatin et des inhibiteurs de PARP n'est pas encore déterminée. Le véliparib est l'inhibiteur de PARP avec le moins d'effets secondaires, ce qui se reflète aussi au niveau de son efficacité. Il a un potentiel plus faible de séquestration de PARP1/2 dans le noyau et génère moins d'apoptose chez les cellules tumorales comparativement à l'olaparib et au talazoparib(146). Enfin, la dose administrée de véliparib était inférieure à la dose maximale tolérée, ce qui peut entraîner un biais de mesure au niveau de son efficacité.

Devant ces contradictions entre les études de laboratoire et les études cliniques, l'identification des tumeurs BRCA non-muté qui seraient sensibles aux inhibiteurs de PARP servirait de base à des études cliniques futures. Cela nécessite des études translationnelles permettant de sélectionner les patientes potentiellement sensibles, afin de les traiter avec des PARPi pour objectiver leur efficacité.

Ainsi, notre groupe a précédemment développé une signature d'expression génique de 63 gènes prédisant la réponse aux PARPi (**Figure 13**)(146). Cette signature génétique de 63 gènes a été développée en trois étapes principales : une composante *in vitro*, une étape bioinformatique et une validation dans des xénogreffes dérivées de patientes. Les xénogreffes dérivées de patientes sont des souris immunodéficientes dans lesquelles des fragments tumoraux sont insérés. D'abord, huit lignées cellulaires (dérivées de tumeurs primaires et métastatiques) furent traitées en monothérapie pendant 10 jours avec un des trois inhibiteurs de PARP suivants : l'olaparib, le véliparib et le talazoparib. Les foci de 53BP1 (p53 binding protein 1), marqueur de la réponse aux dommages de l'ADN double-brin, furent comptés après le traitement avec chacun des PARPi afin de déterminer le nombre moyen de foci par cellule et le pourcentage de cellules positives. 53BP1 promeut l'assemblage d'extrémités non homologues et réduit la recombinaison homologue, ce qui expose la cellule à davantage d'erreurs mutagènes(149).

Figure 13. Développement de la signature génétique de 63 gènes. Adapté de Beniey et al.(150)



**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Légende :

Abréviations : CSTN, cancer du sein triple-négatif; 53BP1, P53 binding protein 1

Cette figure décrit les cinq grandes étapes de la création de la signature génétique : 1) huit lignées cellulaires de CSTN ont été traitées avec de l'olaparib, du talazoparib et du véliparib durant 10 jours. Les lignées cellulaires étaient : MDAMB436, MDAMB231, MDAMB453, MDAMB468, HCC1143, HCC1937, HCC1806, and HCC1395. Puis, un marquage d'immunofluorescence a été fait pour 53BP1 afin de cibler les zones de réparation aux dommages de l'ADN. Un total de 25 images furent acquises par puit et un score de 53BP1 a été utilisé pour classer les lignées en deux groupes : sensible et résistante. Les différences d'expression génique entre ces deux groupes furent analysées pour les gènes associés à la sensibilité aux PARPi, à la recombinaison homologue, au BRCAness. 2) Une liste de classement des gènes a été produite à partir de la division de l'expression génique moyenne des lignées sensibles par l'expression génique moyenne des lignées résistantes. 3) Les voies statistiquement associées aux principaux gènes enrichis furent déterminées par une analyse des voies d'enrichissement. Une liste finale de 63 gènes enrichis fut établie. 4) La signature fut validée dans des xénogreffes dérivées de patientes atteintes de CSTN qui avaient été traitées à l'olaparib afin d'établir la précision de prédiction de la signature. 5) La proportion de patientes prédites sensibles et résistantes aux PARPi par la signature génétique a été évaluée dans une cohorte de patientes.(146)

Les cellules furent classées en deux groupes : sensibles et résistantes aux inhibiteurs de PARP, en utilisant le pourcentage de cellules positives(146). Les gènes associés à la réponse de 53BP1 ont

été identifiés et parmi eux, 63 gènes uniques furent isolés au moyen d'ensembles de gènes et d'analyses des voies fonctionnelles enrichies(146) (**Tableau 12**). La signature génétique a été validée dans une cohorte de sept xénogreffes dérivées de patientes(146). Cette signature génétique avait une précision globale élevée de 86% par rapport à d'autres ensembles de gènes(146).

Tableau 10. Gènes de la signature génétique et voies cellulaires fonctionnelles associées.
Adapté de Hassan et al.(146)

Voie du réactome (majeure, mineure)	Valeur nominale	P FDR	Gènes
Cycle cellulaire	1.11 ^{E-16}	1.47 ^{E-14}	
Points de contrôle du cycle cellulaire	1.98 ^{E-12}	9.52 ^{E-11}	RFC4, PSMA6, RFC2, MRE11A, ANAPC10, CHEK1, RNF168, BRCA1, NBN, TP53, MCM2, MCM3, MCM5, MCM6, SUMO1, PSMD14, PSMD12, BARD1
Cycle cellulaire, mitotique	9.39 ^{E-11}	2.44 ^{E-09}	KNTC1, ESCO2, RFC4, PSMA6, RFC2, ZWINT, ANAPC10, POLE2, GINS2, GINS3, GINS4, DHFR, PCNA, SEH1L, PRKCA, MCM2, MCM3, MCM5, MCM6, RRM2, TYMS, BUB1, FEN1, PSMD14, PSMD12
Maintenance des chromosomes	2.56 ^{E-04}	2.44 ^{E-03}	RFC4, RFC2, POLE2, PCNA, FEN1, TERF1
Méiose	1.80 ^{E-08}	3.75 ^{E-07}	RAD51C, MND1, BLM, MRE11A, BRCA1, NBN, PSMC3IP, RAD51, TOP3A, TERF1
Réparation de l'ADN	1.11 ^{E-16}	1.47 ^{E-14}	
Réparation par excision de base	1.30 ^{E-08}	2.86 ^{E-07}	LIG3, POLB, RFC4, RFC2, TDG, PCNA, UNG, FEN1
Dérivation des dommages à l'ADN	3.18 ^{E-03}	0.0191	USP1, RFC4, RFC2, PCNA
Réparation des dommages double-brins	2.68 ^{E-06}	4.29 ^{E-05}	MRE11A, RNF168, BRCA1, NBN, TP53, SUMO1, BARD1
Réparation par excision de nucléotide	8.15 ^{E-05}	8.66 ^{E-04}	LIG3, RFC4, RFC2, PCNA, INO80D, XPA, POLR2D, SUMO1
Réparation des mésappariements	1.18 ^{E-03}	8.62 ^{E-03}	PCNA, EXO1, MSH2
Voie de l'anémie de Fanconi	0.0133	0.0624	USP1, FANCE, FANCC
Mort cellulaire programmée	0.0189	0.0756	MLKL, PSMA6, TP53, DAPK1, PSMD14, PSMD12

Légende:

Abréviation : FDR, False discovery rate

La valeur P nominale représente la significativité statistique du score d'enrichissement pour un ensemble de gènes.

4. La relation entre le carboplatin et les inhibiteurs de PARP

La réparation par excision de base est un des mécanismes principaux de réparation des dommages entraînés par le carboplatin(125). La réparation par excision de base est aussi le mécanisme de réponse aux dommages monobris dans lequel PARP1/2 sont majoritairement impliquées. Chacune des étapes de la réparation par excision de base génère des intermédiaires tels que les sites AP, les résidus 5'-deoxyribose phosphate et les lésions monobris(125). Ces intermédiaires sont souvent plus toxiques que la lésion à l'origine de la réparation par excision de base(125). Il est donc nécessaire que la réparation par excision de base soit étroitement régulée afin d'éviter une accumulation de ces intermédiaires toxiques.

PARP joue un rôle prépondérant dans la réparation des lésions monobris générées durant la réparation par excision de base(125). PARP détecte la présence de ces lésions monobris et recrute la machinerie enzymatique de réparation(125). Les souris et les cellules PARP1^{-/-} ont une sensibilité accrue aux agents alkylants(125). Cela indique que la combinaison entre les inhibiteurs de PARP et les agents alkylants, comme le carboplatin, serait une stratégie efficace(125). En cancer du sein triple-négatif, le carboplatin activerait donc la réparation par excision de base dans les cellules tumorales ; et l'inhibiteur de PARP inhiberait la réparation des lésions monobris toxiques générées.

PARP1 lie avec affinité les lésions de l'ADN causées par la chimiothérapie à base de sels de platine(151, 152). Les inhibiteurs de PARP empêchent la réparation de ces lésions monobris causées par les adduits entre l'ADN et les complexes réactifs de platine(153). De plus il a été démontré que les inhibiteurs de PARP entraînent une dissociation entre les lésions d'ADN causées par les sels de platine et les protéines de réparation (incluant PARP1)(152). PARP1 et les autres protéines de réparation ne peuvent donc plus effectuer leur rôle. Cela suggère une efficacité accrue des PARPi lorsque donnés après une chimiothérapie à base de sels de platine.

Plusieurs études précliniques ont démontré une synergie entre le carboplatin (ou le cisplatine) et les inhibiteurs de PARP donnés simultanément(136, 154-157). Ces études ont employé des lignées cellulaires et des xénogreffes de cancer du sein majoritairement BRCA-muté. Clark et al ont démontré une synergie dans des lignées cellulaires BRCA1/2 non-muté et une efficacité accrue dans des xénogreffes BRCA1/2 non-muté au niveau de la tumeur primaire(156). La combinaison simultanée est cependant connue pour des effets secondaires importants au niveau hématologique, notamment une neutropénie(158). Une autre option est de donner le carboplatin avant ou après l'inhibiteur de PARP (i.e., administration séquentielle). Or, il n'existe que de maigres données sur l'administration séquentielle (et non simultanée) du carboplatin et des inhibiteurs de PARP.

Les résultats préliminaires d'une étude préclinique réalisée par Rottenberg et al ont démontré que l'administration du carboplatin en premier lieu et d'un inhibiteur de PARP (i.e., olaparib) en second lieu entraînait une meilleure efficacité dans un modèle murin de cancer du sein(159). L'effet de cette stratégie sur la toxicité pourrait aussi être avantageux car Lee et al ont démontré que l'administration du carboplatin 24h avant celle de l'olaparib augmentait l'élimination de l'olaparib de 49%(153). Cela fut démontré dans une étude de phase I incluant un faible nombre de patientes atteintes de cancer du sein (N=14)(153). De plus, des cellules mononucléaires périphériques sanguines de volontaires sains ont été traitées avec 24h de carboplatin puis 1h d'olaparib(153). Comparativement aux cellules contrôles, qui avaient été pré-traitées avec de l'eau au lieu du carboplatin, les cellules pré-traitées au carboplatin avaient une augmentation significative de leur concentration en olaparib (i.e., >30%)(153).

5. Problématiques, hypothèses et objectifs

5.1. Implications cliniques de la signature génétique de 63 gènes

5.1.1. Problématiques

Premièrement, la signature génétique est un outil de prédiction de la réponse aux PARPi(146). Celle-ci classe les patients en deux groupes : 1) Groupe prédit sensible aux PARPi (enrichissement de l'expression des gènes) et 2) Groupe prédit résistant aux PARPi (absence d'enrichissement de

l'expression des gènes). Les gènes de la signature génétique sont impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la mort cellulaire programmée(146). L'enrichissement de plusieurs de ces gènes a aussi une importante valeur pronostique en cancer du sein, servant de base à la classification en sous-groupes intrinsèques. La classification en sous-groupes intrinsèques est un facteur pronostique génomique(61). Ainsi, l'enrichissement des gènes de la signature génétique pourrait être associé à d'autres facteurs pronostiques, notamment des facteurs cliniques.

Deuxièmement, des mutations dans plusieurs des gènes inclus dans la signature génétique sont associées au phénotype de « BRCAness »(35). Il a été démontré que les mutations de ces gènes conféraient une sensibilité aux PARPi, et aux agents alkylants, car elles concernent des gènes requis pour la réparation de l'ADN par recombinaison homologue(35). Ces mutations pourraient également avoir une signification pronostique et être davantage présentes dans des catégories de cancers du sein connues pour un mauvais pronostic. La proportion de patientes avec des mutations dans ces gènes parmi les différents groupes pronostiques en cancer du sein est méconnue, ainsi que les gènes les plus fréquemment mutés.

5.1.2. Hypothèses

1. Il n'y a pas de corrélations entre l'enrichissement de la signature génétique de 63 gènes et les principaux facteurs pronostiques en cancer du sein triple-négatif;
2. La proportion de patientes avec des mutations dans les gènes de la signature génétique est plus élevée dans les sous-groupes intrinsèques en cancer du sein connus pour un mauvais pronostic;
3. La proportion d'échantillons avec des mutations dans les gènes de la signature génétique est plus élevée dans les contextes cliniques de mauvais pronostic.

5.1.3. Objectifs

1. Déterminer les implications cliniques de la signature génétique en évaluant:
 - 1.1. Les corrélations entre la signature d'expression génique de 63 gènes et les facteurs pronostiques;

- 1.2. La proportion de patientes avec des mutations dans les gènes de la signature parmi différents groupes pronostiques : les sous-groupes intrinsèques du cancer du sein, les patientes pré et post chimiothérapie et chez les différents sites de cancers du sein métastatiques;
- 1.3. Les gènes de la signature les plus fréquemment mutés parmi les groupes de mauvais pronostic.

5.2. Séquence optimale d'administration du carboplatin et du talazoparib *in vivo*

5.2.1. Problématiques

Le premier problème est le suivant. L'efficacité des inhibiteurs de PARP a été démontrée chez les tumeurs BRCA-muté(132, 133). Cependant, les mutations germinales dans les gènes BRCA1 et BRCA2 ne sont associées qu'à environ 6% des cancers du sein, la majorité des cas étant sporadique(32). Le rôle des inhibiteurs de PARP chez les tumeurs BRCA non-muté est mal défini.

Le deuxième problème est le suivant. Dans les essais cliniques en CSTN, les inhibiteurs de PARP sont donnés simultanément à plusieurs chimiothérapies. Cela empêche l'analyse isolée de la sensibilité aux inhibiteurs de PARP en monothérapie. De plus, les résultats des essais cliniques et des études précliniques ne fournissent pas de données claires sur l'administration séquentielle des inhibiteurs de PARP et de la chimiothérapie. Les données détaillées dans la section 4 de l'introduction suggèrent que l'administration séquentielle du carboplatin avant les inhibiteurs de PARP augmenterait leur efficacité et diminuerait leur toxicité comparativement à l'administration simultanée des deux agents(153, 159).

5.2.2. Hypothèses

1. L'administration du carboplatin en premier, suivi du talazoparib en deuxième (i.e., minimum 24h après) constitue un prétraitement qui:
 - 1.1 Sensibilise la tumeur primaire au talazoparib et augmente son efficacité;
 - 1.2 Sensibilise les métastases à distance au talazoparib et augmente son efficacité;
 - 1.3 Entraîne moins de toxicité que l'administration simultanée des deux thérapies.

5.2.3. Objectifs

1. Déterminer la séquence optimale d'administration du talazoparib et du carboplatin *in vivo* en cancer du sein triple-négatif BRCA non-muté en évaluant :

- 1.1 La croissance tumorale primaire;
- 1.2 Le développement de métastases;
- 1.3 La toxicité.

Chapitre 2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Implications cliniques de la signature génétique de 63 gènes

1.1. Cohortes et base de données

Une base de données génomiques publiquement accessible en ligne fut utilisée : *cBioPortal for cancer genomics*(160, 161). Pour les analyses corrélationnelles entre la signature d'expression génique et les facteurs pronostiques étudiées, une cohorte de 82 tumeurs triple-négatives fut employée(162) (**Tableau 13**). Dans cette cohorte, nous avons exclu une patiente qui était la seule patiente de stade IV. La stadification des cancers du sein fut réalisée selon la 7^{ème} édition du Cancer Staging Manual de l'AJCC (American Joint Committee on Cancer) car ce sont les données qui étaient disponibles pour ces tumeurs(163).

Tableau 11. Description des cohortes employées pour l'évaluation de la signature génétique(160-162).

Étude	Cohorte	Tumeur	Exclusions	Patientes (N)	Échantillons (N)
Ciriello G et al.	TCGA	Primaire	Stade IV	81	
Curtis C et al.	METABRIC	Primaire	Stade 0 et IV, CCIS, sarcome, tumeur phyllodes, absence de sous-groupe intrinsèque	1947	
PanCancer Atlas	TCGA	Primaire	Stade IV, post thérapie néoadjuvante, absence de sous-groupe intrinsèque	957	
Razavi P et al.	MSKCC	Primaire	Traitement antérieur ou antécédent de cancer du sein		846
		Métastase	Aucune		1000

Légende:

Abréviations: CCIS, Carcinome canalaire in situ; METABRIC, Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium; MSKCC, Memorial Sloan Kettering Cancer Center; TCGA, The Cancer Genome Atlas

Pour l'analyse mutationnelle de la signature génétique, nous avons obtenu les données de trois cohortes distinctes : METABRIC (Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium)(164), TCGA (The Cancer Genome Atlas) du Pancancer Atlas et la cohorte de cancer du sein du Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC)(165) (**Tableau 13**). Dans la cohorte METABRIC, nous avons exclu les patientes de stade 0, de stade IV et atteintes d'autres types de cancer du sein (i.e., carcinomes in situ, sarcomes, tumeurs phyllodes). Nous avons aussi exclu les patientes dont le sous-groupe intrinsèque n'était pas connu. Dans la cohorte TCGA les patientes exclues étaient de stade IV, traitées par chimiothérapie néoadjuvante, et de sous-groupe intrinsèque inconnu. Dans la cohorte du MSKCC les échantillons primaires des patientes ayant déjà reçu de la chimiothérapie dans le passé ou ayant un antécédent de cancer du sein furent exclus.

Les informations sur les mutations furent fournies par la plateforme cBioPortal qui les tire des publications des auteurs. Les mutations évaluées étaient des mutations somatiques. Nous avons inclus tous les types de mutations sans distinction dans l'analyse. Pour la cohorte METABRIC, un séquençage ciblé pour 173 gènes a été réalisé par les auteurs(164). Pour la cohorte TCGA, les mutations furent détectées par séquençage de l'exome complet(162). Pour la cohorte MSKCC, les mutations ont été détectées par un essai personnalisé appelé MSK-IMPACT. Cet essai de séquençage incluait les gènes d'intérêt des thérapies ciblées et est capable de détecter les mutations de séquence, les petites insertions et délétions, les altérations du nombre de copies et certains réarrangements structurels(165).

1.2. Analyse statistique

D'abord nous avons évalué la proportion de patientes prédites sensibles ou résistantes aux PARPi par la signature d'expression génique dans différents groupes pronostiques. Les variables considérées étaient l'âge, la taille tumorale, la présence de métastase ganglionnaire et le stade

tumoral. La présence et l'absence d'enrichissement de la signature génétique avait été précédemment analysée par notre groupe au moyen d'un algorithme de vote pondéré(146). L'analyse statistique des corrélations entre la signature d'expression génique et les variables pronostiques étudiées a été réalisée avec un test de Chi-carré de Pearson dans Stata SE (version 13.1, Statacorp, Texas).

Puis, nous avons analysé la proportion de patientes avec des mutations dans les gènes de la signature parmi les différents sous-groupes intrinsèques de cancer du sein. Un test Chi-carré de Pearson fut réalisé pour comparer les proportions de patientes ayant une mutation dans au moins un des 63 gènes dans les sous-groupes luminal A et luminal B. Une régression de Cox a été réalisée pour l'analyse de survie au sein des différents sous-groupes intrinsèques en comparant la survie globale et la survie spécifique au cancer du sein chez les patientes avec et sans mutations.

Ensuite, nous avons analysé la proportion d'échantillons primaires et métastatiques mutés dans différents contextes cliniques. Ici l'unité d'analyse était donc devenue l'échantillon tumoral primaire ou métastatique et non la patiente atteinte de cancer du sein. Nous avons comparé la proportion d'échantillons mutés entre les tumeurs primaires non traitées (i.e., groupe de référence) et les échantillons primaires de patientes avec des cancers métastatiques de novo, les échantillons primaires post thérapie systémique néoadjuvante, les échantillons de récurrences locorégionales et les échantillons de métastases. Des tests de Chi-carré de Pearson furent réalisés pour comparer les proportions d'échantillons mutés entre les catégories cliniques et les échantillons primaires non traités comme groupe de référence. Enfin, nous avons analysé la proportion d'échantillons métastatiques mutés pour différents sites de métastases de cancer du sein.

Pour l'ensemble des analyses, des intervalles de confiance ont été calculés pour un degré de confiance de 95%. La vérification des hypothèses statistiques a été effectuée avec un seuil alpha de 0.05.

2. Séquence optimale d'administration du talazoparib et du carboplatin *in vivo*

2.1. Culture cellulaire

Nous avons employé quatre lignées cellulaires différentes de CSTN : MDAMB231, MDAMB436, HCC1806 et SUM149PT. Ces lignées ont été choisies après une revue de la littérature car elles ont démontré une capacité de croissance *in vivo* dans plusieurs études et une capacité de métastases dans des souris immunosupprimées(166-168). De plus, elles ont démontré une sensibilité aux inhibiteurs de PARP. Les lignées MDAMB231 et MDAMB436 sont des carcinomes canaux infiltrant dérivées de métastases pleurales de deux patientes distinctes (i.e., effusion pleurale)(169, 170). La lignée HCC1806 est un carcinome acantholytique squameux issue d'une tumeur primaire d'une patiente(171). La lignée SUM149PT provient d'un nodule métastatique de carcinome canalaire infiltrant inflammatoire humain(172, 173). Toutes les lignées ont été testées pour la présence de pathogènes murins, incluant le mycoplasme. Une analyse STR (Single Tandem Repeat) a été faite au centre génome Québec afin de s'assurer de l'authenticité des lignées ainsi qu'un test éliminant la présence de pathogènes pour les rongeurs.

Les cellules avec un faible niveau de passage étaient utilisées pour l'injection. Le milieu de culture pour les lignées MDAMB231 et MDAMB436 est du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) + FBS (Fetal Bovine Serum) 10%. Le milieu de culture pour HCC1806 est du RPMI (Roswell Park Memorial Institute) + FBS 10%. Le milieu de culture pour SUM149PT est composé de Ham's F12, de FBS 5%, d'insuline, de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) et d'hydrocortisone. Le passage des cellules se faisait lorsque les cultures démontraient 70 à 90% de confluence.

Le jour de l'injection de cellules, les cellules étaient lavées, trypsinisées, comptées, lavées deux fois et le culot était reconstitué dans 50% de matrigel, 25% de PBS (phosphate-buffered saline) et 25% de collagène. Le **tableau 14** décrit les concentrations injectées pour chaque étape du projet. Nous injectons 5 millions ou 2 millions de cellules. Les lignées cellulaires proviennent du laboratoire de Dr Joe Gray à Oregon Health and Science University (Portland, Oregon) et d'ATCC

(American Type Culture Collection). Les caractéristiques moléculaires et mutationnelles des lignées sont décrites dans le **tableau 15**.

Tableau 12. Concentrations de cellules injectées pour chaque étape de l'étude.

Étape	Concentration de cellules ($\times 10^6/200 \mu\text{l}$)			
	MDAMB231	MDAMB436	HCC1806	SUM149PT
Projet pilote	2	2	5	5
Étude expérimentale	5	na	5	na

Légende:

Abréviations : C, concentration; na, non applicable

Tableau 13. Caractéristiques moléculaires des lignées cellulaires et mutations somatiques de gènes associés au cancer du sein(91, 146, 174, 175).

Lignée cellulaire	MDAMB436	MDAMB231	HCC1806	SUM149PT
Temps de dédoublement (heures)	89.3	25.0	36.7	33.95
Sous-groupe intrinsèque(61)	Claudin-low	Claudin-low	Basal	Basal
Sous-type de CSTN(91)	MSL	MSL	BL2	BL2
Mutation du gène TP53				
Mutation du gène BRCA1				
Mutation du gène ATM				
Déficiance dans le gène PTEN				

Légende:

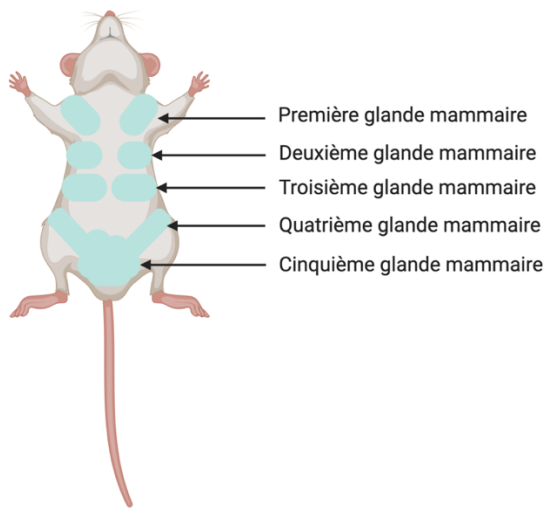
Abréviations: ATM, Ataxia-Telangiesctasia mutated; BL2, Basal-like 2; MSL, mesenchymal stem-like; PTEN, Phosphatase And Tensin Homolog; TP53, tumor protein p53

Les cases en bleu indiquent la présence d'une mutation/déficiance.

2.2. Xénogreffes orthotopiques

Les souris ont été opérées sous anesthésie générale entre 6 et 8 semaines d'âge. L'analgésie péri-opératoire était réalisée avec du carprofen (20 mg/kg sc) et du tylnol. La souris était placée en décubitus dorsal sur un champ stérile. Une incision radiale de 0.5 cm au-dessus de la 4^{ème} glande mammaire (**Figure 14**) était réalisée avec des ciseaux. La glande mammaire était libérée de ses adhérences avec la peau. La suspension de cellules tumorales était injectée avec une aiguille 27G dans la glande mammaire. La peau était refermée avec un surjet sous-cuticulaire.

Figure 14. Glandes mammaires des souris. Adapté de Finn et al.(176)



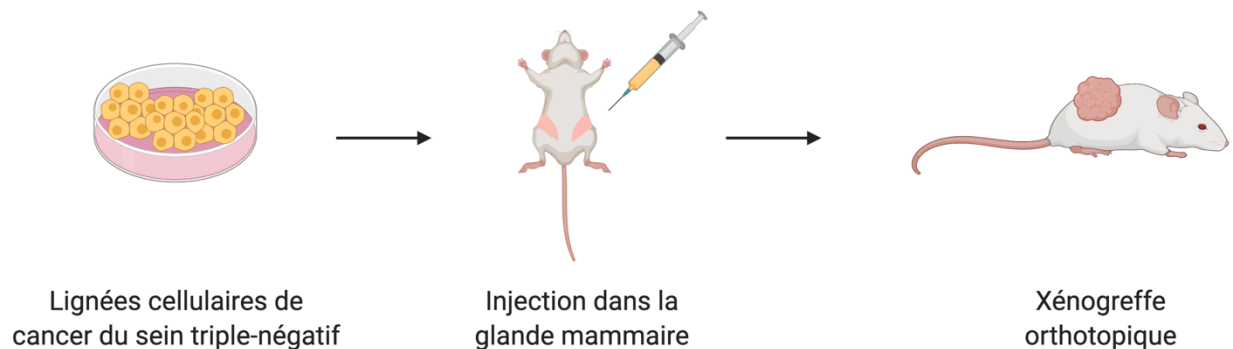
**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

2.3. Devis expérimental et groupes de traitements

Nous avons mené une étude expérimentale randomisée sur modèle murin. L'étude fut approuvée par le comité institutionnel de protection des animaux du CRCHUM (Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal) (numéro de protocole: C17017SHs). Nous avons utilisé des xénogreffes orthotopiques dérivées de deux lignées cellulaires de cancer du sein triple-négatif (**Figure 15**)(166). Des souris NOD *scid* gamma (ref. 005557, Jackson Laboratory) furent employées(166). Les souris NOD *scid* gamma sont sévèrement immunosupprimées et ont une déficience en lymphocytes B et T. Ces souris ont deux mutations: *scid* et une mutation complète de type *null* dans l'allèle de la chaîne gamma commune du récepteur d'IL2 (interleukine 2). La

mutation *scid* mène à un déficit en lymphocytes B et T. La mutation complète bloque les voies de signalisation de six cytokines différentes (IL2, IL4, IL7, IL9, IL15 et IL21) ce qui entraîne une absence de cellules NK fonctionnelles.

Figure 15. Xénogreffes orthotopiques



**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Légende : des lignées cellulaires de CSTN sont injectées dans du matrigel dans la glande mammaire de souris sévèrement immunosupprimées. On obtient une croissance orthotopique.

2.4. Projet pilote

Tout d'abord, nous avons réalisé un projet pilote afin de déterminer le potentiel de croissance tumorale et de métastases des lignées cellulaires, tel que décrit par Iorns et al.(166). Nous voulions aussi établir la technique chirurgicale adaptée à notre souche de souris, la période à laquelle les traitements débiteront dans l'étude expérimentale et la méthode optimale de décompte des métastases. Aucun traitement ne fut administré. Vingt souris NOD *scid* gamma ont été utilisées : 8 souris pour la lignée cellulaire MDAMB436 (BRCA1-muté) provenant de deux sources distinctes, 4 souris pour MDAMB231 (BRCA non-muté), 4 souris SUM149PT (BRCA-muté) et 4 souris HCC1806 (BRCA non-muté). Nous avons utilisé quatre lignées cellulaires afin de tester le plus de lignées possibles et d'augmenter la probabilité d'obtenir une croissance *in vivo* et des métastases.

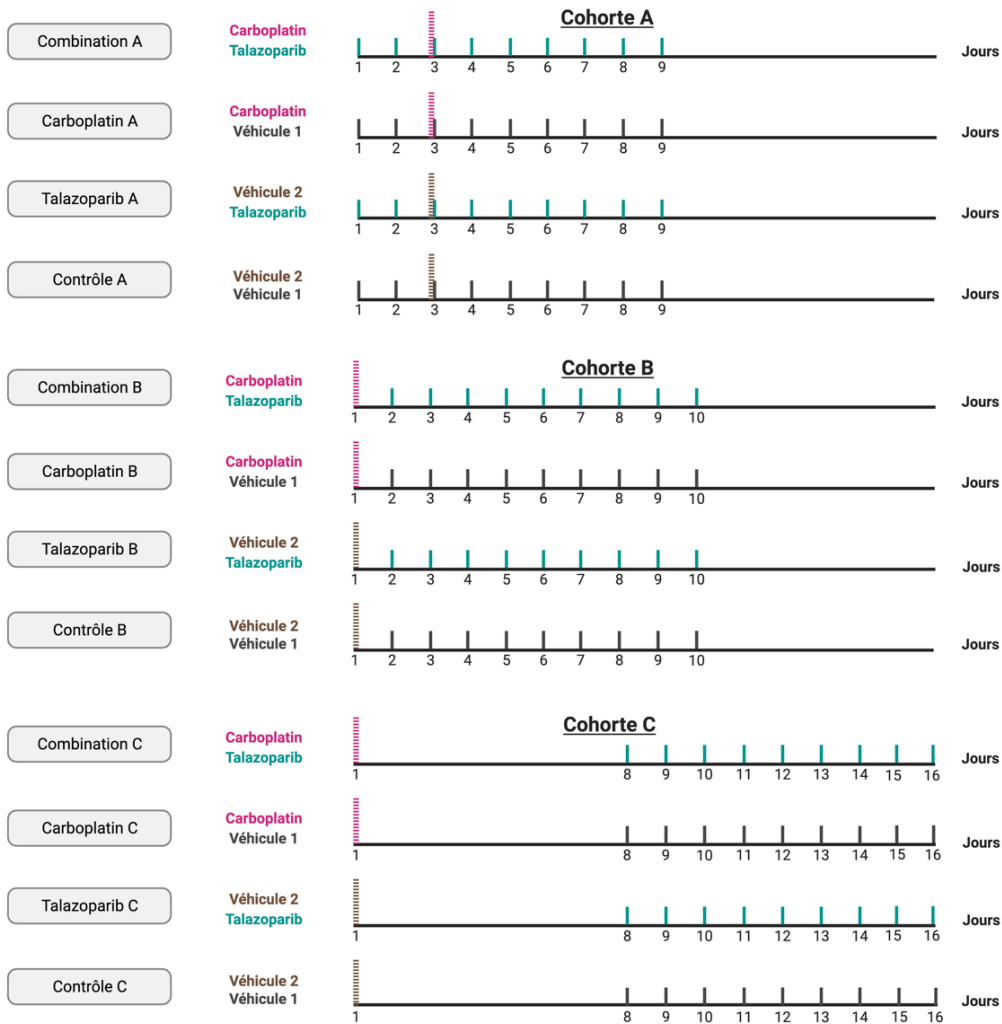
2.5. Protocole de traitement

Trois cohortes A, B et C avec des séquences de traitements différentes furent réalisées (**Figure 16**). Les souris ont été randomisées à leur groupe de traitement de sorte que le poids et le volume tumoral moyen en début de traitement étaient équivalents entre les groupes. Les séquences de traitement étaient:

- Cohorte A) talazoparib jours 1-2 puis carboplatin et talazoparib jour 3 suivi de talazoparib jours 4-9;
- Cohorte B) carboplatin jour 1 suivi de talazoparib jours 2-10;
- Cohorte C) carboplatin jour 1 suivi de talazoparib jours 8-16.

Nous avons choisi d'administrer le talazoparib pendant 9 jours car c'est une durée de traitement minimale administrée par Shen et al. qui a démontré une efficacité avec une seule dose de carboplatin en combinaison(136).

Figure 16. Séquences de traitement des trois cohortes A, B et C



**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Légende :

Véhicule 1 : polyéthylène glycol 400 5%

Véhicule 2 : chlorure de sodium 0.9%

Cette figure représente les différents groupes de traitement. Dans chaque cohorte A, B et C il y a un groupe de combinaison, un groupe de monothérapie pour le talazoparib, un groupe de monothérapie pour le carboplatin et un groupe contrôle.

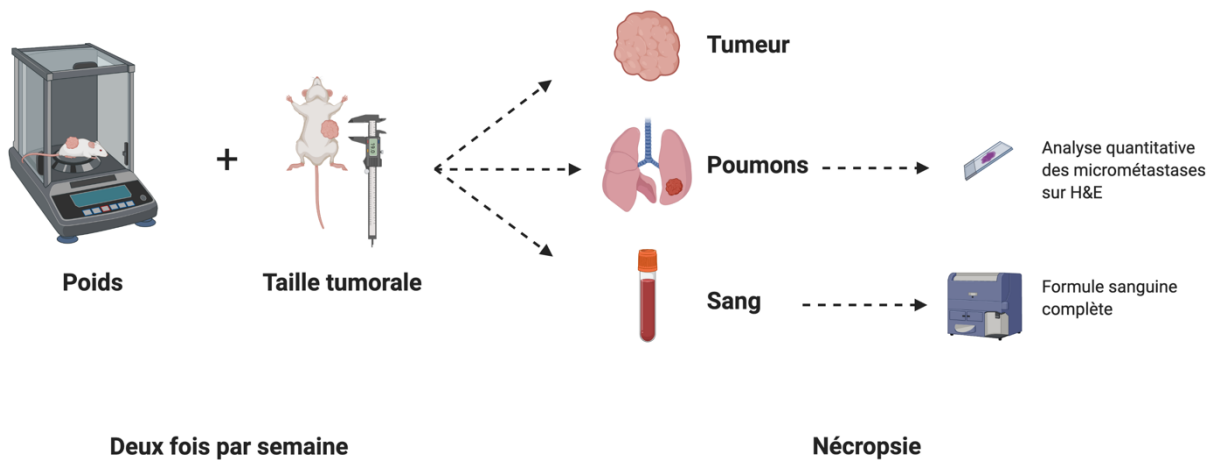
Dans chaque cohorte, il y avait des groupes comparatifs avec le talazoparib en monothérapie ainsi qu'un groupe contrôle ne recevant que les véhicules. Le carboplatin (Selleckchem, cat no. S1215) fut administré par injection intrapéritonéale à une dose de 35 mg/kg et le talazoparib (Pfizer) fut administré par gavage oral à une dose de 0.33 mg/kg(136). Le véhicule du talazoparib était du polyéthylène glycol 400 5% dans de l'eau déionisée stérile. Le véhicule du carboplatin était du normal salin (chlorure de sodium 0.9%).

Les traitements commençaient le même jour pour toutes les souris. Nous débutons les traitements lorsque le volume tumoral atteignait 0.15 cm³. Les souris recevaient les traitements tous les jours dans le même créneau horaire. Les souris qui recevaient du carboplatin reçurent du maropitant (1 mg/kg sc) et de l'ondansetron (0.8 mg/kg sc) au moins 1h avant le carboplatin, puis les deux jours suivants en dose de rappel. Lorsque le carboplatin et le talazoparib étaient donnés en combinaison, ils étaient donnés avec un intervalle de 30 min(136, 154).

2.6. Suivi et données

Les données furent récoltées comme suit (**Figure 17**). Nous avons mesuré la taille tumorale et le poids deux fois par semaine. La nécropsie fut réalisée quand une des souris avait perdu 20% ou plus de son poids initial, quand des signes de détresse étaient présents (déterminés par un vétérinaire) ou quand le volume tumoral dépassait 3 cm³.

Figure 17. Données principales de l'étude



**Cette figure fut réalisée avec le logiciel Biorender.*

Dans l'étude expérimentale avec MDAMB231, lors de la nécropsie, deux conditions expérimentales furent évaluées: 1) instillation des poumons à la formaline et prélèvement sanguin par section de la veine cave inférieure et de l'aorte; 2) aucune instillation des poumons et prélèvement sanguin par ponction cardiaque terminale. Le sang récolté fut envoyé aux laboratoires regroupés du CHUM (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal) pour effectuer une formule sanguine complète. Nous avons évalué le taux de leucocytes, d'hémoglobine, de plaquettes et de neutrophiles car le carboplatin et le talazoparib peuvent avoir un effet toxique sur les globules blanc, les hématies, les plaquettes et les neutrophiles en endommageant les précurseurs myéloïdes(132, 133). Cela est suivi en clinique car ces déficits peuvent entraîner des infections et des saignements.

Nous avons récolté les poumons et la tumeur primaire. Nous avons choisi de récolter les poumons car c'était l'organe avec le plus de métastases lors de nos expériences pilotes. La tumeur primaire fut mesurée *ex vivo* avec le même compas à coulisse que lorsque la tumeur était *in vivo*. Un fragment tumoral et les poumons furent fixés dans de la formaline (formaline 10% tamponnée neutre, cat no. HEMFS104, Dufort et Lavigne). Puis les échantillons furent enrobés de paraffine au laboratoire de pathologie du CHUM. Des coupes d'hématoxyline et éosine ont été réalisées par la plateforme de pathologie moléculaire du CRCHUM.

Pour les projets pilotes, une analyse microscopique de coupes d'hématoxyline et éosine des poumons fut réalisée sur des lames sériées espacées de 50 microns. Cela afin de s'assurer que le décompte pulmonaire était similaire sur plusieurs lames successives. Ainsi, pour l'étude expérimentale, le décompte de métastases pulmonaires fut réalisé par un pathologiste sur une seule coupe coronale située au centre du poumon. La proportion d'aire pulmonaire envahie par les métastases a été estimée par celui-ci.

2.7. Analyse des données

Le volume tumoral fut calculé selon la formule suivante: $\frac{x^2 \times y}{2}$, où x représente le diamètre minimal et y représente le diamètre maximal de la tumeur(177). Les variables analysées sont les

suivantes: le volume tumoral (cm^3), le poids de la souris (g), le décompte leucocytaire ($10^9/\text{L}$), la concentration en hémoglobine (g/L), le décompte plaquettaire ($10^9/\text{L}$), la proportion d'aire pulmonaire envahie par les métastases (%).

L'index d'inhibition tumoral à la nécropsie fut calculé selon la formule suivante(178):

$$\left(1 - \frac{Vt.T}{Vt.C}\right) \times 100.$$

$Vt.T$ indique le volume tumoral moyen des souris du groupe traité lors de la nécropsie et $Vt.C$ est le volume tumoral moyen des souris du groupe contrôle. Les volumes tumoraux sont ceux de la tumeur extraite.

La différence de poids fut calculée selon la formule suivante: $\frac{\text{Poids } F - \text{Poids } T0}{\text{Poids } T0} \times 100$. Poids F signifie poids final (i.e., dernier poids mesuré) et Poids T0 représente le poids mesuré juste avant le jour 1 du traitement.

Pour l'inférence statistique, nous avons d'abord analysé la distribution de la fréquence pour le volume tumoral, le poids de la souris, le décompte leucocytaire, la concentration en hémoglobine, le décompte plaquettaire et la proportion d'aire pulmonaire envahie par les métastases. Pour les variables dont la mesure fut répétée durant l'expérience (i.e., poids de la souris et volume tumoral), les tests statistiques ont été réalisés de manière indépendante pour chaque point dans le temps. Nous avons utilisé le test ANOVA à un facteur pour comparer les poids moyens entre les groupes pour un point dans le temps précis. De manière simultanée, nous avons réalisé un test post hoc de Dunnett pour comparer tous les groupes entre eux. Une vérification des résidus du modèle a été effectuée. La normalité de leur distribution a été évaluée avec un graphique ainsi que l'homoscédasticité.

Nous avons entrepris des tests de Kruskal-Wallis pour comparer le volume tumoral, le décompte leucocytaire, la concentration en hémoglobine, le décompte plaquettaire et la proportion d'aire pulmonaire envahie par les métastases. Des tests post hoc de Dunn furent utilisés pour comparer chaque catégorie avec les autres.

Les souris qui n'ont pas développé de croissance tumorale furent exclues de l'analyse ainsi que celles qui ont eu une croissance tumorale tardive (i.e., après que la majorité des souris ait une croissance tumorale). Un seuil alpha de 0.05 fut utilisé pour l'ensemble des analyses. Celles-ci ont été réalisées dans GraphPad Prism (version 8.00 pour Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla California USA).

Chapitre 3 – RÉSULTATS

1. Implications cliniques de la signature génétique de 63 gènes

1.1. Expression génique et facteurs pronostiques

Nous avons analysé une cohorte de 81 tumeurs triple-négatives issue de TCGA(162) afin d'évaluer la proportion de patientes prédites sensibles par la signature génétique parmi différents groupes pronostiques (**Tableau 16**). Un total de 36 patientes présentait la signature génétique (i.e., prédites sensibles) et 45 patientes ne présentaient pas la signature génétique (i.e., prédites résistantes). Nous avons analysé les variables suivantes : l'âge en années, la taille tumorale en centimètres, le statut ganglionnaire et le stade tumoral. Parmi les patientes ayant un enrichissement de la signature génétique, la majorité avait moins de 50 ans (72.2%), avait une tumeur inférieure ou égale à 2 cm (69.4%), n'avait pas de métastases ganglionnaires régionales (66.7%) et était de stade 1 ou 2 (75.0%). Aucune corrélation statistiquement significative ne fut décelée entre la présence ou l'absence d'enrichissement de la signature génétique et l'âge, la taille tumorale, le statut ganglionnaire et le stade tumoral.

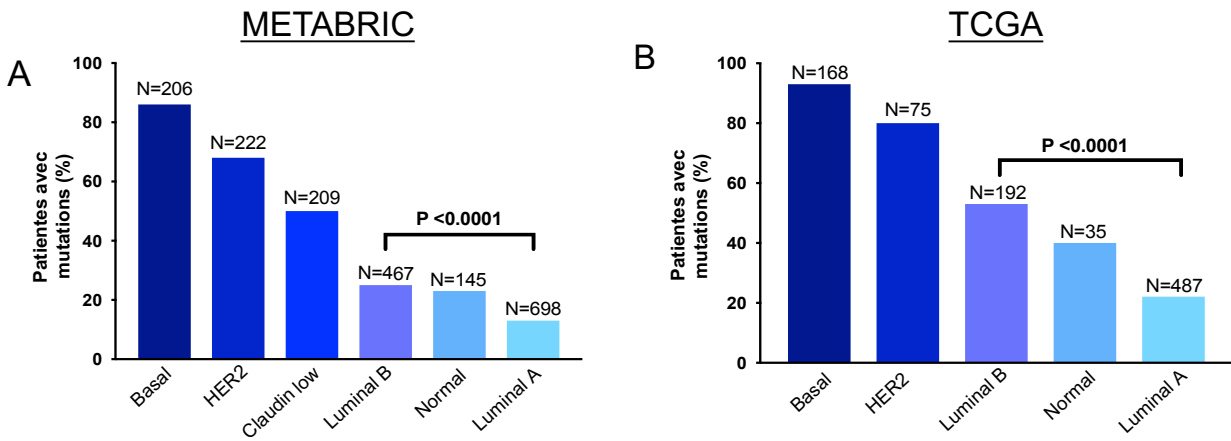
Tableau 14. Association entre la signature d'expression génique et les facteurs pronostiques

Variable	Signature d'expression génique		Valeur P
	Absente N (%)	Présente N (%)	
Âge (années)			0.59
< 50	30 (66.7)	26 (72.2)	
≥ 50	15 (33.3)	10 (27.8)	
Taille tumorale (cm)			0.18
≤ 2	37 (82.2)	25 (69.4)	
> 2	8 (17.8)	11 (30.6)	
Métastases ganglionnaires			
Absentes	25 (55.6)	24 (66.7)	0.31
Présentes	20 (44.4)	12 (33.3)	
Stade			0.42
I	5 (11.1)	7 (19.4)	
II	31 (68.9)	20 (55.6)	
III	9 (20.0)	9 (25.0)	

1.2. Mutations et facteurs pronostiques

D'abord, nous avons analysé la proportion de patientes ayant une mutation dans un ou plusieurs des 63 gènes au sein des cohortes METABRIC(164) et TCGA. Les tumeurs basales avaient la plus haute proportion de patientes mutées, suivi des cancers HER2-positifs. Soit environ 85% et 92% pour les tumeurs basales dans chaque cohorte et 65% et 79% pour les tumeurs HER2-positives (**Figure 18**). De manière intéressante, les tumeurs luminales B comptaient davantage de patientes mutées que les tumeurs luminales A dans les deux cohortes (environ 27% vs 12%, $P < 0.0001$ et 53% vs 21% $P < 0.0001$).

Figure 18. Proportion de patientes avec des mutations parmi les différents sous-groupes intrinsèques



Légende:

Abréviations: METABRIC, Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium; TCGA, The Cancer Genome Atlas

Les nombres au-dessus des barres indiquent le nombre de patientes dans chaque sous-groupe intrinsèque évalué. La valeur P indique le résultat d'un test de Chi-carré. Seuls les résultats de la comparaison entre luminal A et luminal B ont été consignés sur cette figure car ces deux sous-groupes sont directement comparables. Les tumeurs basales (20% des cancers du sein), HER2-enrichies (10% des cancers du sein) et lumorales B (20% des cancers du sein) sont connues pour des pronostics plus sombres. Les tumeurs basales sont prévalentes parmi les CSTN. Les tumeurs lumorales B n'ont pas d'enrichissement des gènes des récepteurs hormonaux et sont agressives. Les tumeurs lumorales A (40% des cancers du sein) ont un enrichissement des gènes des récepteurs hormonaux, elles ont un bon pronostic et ne sont pas agressives. Elles sont plus prévalentes parmi les tumeurs hormono-sensibles.

Ensuite, pour la signification pronostique des mutations dans un ou plusieurs des 63 gènes, nous nous sommes concentrés sur la cohorte METABRIC(164) car les données de survie étaient disponibles. Nous avons trouvé des résultats statistiquement significatifs pour la survie globale et la survie spécifique au cancer du sein parmi les tumeurs lumorales B (**Tableau 17**). Les patientes avec une mutation dans au moins un gène de la signature génétique avaient une survie inférieure aux patientes sans aucune mutation (HR = 2.43, 95% CI [1.36-4.35], P = 0.003) (**Figure 19**). Pour les tumeurs lumorales A, malgré des résultats statistiquement significatifs et un nombre de

patientes plus élevé (i.e., N=698 et N=487 dans chaque cohorte), la différence entre les deux groupes de patientes n'est présente qu'à la fin de la période de suivi (HR = 2.27, 95% CI [1.12-4.59], P = 0.02) (Figure 19).

Tableau 15. Analyse de survie chez les patientes ayant une mutation dans au moins un des 63 gènes par rapport aux patientes sans mutation

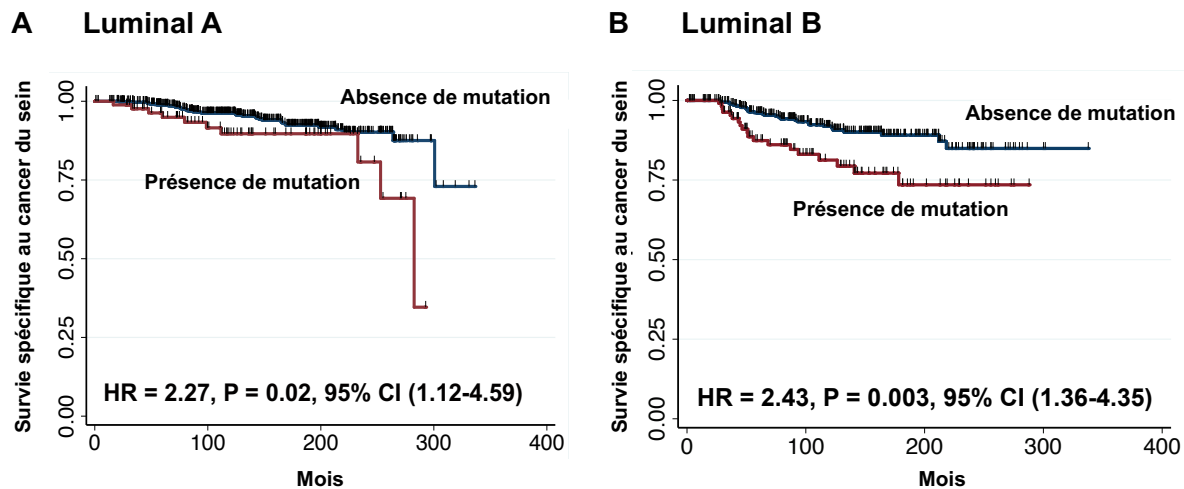
Sous-type	Survie globale		Survie spécifique au cancer du sein	
	Hazard Ratio	Valeur P	Hazard Ratio	Valeur P
Basal	0.92	0.75	0.72	0.37
HER2	1.06	0.74	1.36	0.29
Claudin-low	1.00	0.98	2.79	0.008*
Luminal B	1.37	0.01*	2.43	0.003*
Luminal A	1.20	0.24	2.27	0.02*

Légende:

*: Valeur P < 0.05

Ce tableau présente les résultats de régressions de Cox comparant les survies globales et spécifiques au cancer du sein chez les patientes avec et sans mutations dans les 63 gènes. Ces analyses de survie furent réalisées dans les sous-groupes intrinsèques. Les tumeurs basales (20% des cancers du sein), HER2-enrichies (10% des cancers du sein) et luminales B (20% des cancers du sein) sont connues pour des pronostics plus sombres. Les tumeurs basales sont prévalentes parmi les CSTN. Les tumeurs luminales B n'ont pas d'enrichissement des gènes des récepteurs hormonaux et sont agressives. Les tumeurs luminales A (40% des cancers du sein) ont un enrichissement des gènes des récepteurs hormonaux, elles ont un bon pronostic et ne sont pas agressives. Elles sont plus prévalentes parmi les tumeurs hormono-sensibles.

Figure 19. Survie spécifique au cancer du sein chez les patientes avec et sans mutation dans au moins un des 63 gènes



Légende:

Abréviation : HR, Hazard Ratio

Absence de mutation : patientes sans mutation somatique dans les gènes de la signature

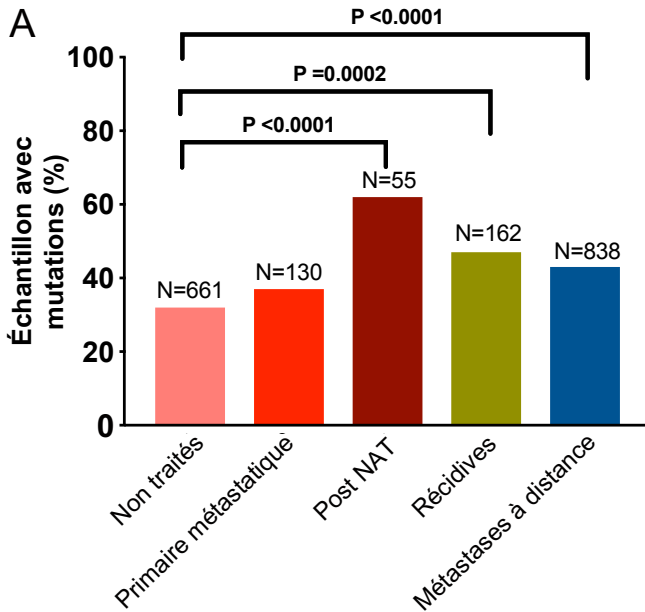
Présence de mutation : patientes avec une mutation somatique dans au moins un des gènes de la signature

Les valeurs P sont le résultat de régression de Cox. Ces courbes de Kaplan-Meier représentent la survie spécifique au cancer du sein chez les tumeurs (A) lumineales A et (B) lumineales B en fonction de la durée du suivi en mois, selon la présence de mutation parmi les gènes de la signature génétique. Les tumeurs lumineales B (20% des cancers du sein), sont connues pour un pronostic plus sombre que les tumeurs lumineales A. Les tumeurs lumineales A (40% des cancers du sein) ont un enrichissement des gènes des récepteurs hormonaux, elles ont un bon pronostic et ne sont pas agressives. Elles sont plus prévalentes parmi les tumeurs hormono-sensibles. Les tumeurs lumineales B n'ont pas d'enrichissement des gènes des récepteurs hormonaux et sont agressives.

Par la suite, nous avons évalué la proportion d'échantillons mutés dans différents contextes cliniques (**Figures 20**) et la proportion d'échantillons métastatiques mutés pour différents sites de métastases (**Figure 21**). Ici l'unité d'analyse n'est plus une patiente mais un échantillon de tumeur primaire ou de métastase. Comparativement aux échantillons de tumeurs primaires non traitées, la proportion d'échantillons mutés était plus élevée chez les tumeurs primaires traitées dans le contexte néoadjuvant (30% vs 61%, $P < 0.0001$), les récives locorégionales (30% vs 46%,

P=0.0002) et les échantillons de métastases à distance (30% vs 42%, P<0.0001) (**Figure 20**). Au niveau des différents organes de métastases à distance, les métastases cérébrales arboraient la plus grande proportion d'échantillons mutés (**Figure 21**).

Figure 20. Proportion d'échantillons tumoraux mutés dans différents contextes cliniques



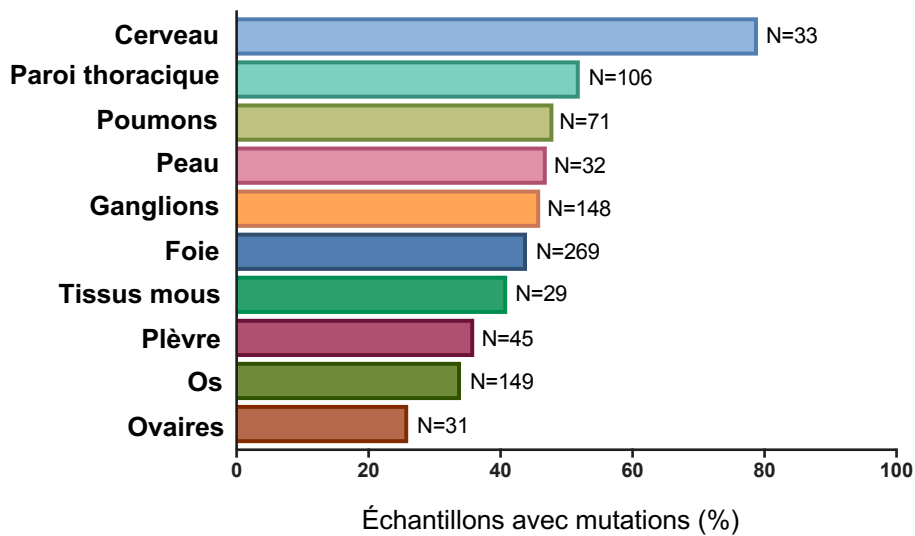
Légende:

* Thérapie systémique néoadjuvante

Les valeurs P indiquent le résultat de tests de Chi-carré. Seuls les résultats significatifs sont consignés sur cette figure.

Les nombres au-dessus des barres indiquent le nombre d'échantillons mutés dans chaque catégorie évaluée: échantillon de tumeur primaire non traitée, échantillon de tumeur primaire chez une patiente ayant un cancer métastatique de novo, échantillon de tumeur primaire post thérapie systémique néoadjuvante, échantillon de tumeur récidivant au niveau locorégional, échantillon de métastase à distance de cancer du sein. Les échantillons de tumeur primaire post thérapie systémique néoadjuvante sont ceux de patientes qui ont un mauvais pronostic car elles n'ont pas eu de réponse pathologique complète. Les récurrences locorégionales et les métastases à distance sont aussi associées à un mauvais pronostic.

Figure 21. Proportion d'échantillons métastatiques avec des mutations pour différents sites de métastases

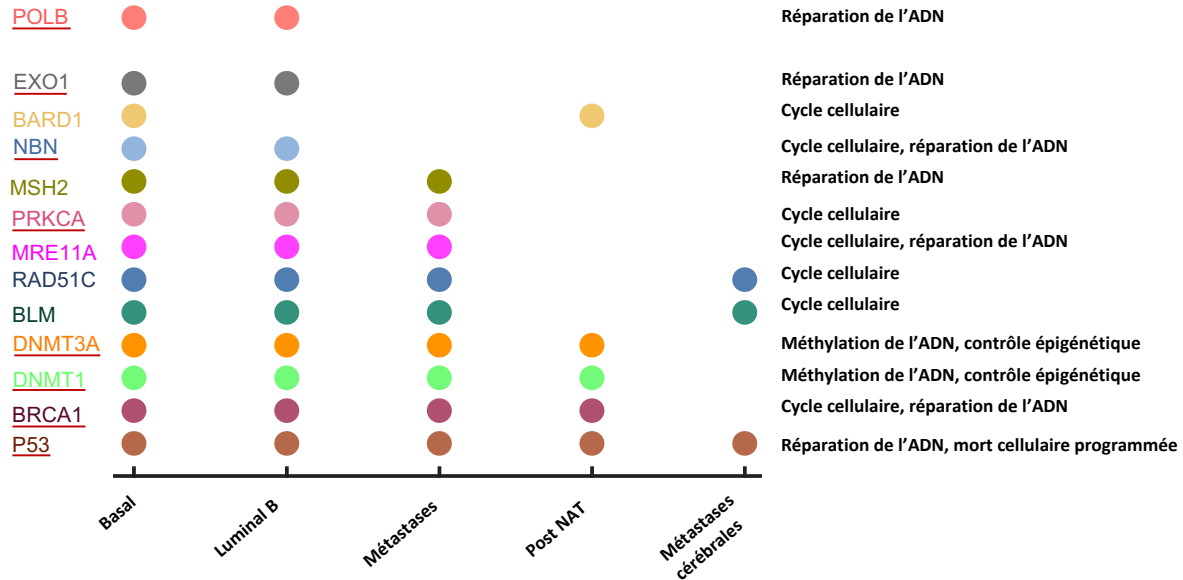


Légende:

Les nombres à droite des barres indiquent le nombre d'échantillons mutés dans chaque organe métastatique. Les mutations sont dans des échantillons de métastases et non de tumeur primaire.

Enfin, nous avons identifiés les gènes les plus fréquemment mutés, parmi les cohortes avec des fréquences mutationnelles élevées (**Figure 22**). Ces gènes sont surtout impliqués dans la réparation des mésappariements, la réparation de l'ADN double-brin et le contrôle du cycle cellulaire(146).

Figure 22. Gènes fréquemment mutés parmi les cohortes avec des fréquences mutationnelles élevées.



Légende:

Chaque pastille de couleur représente une ou plusieurs mutations des gènes de la colonne de gauche au sein des différentes catégories cliniques: sous-groupe basal, luminal B, échantillon de métastase, tumeur primaire post thérapie systémique néoadjuvante et échantillon de métastase cérébrale. La colonne de droite indique les voies d'enrichissement des gènes. Les gènes soulignés en rouge furent précédemment identifiés comme cibles thérapeutiques potentielles(146).

2. Séquence optimale d'administration du talazoparib et du carboplatin

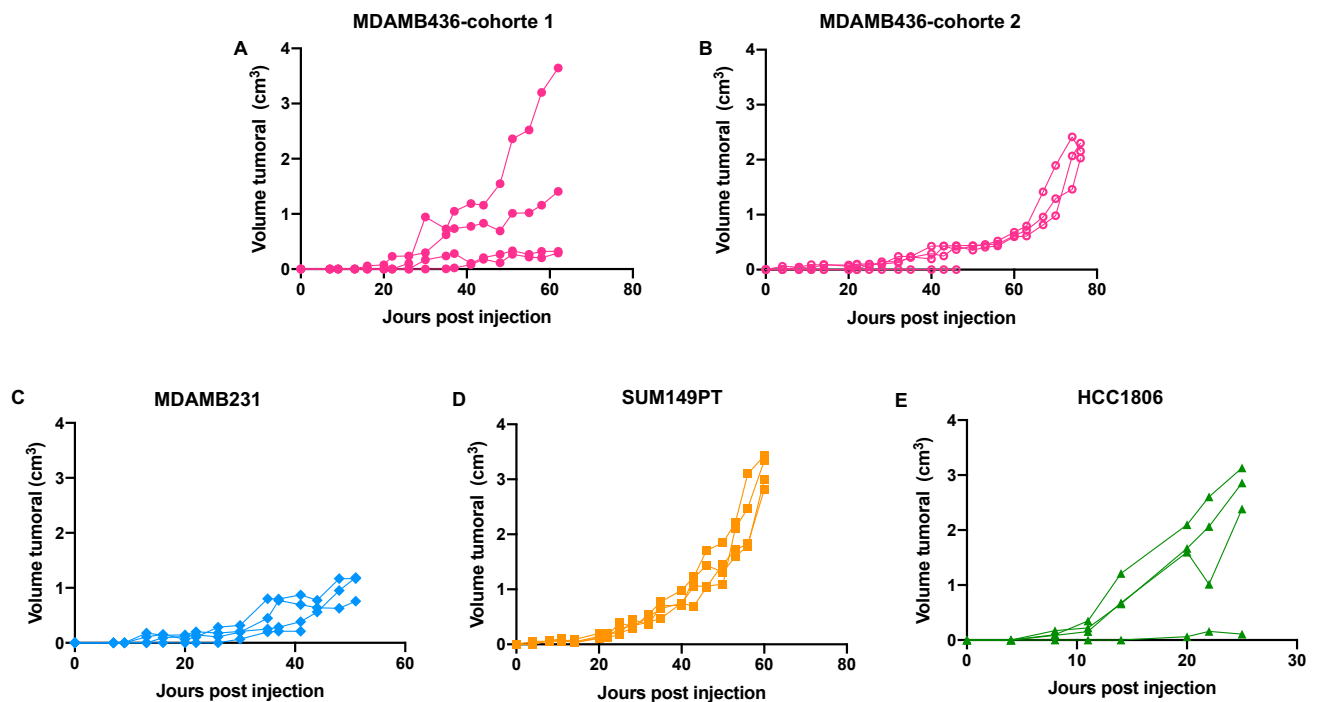
in vivo

2.1. Projet pilote

Nous avons examiné le taux de croissance tumorale primaire et le potentiel métastatique de quatre lignées cellulaires: MDAMB436 (BRCA-muté), MDAMB231 (BRCA non-muté), SUM149PT (BRCA non-muté) et HCC1806 (BRCA non-muté). Afin de mieux évaluer le taux de croissance tumorale primaire et le potentiel métastatique de MDAMB436 nous avons établi deux cohortes avec cette lignée cellulaire, provenant de deux sources distinctes.

Toutes les souris ont développé une croissance tumorale primaire sauf une souris MDAMB436 de la cohorte 2 (**Figure 23**). Deux souris MDAMB436 de la cohorte 1 ont débuté leur croissance tumorale tardivement et ont eu des volumes tumoraux inférieurs durant toute l'étude. Le volume tumoral maximal obtenu était de 1.42 cm³ (au jour 60) pour MDAMB436-cohorte 1, 2.16 cm³ (au jour 76) pour MDAMB436-cohorte 2, 1.2 cm³ (au jour 51) pour MDAMB231, 3.15 cm³ (au jour 60) pour SUM149PT et 2.12 cm³ (au jour 60) pour HCC1806 (au jour 25) (**Figure 24**).

Figure 23. Croissance tumorale par souris pour le projet pilote



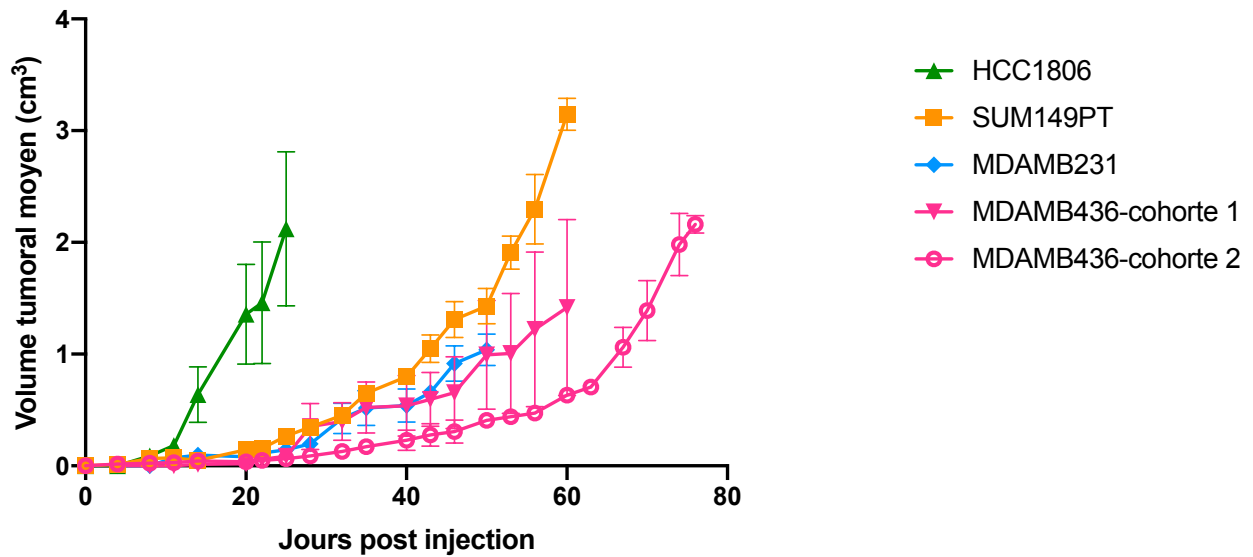
Légende:

N=4 souris pour chaque graphique.

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne.

Ces courbes indiquent le volume tumoral en fonction du temps pour chaque souris. Pour chaque cohorte, quatre souris reçurent une injection orthotopique de cellules tumorales et ont été suivies. Les durées de suivi sont différentes pour chaque lignée selon l'état de santé de la cohorte de souris. Afin de mieux évaluer le taux de croissance tumorale primaire et le potentiel métastatique de MDAMB436 nous avons établi deux cohortes avec cette lignée cellulaire, provenant de deux sources distinctes.

Figure 24. Volumes tumoraux moyens pour le projet pilote



Légende:

N=4 souris pour chaque lignée cohorte.

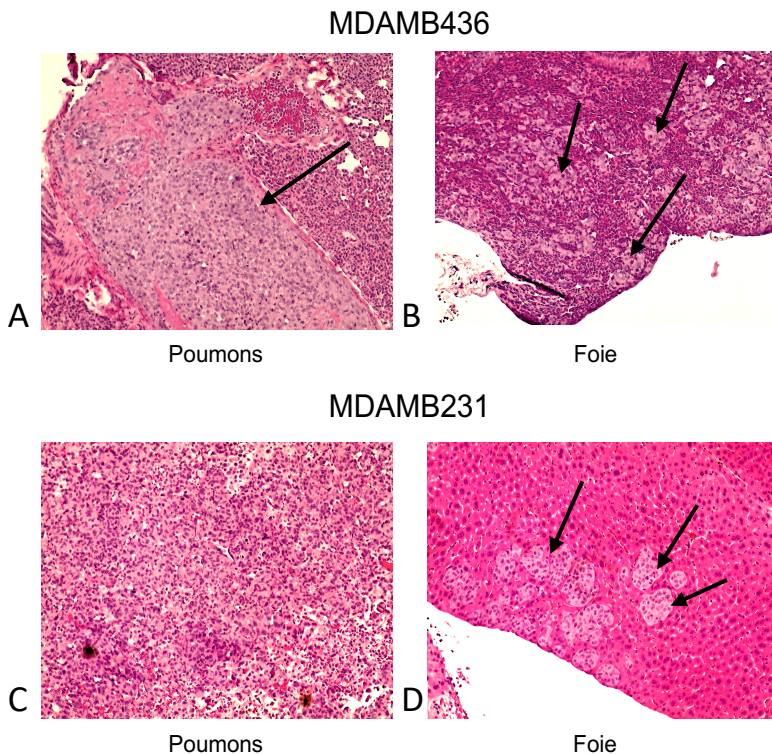
Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Afin de mieux évaluer le taux de croissance tumorale primaire et le potentiel métastatique de MDAMB436 nous avons établi deux cohortes avec cette lignée cellulaire, provenant de deux sources distinctes.

En termes d'envahissement métastatique, nous nous sommes concentrés sur les métastases aux poumons car ce fut les plus fréquentes (**Tableau 18**). En termes d'envahissement de l'aire pulmonaire, les souris MDAMB231 et MDAMB436 de la cohorte 1 avaient les plus hauts fardeaux métastatiques: parmi les souris qui avaient des métastases, la majorité avait 50 à 100% d'aire pulmonaire envahie (**Figures 25** et **26**). Les souris SUM149PT et HCC1806 avaient un très faible fardeau métastatique (i.e., <5% d'aire envahie chacune).

Tableau 16. Proportion de souris atteintes de micrométastases pulmonaires pour le projet pilote.

Lignée	Souris atteintes
MDAMB436-cohorte 1	2/4
MDAMB436-cohorte 2	0/4
MDAMB231	4/4
HCC1806	2/4
SUM149PT	1/4

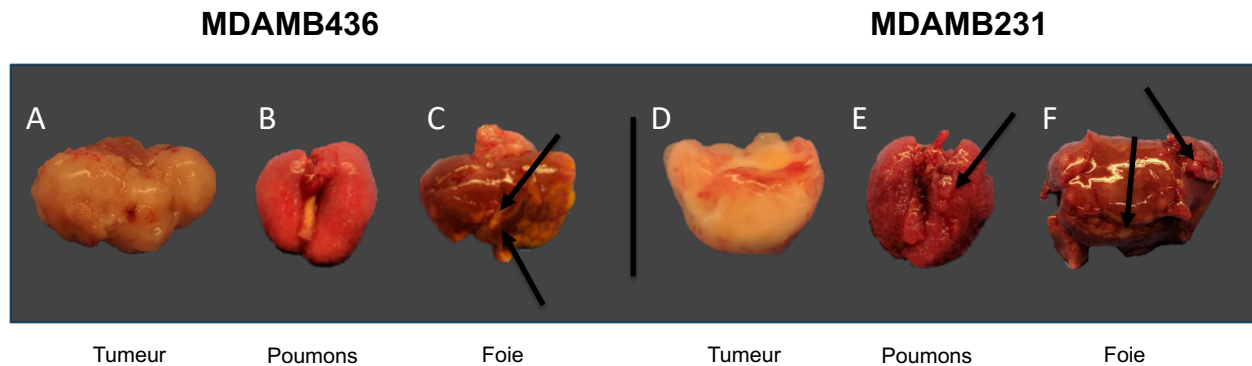
Figure 25. Envahissement métastatique des souris du projet pilote



Légende:

Deux images représentatives furent prises pour chaque lignée au microscope (objectif 10x) à partir de coupes d'hématoxyline et éosine de poumons et de foie. Les flèches indiquent des nodules tumoraux. L'image (A) représente un large îlot tumoral dans le poumon, les alvéoles sont collabées car il n'y a pas eu instillation de formol. L'image (B) démontre plusieurs petits implants tumoraux irréguliers en périphérie du foie. Sur l'image (C) le poumon est totalement envahi par des cellules tumorales et des lymphocytes. L'image (D) démontre plusieurs petits nodules tumoraux bien circonscrits.

Figure 26. Photographies des tumeurs, poumons et foies du projet pilote



Légende:

Six photographies représentatives de tumeurs, poumons et foies des lignées MDAMB436 et MDAMB231. Sur les images (B) et (E) les poumons sont totalement envahis par des métastases tumorales et ont un aspect congestif et irrégulier. Les flèches indiquent des macrométastases.

Nous avons évalué l'analyse de prélèvements sanguins (ponctions cardiaques terminales) afin de déterminer la faisabilité d'une formule sanguine complète. Ces résultats sont présentés dans le **tableau 19**. Trois souris de la lignée cellulaire MDAMB436, deux souris de la lignée MDAMB231, une souris de la lignée SUM149PT et les souris HCC1806 n'ont pas pu avoir d'analyse car le prélèvement a coagulé. Nous avons noté une variabilité dans les taux de leucocytes, de neutrophiles et de plaquettes. Les taux de leucocytes et de neutrophiles étaient plus élevés pour MDAMB436 et SUM149PT, mais les taux de plaquettes étaient plus bas pour MDAMB231.

Tableau 17. Formule sanguine complète des souris du pilote 2.

Souris	Leucocytes ($10^9/L$) (MN: 0.58)	Hémoglobine (g/L) (MN: 136)	Plaquettes ($10^9/L$) (MN: 1083)	Neutrophiles ($10^9/L$) (MN: 0.38)
MDAMB436-cohorte 1				
1	137.8	117	896	128.2
MDAMB436-cohorte 2				
1	77.7	108	1166	73
2	163.4	100	1124	153.6
3	61.8	106	988	57.5
MDAMB231				
2	6.5	163	722	5.7
3	8.8	146	618	8.7
SUM149PT				
5	17.3	111	707	16.1
6	34.9	107	1133	33.9
7	10.6	108	691	9.4

Légende:

MN: moyenne normale du laboratoire Jackson d'où proviennent les souris (i.e., souris saines). Les écarts attendus à la moyenne ne sont pas connus.

2.2. Étude expérimentale

Basé sur les résultats de l'étude pilote, nous avons décidé de réaliser l'étude expérimentale avec les lignées MDAMB231 et HCC1806 car ce sont les lignées qui ont démontré le meilleur potentiel de croissance tumorale.

2.2.1. MDAMB231

Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité de trois séquences différentes d'administration du talazoparib et du carboplatin en combinaison (i.e., cohortes A, B et C), telles que décrites dans la section méthode. Puis dans un deuxième temps, nous avons examiné l'efficacité de la séquence thérapeutique la plus performante comparativement aux monothérapies (i.e., talazoparib seul et carboplatin seul).

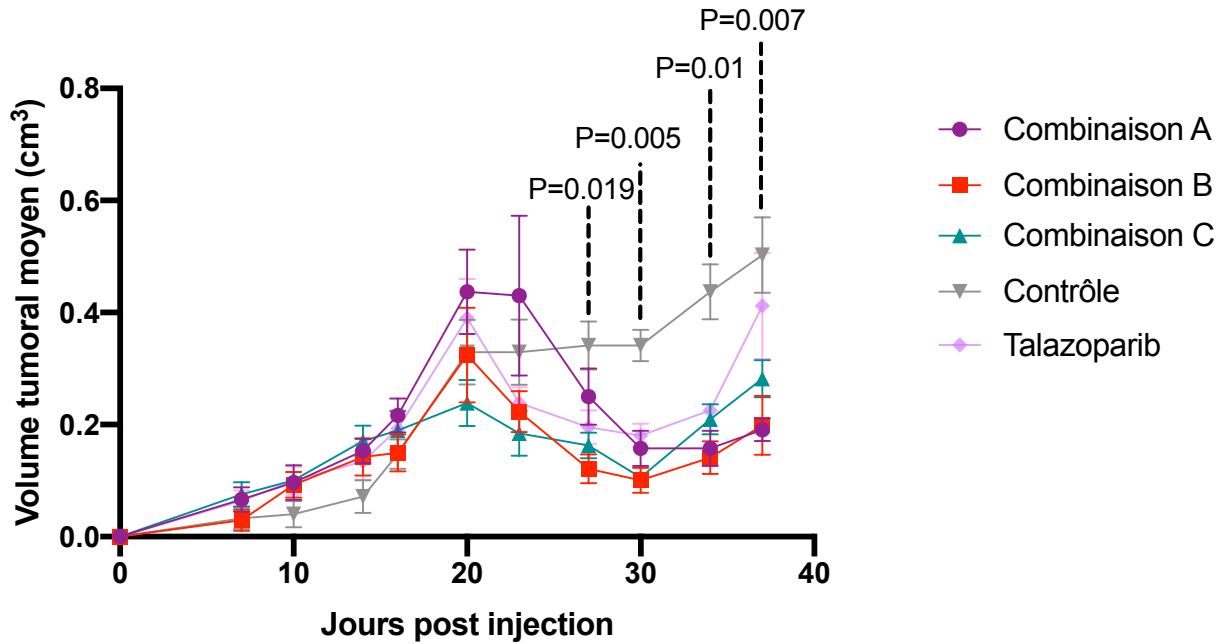
2.2.1.1. Croissance tumorale primaire

Efficacité thérapeutique différentielle des trois cohortes

Nous avons injecté les cellules MDAMB231 chez 30 souris. Parmi ces 30 souris, 28 ont eu une croissance tumorale primaire. Un total de six souris furent incluses dans chacun des groupes de combinaison de traitement A, B et C. Six souris furent traitées avec du talazoparib en monothérapie et quatre souris furent incluses dans le groupe contrôle. Les combinaisons de traitement A et B ont généré une inhibition tumorale supérieure à la combinaison de traitement C (**Figure 27**). L'index d'inhibition tumoral à la nécropsie fut calculé selon la formule suivante(178):

$(1 - \frac{Vt.T}{Vt.C}) \times 100$. $Vt.T$ indique le volume tumoral moyen des souris du groupe traité lors de la nécropsie et $Vt.C$ est le volume tumoral moyen des souris du groupe contrôle. Les volumes tumoraux sont ceux de la tumeur extraite lors de la nécropsie. L'index d'inhibition de la croissance tumorale était de 74.0% pour la combinaison A, 69.5% pour la combinaison B, 60.6% pour la combinaison C et 33.6% pour le talazoparib. La comparaison des volumes tumoraux médians (i.e., test de Kruskal-Wallis) entre l'ensemble des groupes expérimentaux (i.e., combinaison A, combinaison B, combinaison C, talazoparib et contrôle) a démontré des différences de volume tumoral statistiquement significatives (**Figure 28**). Cependant, nous n'avons noté aucune différence statistiquement significative de volume tumoral entre les combinaisons A, B et C dans les tests post hoc.

Figure 27. Réponse tumorale primaire pour les trois cohortes MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=6): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Combinaison B (n=6) : Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 2-10

Combinaison C (n=6): Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 8-16

Talazoparib (n=6) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours. La période d'administration est dans la section méthode.

Contrôle (n=4) : véhicule du talazoparib jours 1-9 et véhicule du carboplatin selon les périodes d'administration dans la section méthode.

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Seuls les résultats statistiquement significatifs sont consignés sur cette figure. Les valeurs P sont les résultats de tests de Kruskal-Wallis comparant les volumes tumoraux entre l'ensemble des groupes : combinaison A, combinaison B, combinaison C, talazoparib et contrôle.

Des comparaisons multiples post hoc (i.e., test de Dunn) entre chacun des groupes de traitement furent réalisées pour les jours 20, 23, 27, 30, 34 et 37 post injection. Les résultats des comparaisons entre les combinaisons et le groupe contrôle sont décrits au **tableau 20**. Le test de

Dunn compare les volumes tumoraux médians entre deux groupes. Les différences de volumes tumoraux médians commencent à être statistiquement significatives au jour 27 post injection au niveau de la combinaison B qui démontre la différence la plus large par rapport au groupe contrôle (différence absolue = 16.9, P = 0.014). La combinaison B maintient une inhibition de la croissance tumorale statistiquement significative par rapport au groupe contrôle durant tout le reste de l'expérience. La combinaison A démontre une inhibition de la croissance tumorale statistiquement significative par rapport au groupe contrôle à compter du jour 34 post injection (différence absolue = 15.7 cm³, P = 0.022). La combinaison C démontre une inhibition de la croissance tumorale statistiquement significative par rapport au groupe contrôle uniquement au jour 30 post injection (différence absolue = 16.5 cm³, P = 0.013). On note une régression de son efficacité par la suite.

Tableau 18. Différences de volumes tumoraux médians entre chaque combinaison de traitement et le groupe contrôle pour MDAMB231.

Jour post injection	Combinaison	Différence de volumes tumoraux médians (cm ³)*	Valeur P
20	A	4.3	> 0.9999
	B	0.8	> 0.9999
	C	6.3	> 0.9999
23	A	2.0	> 0.9999
	B	6.5	> 0.9999
	C	9.5	0.748
27	A	6.3	> 0.9999
	B	16.9	0.014
	C	12.3	0.211
30	A	11.7	0.228
	B	17.0	0.009
	C	16.5	0.013
34	A	15.7	0.022
	B	17.2	0.008
	C	10.5	0.404
37	A	15.4	0.026
	B	14.8	0.04
	C	7.8	> 0.9999

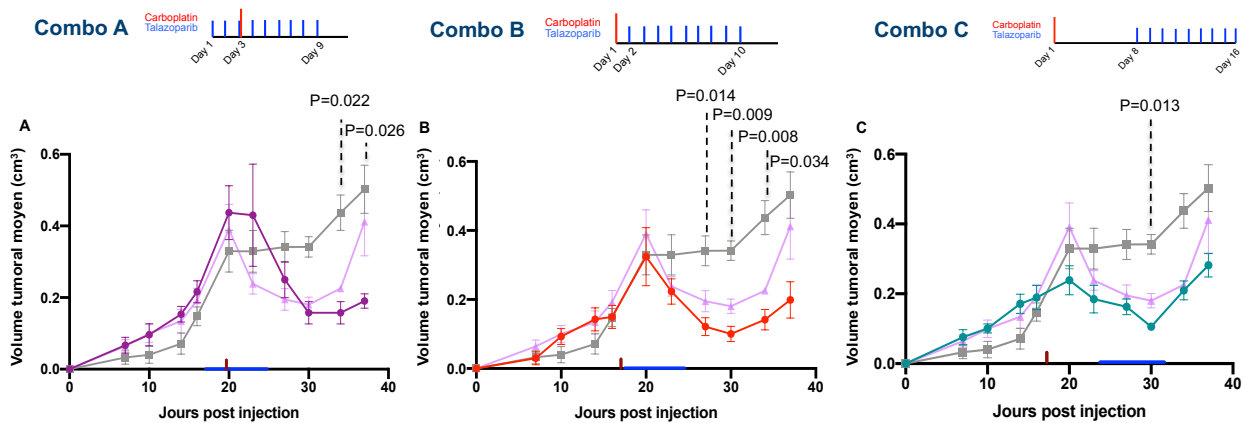
Légende:

* Valeurs absolues.

Différence de volume tumoral médian = $|V_{\text{combinaison}}| - |V_{\text{contrôle}}|$ où $V_{\text{combinaison}}$ est le volume tumoral médian de la combinaison A, B ou C et $V_{\text{contrôle}}$ est le volume tumoral médian du groupe contrôle.

La **figure 28** illustre la réponse tumorale primaire en fonction des jours post injection pour chaque cohorte distinctement. La combinaison C est le groupe qui avait la meilleure inhibition tumorale en début de traitement, mais le volume tumoral moyen a augmenté par la suite. En fin d'expérience (i.e., jours 34 et 37 post injection), les combinaisons A et B ont généré les inhibitions tumorales les plus efficaces. Cependant il n'y avait pas de différence significative entre les combinaisons A, B et C directement. Il n'y en avait pas non plus entre chacune des combinaisons et le talazoparib. Les différences significatives étaient uniquement entre chaque combinaison et le groupe contrôle, celles-ci sont indiquées sur la **figure 28**.

Figure 28. Réponse tumorale primaire pour chacune des cohortes MDAMB231.



Légende:

- Combinaison A
- Combinaison B
- ▲ Combinaison C
- ▼ Contrôle
- ◆ Talazoparib
- | Carboplatin administré
- Talazoparib administré

Combinaison A (n=6): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Combinaison B (n=6) : Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 2-10

Combinaison C (n=6): Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 8-16

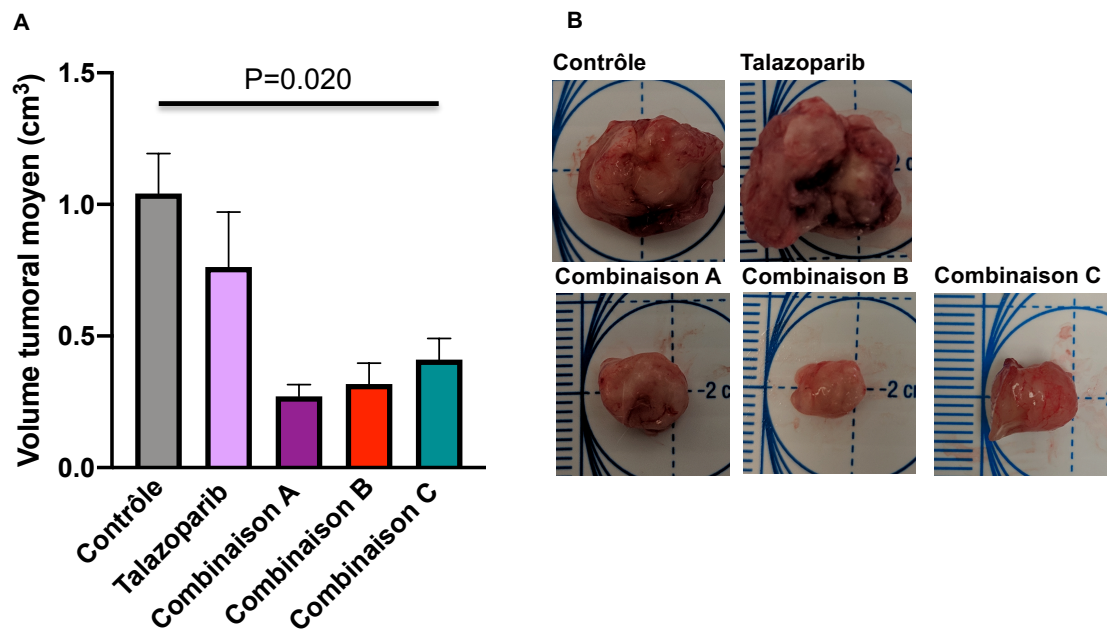
Talazoparib (n=6) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours. La période d'administration est dans la section méthode.

Contrôle (n=4) : véhicule du talazoparib jours 1-9 et véhicule du carboplatin selon les périodes d'administration dans la section méthode.

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Seuls les résultats statistiquement significatifs sont consignés sur cette figure. Les valeurs P sont les résultats de tests de Kruskal-Wallis comparant les volumes tumoraux entre l'ensemble des groupes : combinaison A, combinaison B, combinaison C, talazoparib et contrôle. Seules les valeurs $p < 0.05$ sont indiquées sur les graphiques.

La nécropsie fut réalisée quelques jours après le dernier traitement (i.e, jours 41 et 42 post injection). Lors de la nécropsie, nous avons réalisé une instillation des poumons à la formaline et un prélèvement sanguin par section de la veine cave inférieure et de l'aorte. L'inférence simultanée sur les volumes tumoraux de l'ensemble des groupes a indiqué une différence statistiquement significative ($H [4] = 11.7, P = 0.020$). La combinaison A a démontré le plus faible volume tumoral moyen (i.e., 0.27 cm^3), suivie de la combinaison B (i.e., 0.32 cm^3). Cependant, aucune différence statistiquement significative ne fut démontrée entre chacun des groupes comparés par paires (**Figure 29**).

Figure 29. A) Réponse tumorale primaire à la nécropsie et B) photographies de tumeurs représentatives pour les trois cohortes MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=6): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Combinaison B (n=6) : Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 2-10

Combinaison C (n=6): Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 8-16

Talazoparib (n=6) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours. La période d'administration est dans la section méthode.

Contrôle (n=4) : véhicule du talazoparib jours 1-9 et véhicule du carboplatin selon les périodes d'administration dans la section méthode.

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. La valeur P est le résultat d'un test de Kruskal-Wallis comparant les volumes tumoraux entre l'ensemble des groupes : combinaison A, combinaison B, combinaison C, talazoparib et contrôle. Le graphique en A) indique les volumes tumoraux à la nécropsie mesurés sur la tumeur extraite. Les photographies en B) démontrent des exemples représentatifs des tumeurs extraites de chaque groupe à la nécropsie.

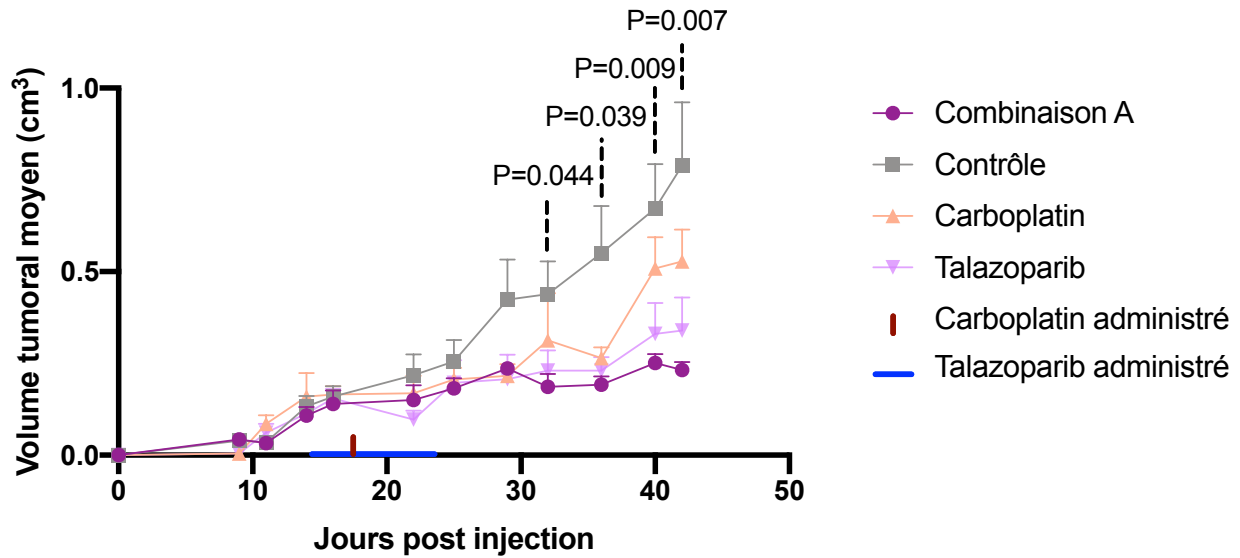
Efficacité thérapeutique de la cohorte A

Dans un deuxième temps, nous avons répété l'expérience avec la combinaison A où le talazoparib et le carboplatin sont administrés simultanément, reflétant ce qui se fait dans les essais cliniques actuels. Sur le plan méthodologique, cela nous a également permis de mieux réévaluer la quantification de métastases pulmonaires sans instillation de formaline et une autre méthode de prélèvement sanguin, nous permettant d'obtenir le taux de neutrophiles.

Nous avons injecté les cellules MDAMB231 chez 45 souris. Parmi elles, 20 ont eu une croissance tumorale primaire et ont été incluses. Huit souris ont reçu la combinaison A, trois souris ont reçu du talazoparib en monothérapie, trois souris ont reçu du carboplatin en monothérapie et six souris furent incluses dans le groupe contrôle. Le talazoparib et le carboplatin dans le groupe de monothérapie étaient administrés exactement le même jour et durant le même créneau horaire que dans le groupe combinaison.

La combinaison A a généré une inhibition tumorale supérieure aux autres groupes, soit de 67.3%. L'index d'inhibition de la croissance tumorale était de 63.4% pour le talazoparib et 57.3% pour le carboplatin. Nous avons obtenu des différences de volume tumoral statistiquement significatives entre l'ensemble des groupes (i.e., test de Kruskal-Wallis) (**Figure 30**). Les seules différences de volume tumoral significatives lors des comparaisons directes entre chaque groupe étaient entre la combinaison A et le groupe contrôle (i.e., jours 32 à 42 post injection). Dans cette étude, nous notons que seule la combinaison A a maintenu une inhibition de la croissance tumorale jusqu'à la nécropsie (**Figure 30**).

Figure 30. Réponse tumorale primaire chez la cohorte A MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=8): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Carboplatin (n=3) : carboplatin en monothérapie 1 dose administrée en même temps que dans la combinaison A.

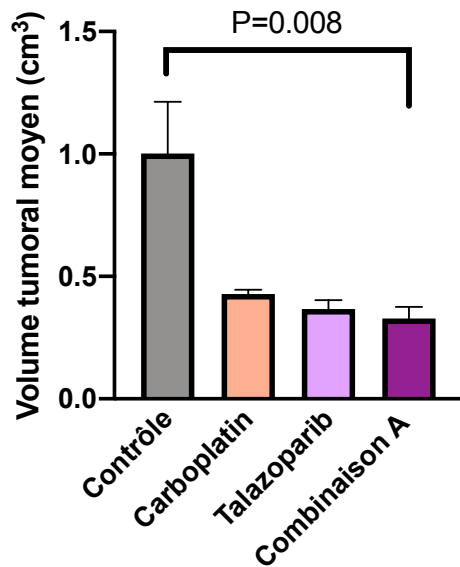
Talazoparib (n=3) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours administré en même temps que dans la combinaison A.

Contrôle (n=6) : véhicule du talazoparib jours 1-9 simultanément au véhicule du carboplatin le jour 3

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Seuls les résultats statistiquement significatifs sont consignés sur cette figure. Le talazoparib et le carboplatin dans le groupe de monothérapie était administrés exactement le même jour et durant le même créneau horaire que dans le groupe combinaison.

Lors de la nécropsie nous n'avons pas réalisé d'instillation des poumons et avons effectué un prélèvement sanguin par ponction cardiaque terminale. Nous avons noté une forte sensibilité au talazoparib en monothérapie dans cette cohorte. Cependant, à la nécropsie, seule la combinaison A avait un volume tumoral moyen (i.e., 0.33 cm^3) significativement inférieur aux contrôles (différence absolue = 10.3 cm^3 , $P = 0.008$) (Figure 31).

Figure 31. Réponse tumorale primaire au jour de la nécropsie chez la cohorte A MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=8): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Carboplatin (n=3) : carboplatin en monothérapie 1 dose administrée en même temps que dans la combinaison A.

Talazoparib (n=3) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours administré en même temps que dans la combinaison A.

Contrôle (n=6) : véhicule du talazoparib jours 1-9 simultanément au véhicule du carboplatin le jour 3

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Seuls les résultats statistiquement significatifs sont consignés sur cette figure. La valeur P indiquée sur le graphique est le résultat d'un test de Dunn entre le volume tumoral de la combinaison A et du groupe contrôle. Le talazoparib et le carboplatin dans le groupe de monothérapie étaient administrés exactement le même jour et durant le même créneau horaire que dans le groupe combinaison.

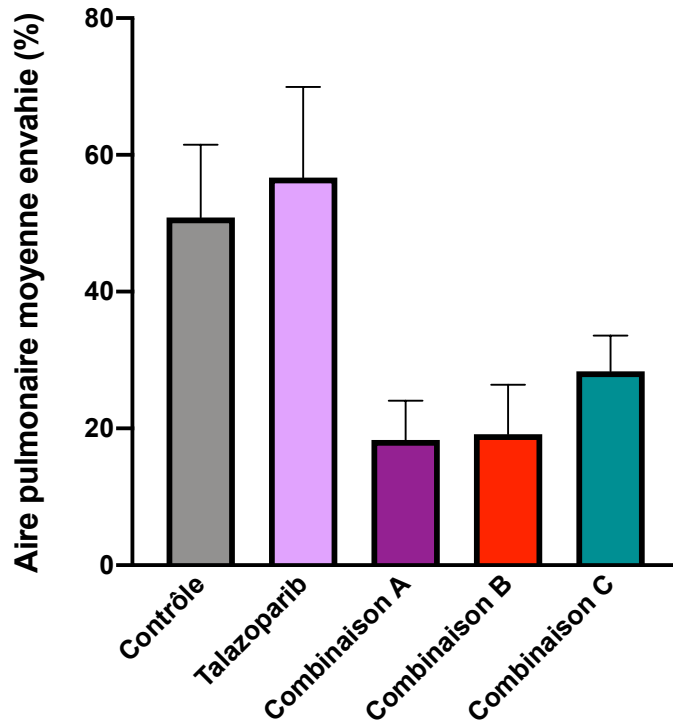
2.2.1.2. Développement de métastases

Efficacité thérapeutique différentielle des trois cohortes

Le fardeau métastatique pulmonaire a été évalué chez l'ensemble des souris. La combinaison A avait la plus faible proportion d'aire pulmonaire envahie (i.e., en moyenne: 18.3% d'aire pulmonaire envahie), suivie par la combinaison B (i.e., en moyenne: 19.2% d'aire pulmonaire

envahie) (**Figure 32**). Une différence statistiquement significative entre tous les groupes fut décelée ($H [4] = 10.42$, $P = 0.034$) sans différences lors des comparaisons multiples.

Figure 32. Réponse tumorale métastatique au niveau pulmonaire pour l'ensemble des cohortes de traitement MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=6): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Combinaison B (n=6) : Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 2-10

Combinaison C (n=6): Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 8-16

Talazoparib (n=6) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours. La période d'administration est dans la section méthode.

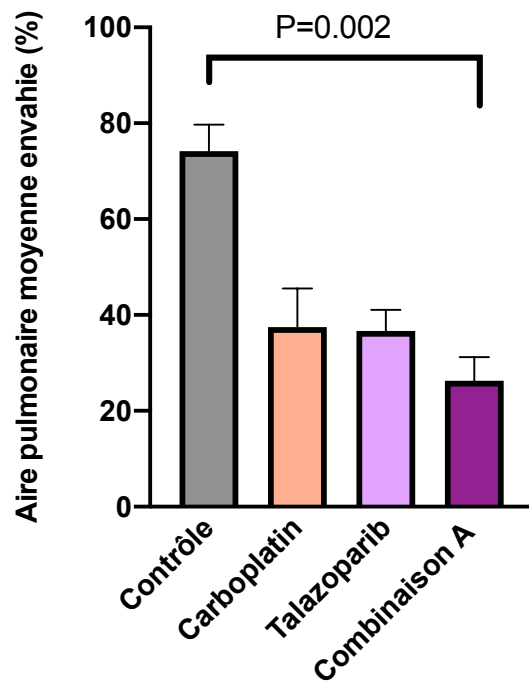
Contrôle (n=4) : véhicule du talazoparib jours 1-9 et véhicule du carboplatin selon les périodes d'administration dans la section méthode.

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Aucune différence statistiquement significative ne fut décelée. La proportion d'aire pulmonaire envahie par des métastases a été déterminée au microscope par rapport à la surface totale des deux poumons.

Efficacité thérapeutique de la cohorte A

La combinaison A avait la plus faible proportion d'aire pulmonaire envahie (i.e., en moyenne: 26.3% d'aire pulmonaire envahie), suivie par les groupes de monothérapie qui ont démontré des résultats similaires (i.e., talazoparib: 36.7% d'aire pulmonaire envahie, carboplatin : 37.5% d'aire pulmonaire envahie) (**Figure 33**). Une différence statistiquement significative entre la combinaison A et le groupe contrôle fut décelée (différence absolue = 11.5%, $P = 0.002$).

Figure 33. Réponse tumorale métastatique chez la cohorte A MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=8): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Carboplatin (n=3) : carboplatin en monothérapie 1 dose administrée en même temps que dans la combinaison A.

Talazoparib (n=3) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours administré en même temps que dans la combinaison A.

Contrôle (n=6) : véhicule du talazoparib jours 1-9 simultanément au véhicule du carboplatin le jour 3

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Seuls les résultats statistiquement significatifs sont consignés sur cette figure. La valeur P indiquée sur le graphique est le résultat d'un test de Dunn comparant les volumes tumoraux de la combinaison A et du groupe contrôle. Le talazoparib et le carboplatin dans le groupe

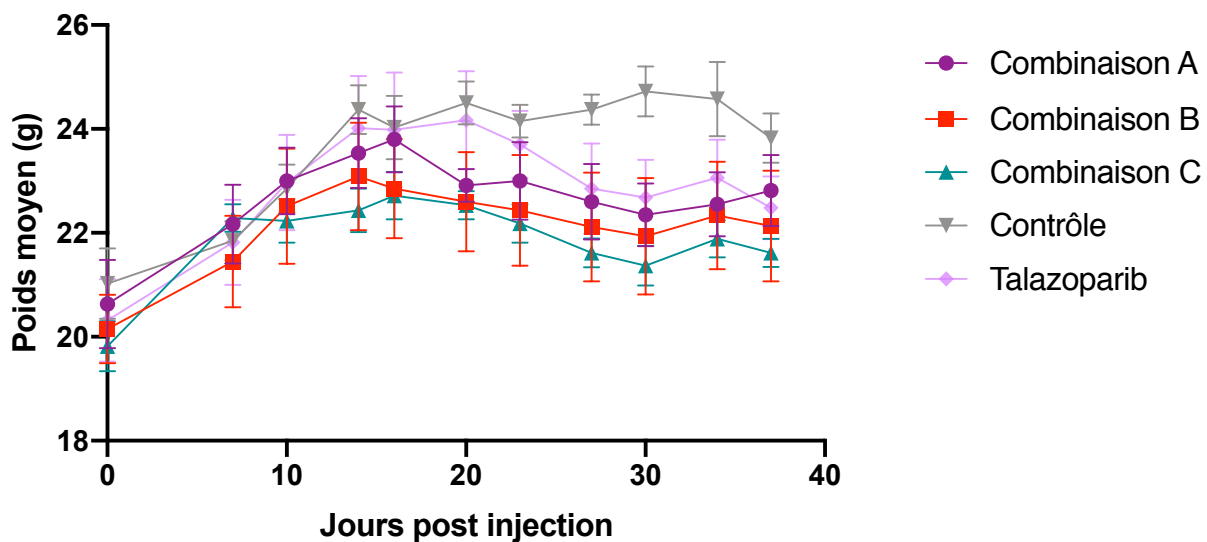
monothérapie étaient administrés exactement le même jour et durant le même créneau horaire que dans le groupe combinaison. La proportion d'aire pulmonaire envahie par des métastases a été déterminée au microscope par rapport à la surface totale des deux poumons. Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne.

2.2.1.3. Toxicité

Toxicité différentielle des trois cohortes

La toxicité de chaque régime de traitement a été évaluée au niveau du poids et de l'hématologie. Tous les groupes de traitement ont gagné du poids entre les jours 0 et 16 post injection (**Figure 34**). Les traitements ont commencé le jour 17 pour tous les groupes. Les combinaison A, B et C ont perdu du poids à compter du jour 16 post injection avec un déclin progressif, puis une stabilisation. Durant cette période, le groupe contrôle a gardé un poids stable (**Figure 34**). Nous n'avons noté aucune différence statistiquement significative de poids entre les groupes de traitement.

Figure 34. Effet des trois séquences de traitement sur le poids moyen pour MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=6): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Combinaison B (n=6) : Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 2-10

Combinaison C (n=6): Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 8-16

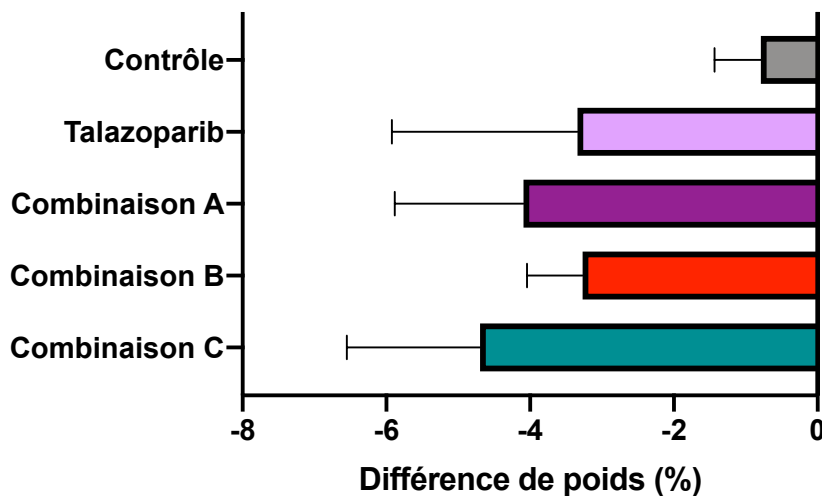
Talazoparib (n=6) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours. La période d'administration est dans la section méthode.

Contrôle (n=4) : véhicule du talazoparib jours 1-9 et véhicule du carboplatin selon les périodes d'administration dans la section méthode.

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Le poids a été mesuré deux fois par semaine lors des mesures tumorales.

Nous avons calculé la différence de poids entre le poids prétraitement et le dernier poids mesuré selon la formule décrite dans la section méthode. Tous les groupes ont perdu du poids (**Figure 35**). Le groupe contrôle avait la perte de poids la moins importante (-0.79%), suivi par la combinaison B (i.e., -3.27%).

Figure 35. Différences de poids entre les trois séquences de traitement pour MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=6): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Combinaison B (n=6) : Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 2-10

Combinaison C (n=6): Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 8-16

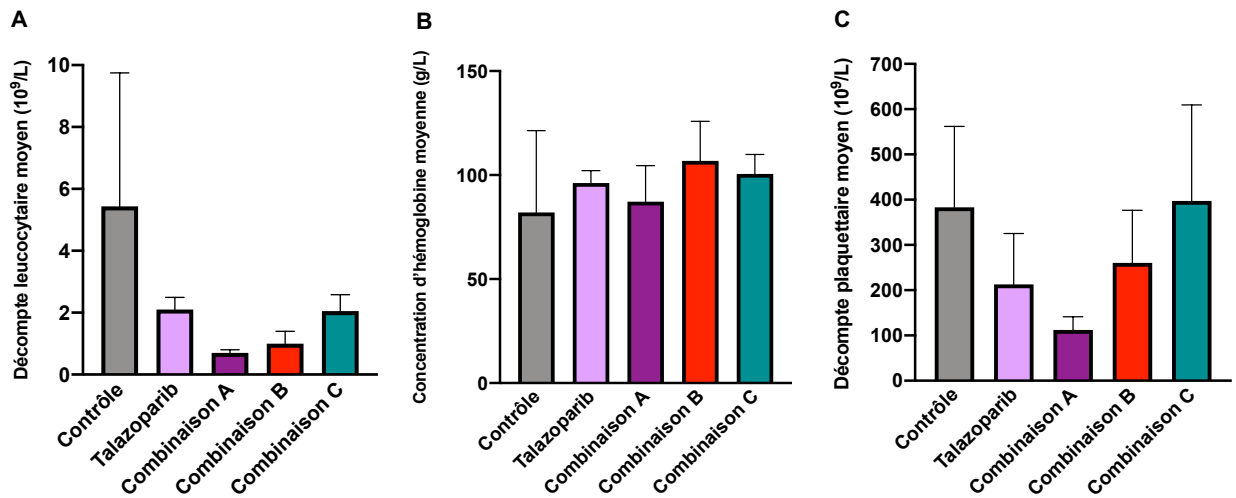
Talazoparib (n=6) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours. La période d'administration est dans la section méthode.

Contrôle (n=4) : véhicule du talazoparib jours 1-9 et véhicule du carboplatin selon les périodes d'administration dans la section méthode.

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Le poids a été mesuré deux fois par semaine lors des mesures tumorales. La différence de poids fut calculée selon la formule suivante: $\frac{Poids\ F - Poids\ T0}{Poids\ T0} \times 100$. Poids F signifie poids final (i.e., dernier poids mesuré) et Poids T0 représente le poids mesuré juste avant le jour 1 du traitement.

Nous avons obtenu une formule sanguine complète pour 24/28 souris (**Figure 36**). Vu le petit nombre de souris, ces résultats sont purement expérimentaux. Au niveau du décompte leucocytaire et plaquettaire, nous avons noté une grande variabilité, avec un intervalle maximal de $0.2 \times 10^9/L$ à $14 \times 10^9/L$ pour les leucocytes (i.e., groupe contrôle) et un intervalle maximal de $34 \times 10^9/L$ à $626 \times 10^9/L$ pour les plaquettes (i.e., combinaison C) (**Figure 36.A**). La combinaison A avaient le taux de leucocytes moyen le plus faible (i.e., $0.7 \times 10^9/L$), suivi par la combinaison B ($1.0 \times 10^9/L$). La combinaison C avait le décompte leucocytaire moyen le plus élevé parmi les combinaisons (i.e., $2.1 \times 10^9/L$). La concentration moyenne en hémoglobine était similaire entre les groupes (**Figure 36.B**). Le décompte plaquettaire moyen a démontré une variabilité importante chez la majorité des groupes de traitement (**Figure 36.C**). La combinaison A avait le décompte plaquettaire moyen le plus faible, suivi de la combinaison B, et de la combinaison C (i.e., $112.4 \times 10^9/L$, $260.2 \times 10^9/L$ et $397.3 \times 10^9/L$ respectivement). Aucune différence statistiquement significative n'a été décelée entre les groupes pour l'analyse hématologique.

Figure 36. Toxicité hématologique des trois séquences de traitement pour MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=6): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Combinaison B (n=6) : Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 2-10

Combinaison C (n=6): Carboplatin jour 1 avant talazoparib les jours 8-16

Talazoparib (n=6) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours. La période d'administration est dans la section méthode.

Contrôle (n=4) : véhicule du talazoparib jours 1-9 et véhicule du carboplatin selon les périodes d'administration dans la section méthode.

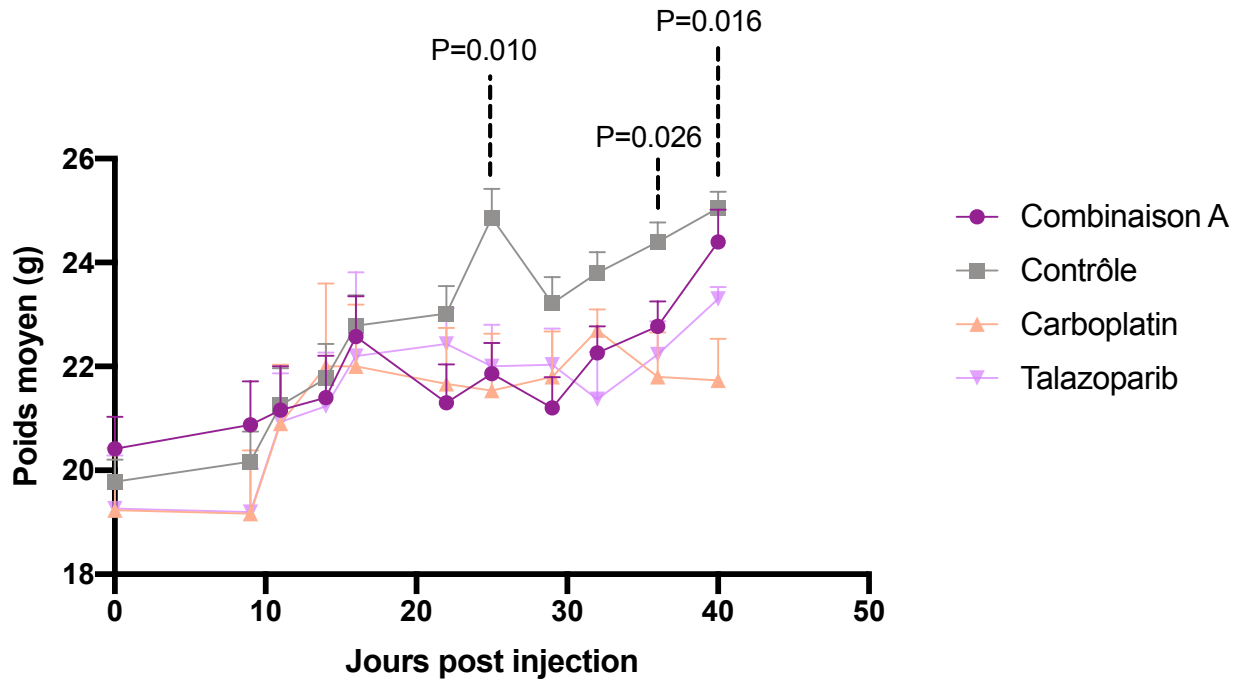
Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Aucun résultat ne fut significatif. Les données sont issues d'une formule sanguine complète réalisée sur un prélèvement par ponction cardiaque terminale.

Toxicité de la cohorte A

Tous les groupes de traitement ont gagné du poids entre les jours 0 et 16 post injection (**Figure 37**). Les groupes combinaison A et carboplatin ont perdu du poids à compter du jour 16 post injection. Les groupes contrôles et combinaison A ont démontré la meilleure récupération de leur poids prétraitement avec un gain de poids marqué en fin d'expérience. Le carboplatin en monothérapie est le seul groupe qui a gardé un poids stable par la suite. Les comparaisons

multiples ont démontré que le carboplatin a suscité un poids significativement inférieur comparativement aux contrôles les jours 25, 36 et 40. Au jour 40, la combinaison A avait un poids significativement supérieur au carboplatin (différence absolue = 2.7, P = 0.042).

Figure 37. Poids moyen en fonction des jours post injection pour la cohorte A MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=8): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Carboplatin (n=3) : carboplatin en monothérapie 1 dose administrée en même temps que dans la combinaison A.

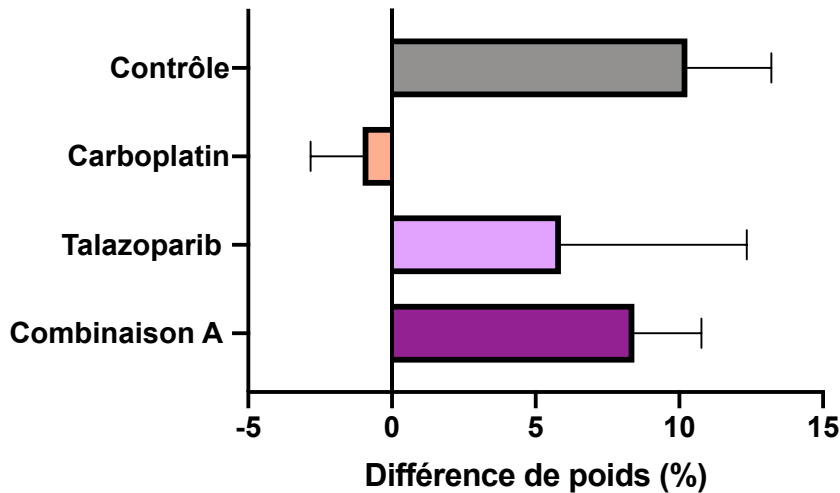
Talazoparib (n=3) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours administré en même temps que dans la combinaison A.

Contrôle (n=6) : véhicule du talazoparib jours 1-9 simultanément au véhicule du carboplatin le jour 3

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Le poids a été mesuré deux fois par semaine lors des mesures tumorales. Les valeurs P indiquées sur le graphique représentent les résultats des tests de ANOVA comparant l'ensemble des groupes : combinaison A, talazoparib, carboplatin et contrôle. Les analyses statistiques ont été réalisées du jour 22 au jour 40 post injection. Seuls les résultats statistiquement significatifs sont inscrits.

Les résultats des différences de poids sont démontrés à la **figure 38**. Seul le groupe carboplatin a perdu du poids.

Figure 38. Différences de poids pour la cohorte A MDAMB231.



Légende:

Combinaison A (n=8): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Carboplatin (n=3) : carboplatin en monothérapie 1 dose administrée en même temps que dans la combinaison A.

Talazoparib (n=3) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours administré en même temps que dans la combinaison A.

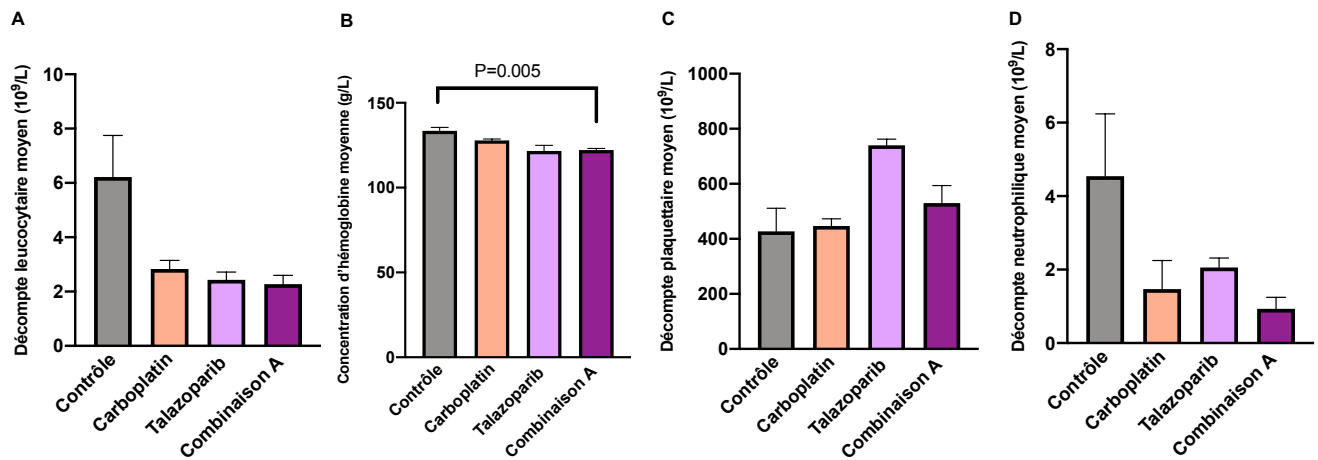
Contrôle (n=6) : véhicule du talazoparib jours 1-9 simultanément au véhicule du carboplatin le jour 3

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Le poids a été mesuré deux fois par semaine lors des mesures tumorales. La différence de poids fut calculée selon la formule suivante: $\frac{Poids\ F - Poids\ T0}{Poids\ T0} \times 100$. Poids F signifie poids final (i.e., dernier poids mesuré) et Poids T0 représente le poids mesuré juste avant le jour 1 du traitement.

Nous avons obtenu une formule sanguine complète pour l'ensemble des 20 souris (**Figure 39**). Vu le petit nombre de souris, ces résultats sont purement expérimentaux. La toxicité hématologique s'est démontrée plus importante à nouveau chez la combinaison A, notamment au niveau du taux

moyen de neutrophiles (i.e., $0.9 \times 10^9/L$). Comparativement aux monothérapies, la toxicité sur les leucocytes, les hématies et les plaquettes était similaire entre la combinaison A, le talazoparib et le carboplatin.

Figure 39. Toxicité hématologique chez la cohorte A.



Légende:

Combinaison A (n=8): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Carboplatin (n=3) : carboplatin en monothérapie 1 dose administrée en même temps que dans la combinaison A.

Talazoparib (n=3) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours administré en même temps que dans la combinaison A.

Contrôle (n=6) : véhicule du talazoparib jours 1-9 simultanément au véhicule du carboplatin le jour 3

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Seuls les résultats significatifs sont indiqués. La valeur P indiquée sur le graphique B) est le résultat d'un test de Dunn comparant la différence de concentration en hémoglobine entre groupe contrôle et la combinaison A. Les données sont issues d'une formule sanguine complète réalisée sur un prélèvement par ponction cardiaque terminale.

2.3. HCC1806

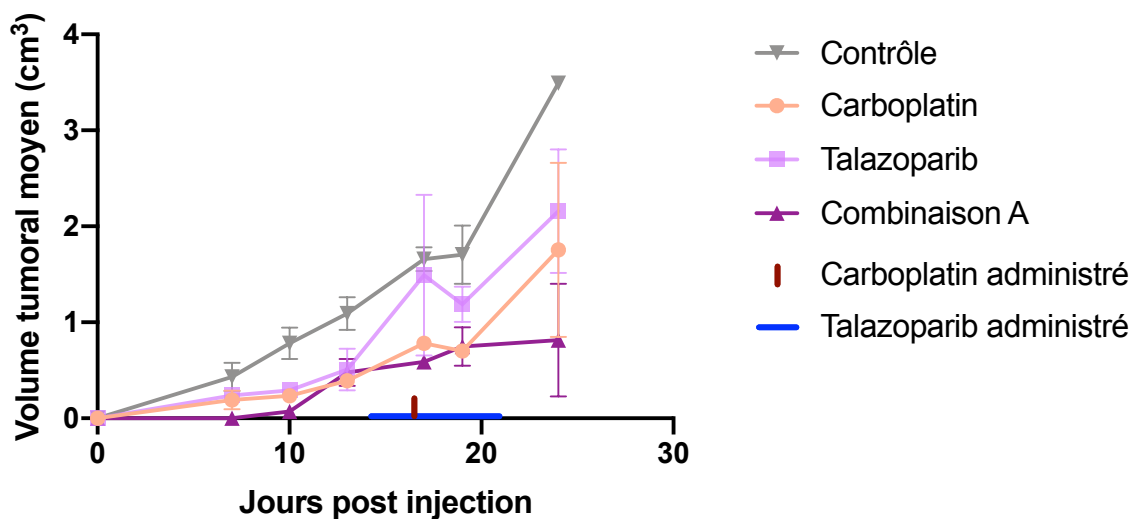
2.3.1. Croissance tumorale primaire

La totalité des 18 souris qui ont reçu une injection de cellules tumorales ont eu une croissance tumorale. Cependant, 10/18 souris ont développé une croissance tumorale tardivement et ont été exclues de l'analyse.

Huit souris ont été réparties dans quatre groupes de traitement de la cohorte A, soit deux souris par groupe. Deux souris ont reçu 9 jours de talazoparib en combinaison avec une dose de carboplatin au jour 3 (i.e., combinaison A). Deux souris ont reçu 9 jours de talazoparib en monothérapie (i.e., groupe talazoparib), deux souris ont reçu une dose de carboplatin au jour 3 en monothérapie (i.e., groupe carboplatin) et deux souris ont reçu les véhicules du talazoparib et du carboplatin (i.e., groupe contrôle).

La **figure 40** présente la croissance tumorale chez l'ensemble des groupes de traitement. L'inhibition de la croissance tumorale pour la combinaison A est supérieure à tous les autres groupes. Lors de la nécropsie, la combinaison A avait le plus faible volume tumoral moyen (i.e., 1.62 cm³), suivi du groupe talazoparib (1.92 cm³), du groupe carboplatin (1.95 cm³), et du groupe contrôle (2.76 cm³) (**Figure 41**).

Figure 40. Croissance tumorale primaire pour HCC1806.



Légende:

Combinaison A (n=2): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

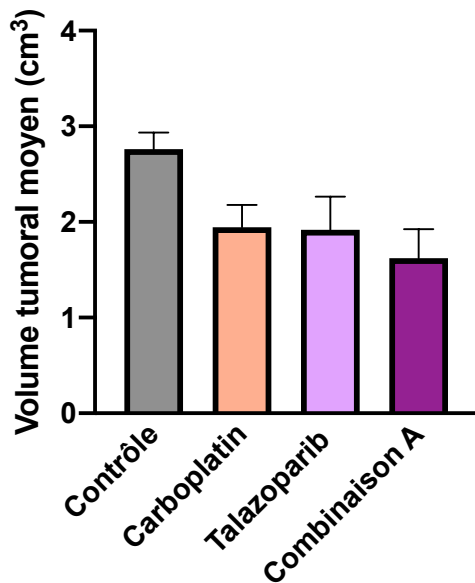
Carboplatin (n=2) : carboplatin en monothérapie 1 dose administrée en même temps que dans la combinaison A.

Talazoparib (n=2) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours administré en même temps que dans la combinaison A.

Contrôle (n=2) : véhicule du talazoparib jours 1-9 simultanément au véhicule du carboplatin le jour 3

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Toutes les barres d'erreur sont indiquées.

Figure 41. Réponse tumorale primaire à la nécropsie pour HCC1806.



Légende:

Combinaison A (n=2): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Carboplatin (n=2) : carboplatin en monothérapie 1 dose administrée en même temps que dans la combinaison A.

Talazoparib (n=2) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours administré en même temps que dans la combinaison A.

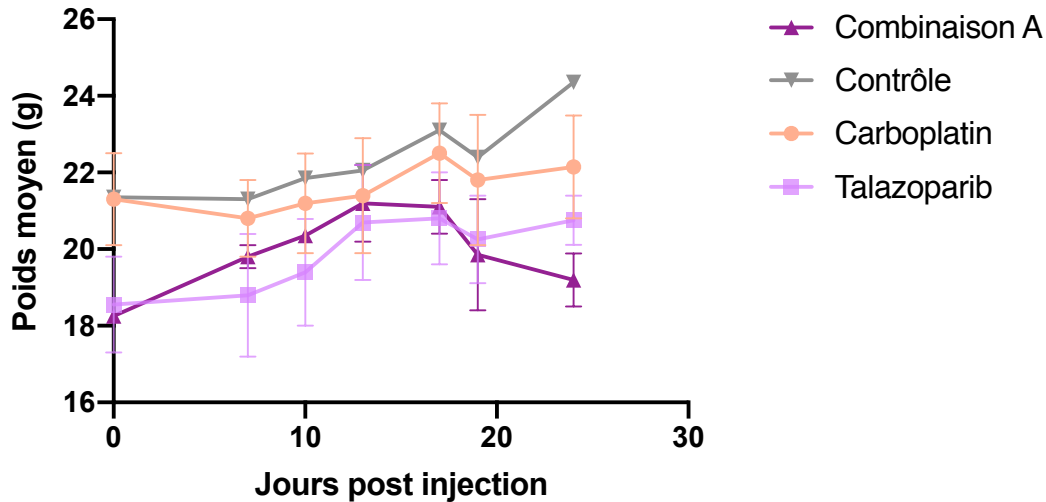
Contrôle (n=2) : véhicule du talazoparib jours 1-9 simultanément au véhicule du carboplatin le jour 3

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Toutes les barres d'erreur sont indiquées.

2.3.2. Toxicité

En termes de poids, nous avons observé une perte de poids par rapport au poids prétraitement chez la combinaison A (**Figure 42 et 43**). Le groupe contrôle et les groupes de monothérapie ont eu un gain de poids durant l'expérience.

Figure 42. Poids moyen en fonction des jours post injection pour HCC1806.



Légende:

Combinaison A (n=2): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

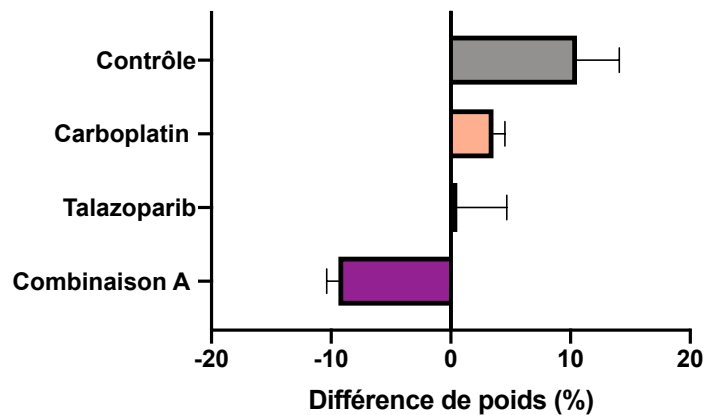
Carboplatin (n=2) : carboplatin en monothérapie 1 dose administrée en même temps que dans la combinaison A.

Talazoparib (n=2) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours administré en même temps que dans la combinaison A.

Contrôle (n=2) : véhicule du talazoparib jours 1-9 simultanément au véhicule du carboplatin le jour 3

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Toutes les barres d'erreur sont indiquées. Le poids a été mesuré deux fois par semaine lors des mesures tumorales.

Figure 43. Différence de poids pour HCC1806.



Légende:

Combinaison A (n=2): Talazoparib jours 1-9 simultanément au carboplatin le jour 3

Carboplatin (n=2) : carboplatin en monothérapie 1 dose administrée en même temps que dans la combinaison A.

Talazoparib (n=2) : talazoparib en monothérapie durant 9 jours administré en même temps que dans la combinaison A.

Contrôle (n=2) : véhicule du talazoparib jours 1-9 simultanément au véhicule du carboplatin le jour 3

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne. Le poids a été mesuré deux fois par semaine lors des mesures tumorales. La différence de poids fut calculée selon la formule suivante: $\frac{Poids\ F - Poids\ T0}{Poids\ T0} \times 100$. Poids F signifie poids final (i.e., dernier poids mesuré) et Poids T0 représente le poids mesuré juste avant le jour 1 du traitement.

Chapitre 4 – DISCUSSION

1. Implications cliniques de la signature génétique de 63 gènes

1.1. Expression génique et facteurs pronostiques

L'analyse corrélationnelle entre la signature d'expression génique et les facteurs pronostiques (**Tableau 16**) a été réalisée au sein de la cohorte(162) dans laquelle la prévalence de la signature génétique avait été initialement étudiée(146). Cette cohorte fut choisie car elle est composée de tumeurs triple-négatives, tout comme les lignées cellulaires utilisées pour développer la signature génétique(146). Sommes toute, aucun des résultats n'était statistiquement significatif (**Tableau 16**) et ceux-ci devront être davantage étudiés dans de plus larges cohortes. Le potentiel de prédiction de la signature génétique aussi reste à être validé dans une plus large cohorte. L'absence de corrélation statistiquement significatives suggère une indépendance de la signature génétique, qui pourrait être validé au moyen d'analyses multivariées. Une autre hypothèse est que la taille de la cohorte ne permettait pas de détecter des différences significatives. Si la signature génétique s'avère être un biomarqueur indépendant suite à une analyse multivariée dans une plus large cohorte cela rendrait son utilisation encore plus robuste. Dans ce cas il sera intéressant de comparer sa précision de prédiction à celle du statut de mutation germinale BRCA.

1.2. Mutations et facteurs pronostiques

Les résultats sur les mutations sont ceux d'une exploration. Nos résultats suggèrent que les tumeurs basales, luminales B, traitées par thérapie systémique néoadjuvante ainsi que les récidives locorégionales et les métastases pourraient bénéficier des inhibiteurs de PARP (**Figures 18-21**). Nos résultats correspondent à ce à quoi on s'attendrait : une plus grande proportion de patientes avec des mutations parmi les tumeurs plus agressives et une plus grande proportion d'échantillons mutés également parmi ces tumeurs. Cela pourrait être expliqué par la perte de gènes suppresseurs de tumeurs ou des mutations activatrices dans des proto-oncogènes. Les données que nous avons sont davantage cliniques et concernent la proportion de patientes ayant des mutations parmi différents groupes ou la proportion d'échantillons mutés. Cependant, une

analyse de la proportion de mutations somatiques parmi les gènes de la signature génétique dans chaque échantillon tumoral serait aussi intéressante. Un ratio pourrait être fait pour chaque échantillon: nombre de mutations des gènes de la signature génétique divisé par nombre de mutations dans tout le génome. Nous n'avons pas fait cette analyse car nous avons observé que le nombre de mutations était faible. De plus, les données de cBioPortal dont nous disposons ne permettent pas de faire cette analyse avec ces études car nous n'avons pas les données du séquençage de tout le génome. Cette analyse permettrait d'établir la présence ou l'absence d'une pression sélective pour des mutations dans les gènes de la signature génétique parmi les tumeurs aux caractéristiques agressives. Si une telle pression sélective s'avère présente, cela serait probablement secondaire à un enrichissement des gènes nécessaires à la stabilité du génome.

Une deuxième limitation de l'étude est l'absence de discrimination dans l'analyse entre les différents types de mutations. Il serait possible de cibler les mutations spécifiques qui sont les plus prévalentes sans pouvoir établir pour autant un lien de causalité. Les aberrations du nombre de copie ont aussi démontré un impact pronostique important en cancer du sein et pourraient être explorées au sein des gènes de la signature génétique(164).

Nous avons constaté une différence statistiquement significative entre les patientes présentant une mutation de la signature génétique chez les tumeurs lumineuses A et B. Cependant, la différence majeure entre les deux courbes pour luminal A a été trouvée principalement vers la fin du suivi, alors qu'il y avait moins de patientes. Cela pourrait être dû au fait que le pronostic est meilleur chez ce sous-groupe et que les récurrences surviennent à plus long-terme. Chez les patientes atteintes de tumeurs lumineuses B, les courbes de survie sont systématiquement séparées, ce qui suggère une plus grande probabilité que la signature génétique joue un rôle de biomarqueur pronostique dans cette cohorte.

De plus, nous avons trouvé une plus grande proportion d'échantillons mutés parmi plusieurs organes métastatiques, particulièrement le cerveau. Ceci est intéressant puisque le talazoparib a également démontré une amélioration de la survie sans progression chez les patientes présentant des métastases au système nerveux central (5,7 mois vers 1,6 mois) par rapport à la chimiothérapie(133). Des données précédentes démontrent que le véliparib et le niraparib ont

une bonne distribution à travers la barrière hémato-encéphalique, tandis que le talazoparib et l'olaparib passent la barrière hémato-encéphalique mais avec une limitation due à l'efflux du médicament(179-182). Les données sont mitigées par rapport au transport du rucaparib à travers la barrière hémato-encéphalique(183). Le carboplatin a une pénétration limitée dans le système nerveux central (taux de 2.6%)(184).

Une association a été établie entre la présence de mutations somatiques dans des gènes responsables de la recombinaison homologe et la sensibilité aux inhibiteurs de PARP dans plusieurs cancers, incluant le cancer du sein(35, 185). Plusieurs de ces gènes font partie de la signature génétique, tels que BRCA1, FANCC, FANCE, PALB2, RAD51C, RAD51D, NBN, MRE11A et BLM. Des études sur l'analyse *in vitro* de l'impact des mutations de chacun de ces gènes sur la réponse aux inhibiteurs de PARP seront nécessaires. Bien que révélant une information cruciale sur la possibilité de répondre aux inhibiteurs de PARP, les mutations somatiques au niveau d'un gène impliqué dans la réparation de l'ADN sont isolées et ne sont retrouvées que dans un faible pourcentage de patientes dans la population(35). Une approche fonctionnelle complémentaire pourrait être utilisée en évaluant la réponse aux dommages d'ADN sollicitée par l'administration de chimiothérapie.

2. Séquence optimale d'administration du talazoparib et du carboplatin

in vivo

2.1. Projet pilote

Les résultats du projet pilote nous ont permis de construire plus précisément l'étude expérimentale définitive. Une croissance tumorale et un envahissement métastatique pulmonaire important furent démontrés chez l'ensemble des souris MDAMB231, confirmant le caractère optimal de ce modèle(166, 186, 187). Pour cette raison, nous avons employé ce modèle tumoral dans la majorité de l'étude expérimentale. En effet, un faible envahissement métastatique (i.e., faible proportion d'aire tissulaire envahie) et une croissance tumorale chez seulement une proportion des souris auraient rendus ce modèle sous-optimal.

Nous avons utilisé les résultats de l'étude pilote afin de déterminer le volume de cellules à injecter, la technique chirurgicale optimale, l'analgésie optimale, le délai de croissance des tumeurs et la faisabilité des analyses hématologiques. La lignée MDAMB436 a démontré une variabilité importante au niveau de la croissance tumorale (**Figure 23**). Deux souris de la cohorte 1 avaient un délai de croissance et ont maintenu des volumes tumoraux inférieurs aux autres pendant toute l'étude (**Figure 23.A**) et une souris de la cohorte 2 n'a eu aucune croissance tumorale (**Figure 23.B**). La lignée MDAMB436 n'était pas non plus un modèle optimal dû à une lente croissance tumorale et une longue période avant de développer des métastases. Ainsi, le temps entre la fin des traitements et la nécropsie aurait été trop long avec ce modèle, diminuant la probabilité de déceler une différence significative au niveau de la réponse tumorale. Cela serait aussi délétère pour des expériences futures avec les tissus des souris telles que des études immunohistochimiques.

Les lignées SUM149PT et HCC1806 ont démontré une croissance optimale dans les études précédentes, tout comme dans notre étude(91, 167, 168, 188-191). La lignée HCC1806 a été choisie pour l'étude expérimentale car la croissance tumorale était rapide, néanmoins il serait également intéressant de répéter l'étude avec SUM149PT car sa croissance tumorale entre les jours 0 et 42 post injection est très similaire à MDAMB231 (**Figure 24**). De plus, la variabilité du volume tumoral moyen de SUM149PT était moindre que HCC1806. Iorns et al. ont évalué les lignées MDAMB231 et MDAMB436. Nous avons obtenu des volumes tumoraux inférieurs à ceux d'Iorns et al. durant l'ensemble de nos expériences, malgré un suivi post chirurgie plus long dans notre étude et l'injection de concentrations cellulaires supérieures (i.e., 5 millions de cellules versus 2 millions pour Iorns et al.)(166). Le calcul utilisé pour obtenir les volumes tumoraux n'est pas décrit par Iorns et al. et pourrait aussi expliquer le disparité au sein des trouvaillles, si celui-ci est différent.

En termes de métastases pulmonaires MDAMB231 est la seule lignée à avoir eu un envahissement significatif. MDAMB436, SUM149PT et HCC1806 détiennent un faible potentiel métastatique pulmonaire (**Tableau 18**). Lors de la nécropsie nous n'avons pas non plus vu de métastases au niveau hépatique ou splénique pour la grande majorité des souris de ces lignées. De ce fait, nous n'avons pas investigué la présence de micrométastases dans ces organes. Malgré l'utilisation des

mêmes souches de souris (i.e., NOD *scid* gamma) et des mêmes lignées cellulaires nos résultats sont différents de ceux d'Iorns et al. (**Tableau 22**). La proportion de souris avec des métastases pulmonaires est similaire pour MDAMB231 mais différente pour MDAMB436. Les variations dans les clones des lignées cellulaires ou niveaux de passage peuvent être à l'origine de ces différences.

Tableau 19. Proportion de souris avec des métastases dans le projet pilote comparativement à Iorns et al.(166)

	Proportion N (%)	
	Pilote	Iorns et al.
MDAMB436	2 (25)	11 (92)
MDAMB231	4 (100)	9 (100)

SUM149PT avait démontré une capacité à envahir les poumons, cependant, la méthode n'était pas la même que dans notre étude(168). Le nombre de cellules tumorales extravasées fut déterminé par microscopie confocale après injection au niveau de la veine caudale de cellules tumorales marquées. Le microscope confocal réalise des coupes optiques afin d'obtenir des images à de faibles profondeurs de champ. Un laser sert de source de lumière. La technique d'injection au niveau de la veine caudale permet d'obtenir des métastases à distance de manière efficace, cependant l'évaluation de la croissance tumorale primaire ne peut se faire simultanément et le processus métastatique n'est pas transposable chez l'humain.

Dans une étude où la lignée HCC1806 fut injectée de manière orthotopique, 100% des souris ont développé des métastases pulmonaires, comparativement à 2 souris sur 4 dans notre étude(191). Les auteurs ont injecté moins de cellules que nous mais avec une plus haute concentration: 4 millions dans 100 µl. L'expérience dura autour de 20 jours, soit une durée inférieure à la nôtre. Le fardeau métastatique pulmonaire, mesuré par luminescence était faible. Cela diminue la probabilité de détecter des différences entre plusieurs groupes de traitement. La luminescence constitue une alternative intéressante pour la quantification des métastases pulmonaires, bien que cette méthode ne corresponde pas à ce qui est effectué en clinique. Par ailleurs, 80% des souris ont développé des métastases aux ganglions inguinaux(191). Parmi celles-ci, une grande variabilité fut notée au niveau du fardeau métastatique évalué par luminescence. Une faible

proportion de souris a développé des métastases hépatiques et rénales. Devant ces résultats, il pourrait être judicieux dans le futur d'évaluer le fardeau métastatique dans plusieurs organes à la fois dans les différents groupes de traitement plutôt que de se concentrer uniquement sur les poumons. Un avantage considérable de la luminescence est que cette quantification peut se faire simultanément au moyen d'acquisition d'images du corps entier de la souris. Nous pourrions utiliser la luminescence une fois cette technique acquise dans le laboratoire dans le futur.

Nous avons choisi d'utiliser les souris NOD *scid* gamma durant notre projet afin d'évaluer le développement de métastases. Cependant des modèles d'allogreffes immunocompétents existent également en cancer du sein pour étudier les métastases(187). Le fardeau métastatique est une issue peu étudiée dans le développement préclinique de thérapies. Or l'importance du sujet est réelle car les métastases sont associées à un pronostic sombre. Yang et al. ont assemblé 12 modèles métastatiques pour des hôtes syngéniques immunocompétents(187). Un avantage de ces modèles est la présence d'un système immunitaire intact. De cette façon, le processus métastatique reproduit l'évasion de la tumeur primaire du système immunitaire tel qu'il survient chez l'humain et sans incompatibilité d'espèces au niveau des interactions paracrines entre la tumeur et le stroma(187). Cependant ces tumeurs sont murines, elles ne sont pas des tumeurs mammaires humaines et le cours de la maladie est très rapide ce qui altère la biologie.

D'autres modèles potentiels sont les xénogreffes dérivées de patientes. Cependant, ce n'est pas le modèle de choix pour étudier plusieurs cohortes de traitement en même temps. La vitesse de la croissance tumorale est variable d'une xénogreffe à l'autre car elle est intrinsèquement liée à la biologie de la tumeur de la patiente dont elle provient. De plus, le développement de métastases est difficile à prévoir.

Nous avons noté des différences importantes entre les moyennes normales des analyses hématologiques pour les souris NOD *scid* gamma et nos souris. Les différences les plus notables se situent au niveau du décompte leucocytaire et neutrophilique. Pour MDAMB231, les décomptes leucocytaires et neutrophiliques étaient supérieurs, et le décompte plaquettaire était inférieur chez nos contrôles par rapport aux souris NOD *scid* gamma femelles saines. Avec la technique de ponction cardiaque, nous avons observé moins de variabilité qu'avec la section de

l'aorte et de la veine cave pour la cohorte A. De plus, le décompte plaquettaire était plus élevé avec la ponction cardiaque.

Les échantillons coagulés ou de faible qualité furent exclus des résultats. Les souris ne présentaient pas d'infection lors de la nécropsie. De plus, l'analyse a été réalisée par les laboratoires regroupés du CHUM dont la technique est rigoureusement validée. Durant l'optimisation de nos méthodes, nous avons utilisé différents types de tubes, sans que cela ne change les résultats de l'analyse. Ces différences sont probablement issues du fait que nos souris étaient atteintes de cancer et de métastases à différents organes.

Nous avons donc décidé de prendre nos groupes contrôles comme référence pour comparer les résultats à ceux des groupes traités. Malgré l'immunosuppression sévère des souris NOD *scid* gamma, les souris des groupes contrôles n'avaient pas de taux de leucocytes inférieurs à la moyenne normale. Cela a permis d'observer une différence avec les groupes de traitement qui présentaient une diminution de ces taux.

Par ailleurs, d'autres expériences pourraient être considérées pour évaluer la toxicité hématologique, telle que l'analyse de la moelle osseuse, l'isolation de marqueurs inflammatoires et de facteurs stimulants la croissance des lignées myéloïdes, l'estimation de la cellularité de la moelle osseuse et l'estimation des cellules progénitrices(192).

2.2. Étude expérimentale

2.2.1. Croissance tumorale primaire

Nos résultats démontrent une amélioration de la réponse au talazoparib lorsque celui-ci est administré avec une dose unique de carboplatin chez deux xénogreffes orthotopiques BRCA non-muté (i.e., MDAMB231 et HCC1806). Cela est congruent à plusieurs études précliniques et correspond à ce qui est attendu(144, 146, 156).

Nos résultats correspondent à une action synergique entre les sels de platine et les inhibiteurs de PARP, telle que démontrée *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs études précédentes (**Tableau 23**). Rottenberg et al. ont démontré une amélioration statistiquement significative de la survie sans progression et de la survie globale avec l'olaparib combiné à 28 ou 100 jours de sels de

platine(154). Les résultats étaient similaires avec le carboplatin ou le cisplatine. Cependant, les souris ont eu une néphrotoxicité létale après six cycles de cisplatine.

Tableau 20. Résumé des études évaluant un sel de platine combiné à un inhibiteur de PARP.

Article	Modèle	BRCA	Traitement	Résultats
Rottenberg, 2008(154)	Allogreffe GEMM	BRCA1 ^{MUT}	Cisplatine ou carboplatin + olaparib	Combinaison: SSP, SG augmentés. Mort due à la néphrotoxicité au cisplatine.
Evers, 2008(155)	Lignée cellulaire de tumeur murine	BRCA2 ^{MUT} BRCA2 ^{WT}	Cisplatine + olaparib	BRCA2 ^{MUT} : synergie avec la combinaison. BRCA ^{WT} : additivité avec la combinaison.
Clark, 2012(156)	mESC	BRCA1 ^{MUT} BRCA1 ^{WT}	Cisplatine ou carboplatin + véliparib	Véliparib + carboplatin: synergie ou additivité pour tous, accru chez BRCA1 ^{MUT} .
	Lignées cellulaires: HCC1937 et EUFA423F	BRCA1/2 ^{MUT} BRCA1/2 ^{WT}	Cisplatine ou carboplatin + véliparib	Véliparib + carboplatin: synergie ou additivité pour tous, accru chez BRCA2 ^{MUT} .
	Xénogreffes VC8	BRCA2 ^{MUT} BRCA2 ^{WT}	Carboplatin + véliparib	Combinaison > véliparib seul. Pas d'inhibition tumorale significative avec le carboplatin seul.
Shen, 2013(136)	MX-1 xenografts	BRCA1 ^{MUT}	Cisplatine ou carboplatin + talazoparib	Combinaison > sels de platine seuls.

Légende:

GEMM: genetically engineered mouse models

mESC: mouse embryonic stem cells

SSP: survie sans progression

SG: survie globale

Evers et al. ont démontré une synergie uniquement chez les lignées cellulaires BRCA-muté tandis qu'une action additive était présente chez les cellules BRCA non-muté avec l'olaparib et le cisplatine(155). Clark et al. ont eu des résultats similaires dans plusieurs modèles notamment avec le carboplatine qui démontrait un effet synergique ou additif avec le véliparib chez deux lignées cellulaires humaines de cancer du sein(156). L'efficacité de la combinaison était supérieure chez les lignées BRCA-muté. Le carboplatine et le véliparib en combinaison pendant 14 jours chez des xénogreffes VC8 a généré une inhibition de la croissance tumorale supérieure au talazoparib en monothérapie. Shen et al. ont obtenu les mêmes résultats dans des xénogreffes MX-1 avec une durée de traitement de seulement huit jours(136). L'inhibition de la croissance tumorale était supérieure avec la combinaison talazoparib/cisplatine qu'avec la combinaison talazoparib/carboplatine.

Bien que la combinaison simultanée soit donnée dans les études cliniques, notre étude est la première à comparer directement plusieurs séquences de traitements. Nos résultats démontrent que comparativement au groupe contrôle, nous avons noté une inhibition tumorale supérieure avec les combinaisons A et B. La variable importante à considérer est l'index d'inhibition tumorale le jour de la nécropsie. Dans les deux expériences avec MDAMB231, la combinaison A est celle qui a généré la plus haute inhibition tumorale (74.0%), suivie de 69.5% pour la combinaison B. Cependant les différences n'étaient pas statistiquement significatives entre chacune des combinaisons A, B et C.

Du point de vue mécanistique, l'administration du carboplatine avant le talazoparib semblerait en théorie plus efficace. En effet, le carboplatine, en générant des liaisons covalentes avec l'ADN cause des lésions monobrins et active la réparation par excision de base(105). PARP1 lie avec affinité les lésions de l'ADN causées par les agents alkylants(151, 152). Le talazoparib inhibe la réparation par excision de base des lésions monobrins causées par les adduits entre l'ADN et les complexes réactifs de platine, engendrant des dommages double-brins. De plus les inhibiteurs de PARP entraînent une dissociation entre les lésions d'ADN causées par les sels de platine et les protéines de réparation (incluant PARP1)(152).

Chez les souris MDAMB231, BRCA1/2 sont fonctionnelles donc la recombinaison homologue devrait avoir lieu pour réparer ces dommages double-brins. Cependant nous observons une sensibilité au talazoparib et au carboplatin dans nos expériences, signifiant un défaut au niveau de la recombinaison homologue des lésions double-brins générées pouvant être dû à des mutations somatiques dans d'autres gènes.

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les combinaisons A et B, mais plutôt une simple tendance de la combinaison A vers une meilleure inhibition tumorale. Donc, nos résultats suggèrent que le pré-traitement avec le carboplatin (i.e., combinaison B) n'est pas plus efficace que la combinaison simultanée (i.e., combinaison A). Dans la combinaison A, les souris reçoivent du talazoparib avant de recevoir le carboplatin le jour 3. Le jour 3 le talazoparib est donné simultanément au carboplatin. Il se pourrait que le talazoparib donné avant le carboplatin sensibilise davantage les tumeurs en empêchant dès le départ la réparation par excision de base d'avoir lieu. Ainsi, lorsque le carboplatin est administré et cause des lésions monobrins par des adduits entre l'ADN et les complexes réactifs de platine, ces lésions s'accumuleraient et causeraient davantage de lésions double-brins.

Le carboplatin était ainsi administré dans un contexte où la machinerie qui répare les lésions qu'il allait causer était d'ores déjà non fonctionnelle dans la combinaison A. En effet, le talazoparib inhibait l'activité de PARP1/2 et le recrutement de protéines de réparation durant 48h avant l'administration du carboplatin. Cela expliquerait la tendance observée vers une plus grande efficacité de la combinaison A. Afin de détecter une différence entre les combinaisons, il sera nécessaire d'augmenter le nombre de souris dans chaque groupe et d'équilibrer le nombre de souris par groupe.

Dans la combinaison C, nous avons observé une inefficacité du traitement. Cela est probablement dû à un délai trop important entre le carboplatin et le talazoparib, empêchant l'action synergique des deux agents. Durant ce délai, les lésions monobrins engendrées par le carboplatin ont probablement pu être réparées par excision de base. Les cellules tumorales n'avaient donc pas à réparer de multiples lésions double-brins. Cela a probablement permis à la maladie de progresser.

Les tumeurs n'ont pas pu être éradiquées avec notre régime de traitement. Ce n'était pas notre objectif dans cette étude étant donné la faible durée de traitement pour laquelle nous avons opté. Il en fut ainsi également dans l'expérience de Shen et al.(136). Il serait intéressant d'évaluer l'effet d'un traitement plus long et de doses répétées sur la toxicité et sur la croissance tumorale. Shen et al. ont obtenu une réponse complète (i.e., absence de tumeur palpable) chez des xénogreffes MX-1 en administrant le talazoparib en monothérapie oralement deux fois par jour plutôt qu'une fois par jour à la même dose journalière de 0.33 mg/kg. Huit semaines après la fin des traitements, les souris avaient toujours une réponse complète. Néanmoins, Rottenberg et al. n'ont pas obtenu de réponse complète avec la combinaison d'olaparib et de sels de platine même avec un traitement de 100 jours et des doses largement supérieures pour les deux thérapies(154). Dans cette étude le talazoparib était administré une fois par jour.

La lignée HCC1806 nous a permis d'obtenir une ébauche de résultats avec un faible nombre d'animaux par groupe. Vu le faible nombre de souris, aucune conclusion définitive ne peut en être tirée. Ces résultats sont à valider dans une plus grande cohorte.

2.2.2. Développement de métastases

Les données obtenues au niveau de la tumeur primaire corrélaient avec celles des métastases pulmonaires. Une inhibition tumorale est présente chez tous les groupes de combinaison sans différence statistiquement significative entre les combinaisons A, B et C (**Figure 32**). Par rapport au groupe contrôle, les combinaisons A et B avaient les plus faibles proportions de métastases pulmonaires. La combinaison A ayant la proportion de métastases la plus faible.

L'étude EMBRACA démontre une efficacité du talazoparib sur les métastases en combinaison avec la chimiothérapie chez des tumeurs BRCA-muté au niveau germinale(131). Cela suggère une efficacité du talazoparib sur les métastases en cancer du sein BRCA non-muté également. Par ailleurs, les inhibiteurs de PARP ont montré des propriétés anti-angiogéniques, en plus de la régulation à la baisse de Snail1 et Vimentin1 dans les cellules endothéliales et tumorales. L'inhibition des métastases par les PARPi a été identifiée *in vivo* dans un modèle de mélanome(160). En outre, des défauts dans les gènes de réparation de l'ADN dans les métastases

à distance ont également été identifiés en cancer du sein ce qui suggère une efficacité de la thérapie anti-PARP dans l'inhibition des métastases à distance(35, 161).

Aucune des études précliniques citées au **tableau 23** n'a évalué l'envahissement métastatique. Les essais cliniques randomisés en cancer du sein ont démontré une efficacité des inhibiteurs de PARP chez les patientes BRCA-muté présentant des métastases à distance en combinaison avec la chimiothérapie standard(132, 133). Nos données ouvrent la voie pour des études chez les tumeurs BRCA non-muté dans le contexte métastatique.

En cancer de l'ovaire métastatique, l'addition d'olaparib à la chimiothérapie et à un traitement anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) a démontré une amélioration de la survie sans progression chez les patientes ayant une mutation BRCA somatique au sein de la tumeur (HR = 0.31, IC95% : 0.20-0.47) ainsi que celles dont la tumeur avait un déficit de recombinaison homologue (HR = 0.33, IC95% : 0.25-0.45)(193). Cette efficacité de l'olaparib chez les tumeurs ayant un déficit de recombinaison homologue ou une mutation somatique BRCA reste à être clarifiée en cancer du sein triple-négatif. En cancer de l'ovaire, l'olaparib est devenu le premier inhibiteur de PARP approuvé par l'Agence Européenne des Médicaments en monothérapie pour les tumeurs ayant une mutation somatique BRCA sans mutation germinale(35). La variabilité importante et la grande hétérogénéité du CSTN ajoutent un degré de complexité par rapport aux autres tumeurs solides.

Nos résultats fournissent également un aperçu intéressant sur l'effet du talazoparib en monothérapie sur les métastases. Dans la littérature actuelle, les inhibiteurs de PARP sont administrés après plusieurs lignes de chimiothérapie et en combinaison avec celle-ci. L'effet isolé des inhibiteurs de PARP sur le développement de métastases chez des sujets naïfs de toute chimiothérapie est méconnu. Cela pourrait être étudié avec un régime plus long et une administration deux fois par jour. Dans notre étude, nous avons objectivé des résultats mitigés (**Figures 32 et 33**).

Nous avons évalué la méthode l'instillation de formaldéhyde dans les poumons afin de dilater les alvéoles et de détecter les métastases(194). Cependant, nous n'avons pas obtenu de différence au niveau de la quantification des métastases. De plus, les prélèvements sanguins ne pouvaient

pas être réalisés de manière optimale sur le plan technique. Cette méthode pourrait être intéressante lorsque la quantification des métastases se fait de manière automatisée et lorsqu'une analyse sanguine n'est pas requise.

2.2.3. Toxicité

Nous avons observé des résultats mitigés dans les différentes cohortes MDAMB231 et HCC1806. Pourtant, les souris ont été randomisées afin d'avoir un poids homogène en début de traitement dans les différents groupes. Une toxicité sur le poids plus marquée a été observée chez les souris traitées avec les combinaisons comparativement au groupe contrôle (**Figures 35, 38 et 43**). Le talazoparib en monothérapie a une toxicité majoritairement inférieure aux combinaisons de traitement.

La dose de talazoparib administrée (0.33 mg/kg) combinée avec le cisplatine était associée à une perte de poids maximale de 6%, contrairement à 11% avec une dose plus élevée (1 mg/kg) selon Shen et al.(136). En combinaison avec le carboplatine, aucune perte de poids significative ne fut observée(136). Nos résultats sont similaires à ce qui fut obtenu avec le cisplatine par Shen et al., nous avons noté une perte de poids maximale de 4.7%. En termes de létalité, nos résultats sont concordants avec ceux de Shen et al., nous n'avons eu qu'un seul décès (i.e., une souris retrouvée décédée en fin d'expérience dans le groupe combinaison A). Rottenberg et al. ainsi que Clark et al. n'ont pas évalué la perte de poids(154, 156).

La toxicité hématologique est la plus fréquente avec l'administration des inhibiteurs de PARP et du carboplatine, simultanément ou séquentiellement(153, 158). Dans notre étude, la toxicité hématologique sur les leucocytes et les plaquettes fut moindre chez la combinaison C (**Figures 36 A et C**). Aucune différence significative ne fut observée au niveau de la toxicité hématologique entre les trois combinaisons A, B et C. Néanmoins, nous avons démontré une tendance à une réduction de la toxicité hématologique en instaurant un délai d'administration entre le carboplatine et le talazoparib (**Figures 36.A et C**). La combinaison B avait une tendance vers une moindre toxicité que la combinaison A. Cela est en faveur de notre hypothèse selon laquelle le prétraitement avec le carboplatine diminue la toxicité du talazoparib. Afin d'investiguer cela davantage chez les xénogreffes, une quantification de la concentration intracellulaire de

talazoparib dans les cellules tumorales pourrait être effectuée. De plus, l'expérience devrait être répétée dans une plus grande cohorte afin d'évaluer la présence d'une différence statistiquement significative. Cela serait important car nous avons noté une variabilité dans nos résultats hématologiques. Il resterait également à évaluer l'effet des différentes séquences de traitement sur le taux de neutrophiles.

2.3. Conclusion

En conclusion, notre signature génétique de 63 gènes n'est pas associée aux principales variables clinicopathologiques étudiées, suggérant une indépendance de ce biomarqueur à valider dans une plus large cohorte avec une analyse multivariée. Le sous-groupe intrinsèque luminal B comprend davantage de patientes avec des mutations dans les gènes de la signature par rapport au sous-groupe luminal A. Les patientes lumineuses B présentant des mutations ont démontré un taux de survie spécifique au cancer du sein plus faible que celles sans mutations. Les tumeurs primaires post chimiothérapie néoadjuvante, les tumeurs récidivant loco-régionalement et les métastases comprennent une proportion d'échantillons mutés plus élevée que les tumeurs primaires non traitées. De tous les sites métastatiques, les métastases cérébrales ont présenté la proportion d'échantillons mutés la plus élevée. Cela démontre que la proportion de patientes ou d'échantillons avec des mutations de la signature génétique est plus élevée parmi les tumeurs agressives, probablement en lien avec une instabilité génomique engendrée par les mutations.

L'administration simultanée du talazoparib et du carboplatin a démontré une tendance vers une meilleure inhibition tumorale primaire et métastatique dans des xénogreffes orthotopiques BRCA non-muté. Le pré-traitement avec le talazoparib pendant 2 jours, suivi de l'administration simultanée du talazoparib et du carboplatin le jour 3, démontre une tendance vers une meilleure efficacité par rapport à l'administration séquentielle du carboplatin 24h avant le talazoparib. Au niveau mécanistique, l'explication proposée est que quand PARP est inhibé durant 48h avant d'administrer le carboplatin, les lésions monobrins causées par les complexes réactifs de platine n'ont pas le temps d'être réparées et s'accumuleraient. La réparation de ces lésions par excision de base est d'ores et déjà inhibée par le PARPi, générant davantage de lésions double-brins. Dans des tumeurs où la recombinaison homologe ne se fait pas efficacement, cela peut mener à une

instabilité génomique et à la mort cellulaire. Cependant, lorsqu'un délai de temps est instauré entre le carboplatin en premier et le talazoparib en second, les lésions monobrans causées par les complexes réactifs de platine ont le temps d'être réparées avant que le talazoparib inhibe PARP. Cette proposition mécanistique pourrait faire l'objet d'études subséquentes. De plus, l'administration séquentielle du carboplatin 24h avant celle du talazoparib est associée à une tendance vers une moindre toxicité, avec une perte de poids plus faible et de plus hauts taux de leucocytes et de plaquettes que la combinaison simultanée. Étant donné qu'aucune différence significative ne fut décelée entre chacune des combinaisons A, B et C, ces résultats devront être validés dans une plus grande cohorte.

Références bibliographiques

1. Cancer WHOIAfRo. The Global Cancer Observatory. Press release # 263 France2018 [Available from: <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf?ua=1>.
2. Statistics CCSsACoC. Canadian Cancer Statistics 2017 Toronto, ON: Canadian Cancer Society; 2017 [Available from: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/breast/statistics/?region=on#ixzz4uyInNbp2>.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7-34.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30.
6. Brunnicardi FC AD, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, Pollock RE. Schwartz's Principles of Surgery: McGraw-Hill Education; 2015 [cited 2020].
7. Han X, Stevens J, Truesdale KP, Bradshaw PT, Kucharska-Newton A, Prizment AE, et al. Body mass index at early adulthood, subsequent weight change and cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*. 2014;135(12):2900-9.
8. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K, et al. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 2016;375(8):794-8.
9. Keum N, Greenwood DC, Lee DH, Kim R, Aune D, Ju W, et al. Adult weight gain and adiposity-related cancers: a dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(3).
10. Alsaker MD, Janszky I, Opdahl S, Vatten LJ, Romundstad PR. Weight change in adulthood and risk of postmenopausal breast cancer: the HUNT study of Norway. *Br J Cancer*. 2013;109(5):1310-7.
11. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam A, Dorgan JF, Longcope C, et al. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(16):1218-26.
12. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Travis RC, Brinton LA, Helzlsouer KJ, et al. Steroid hormone measurements from different types of assays in relation to body mass index and breast cancer risk in postmenopausal women: Reanalysis of eighteen prospective studies. *Steroids*. 2015;99(Pt A):49-55.
13. Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE. Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(24):1856-65.
14. Farhat GN, Cummings SR, Chlebowski RT, Parimi N, Cauley JA, Rohan TE, et al. Sex hormone levels and risks of estrogen receptor-negative and estrogen receptor-positive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(7):562-70.
15. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 2001;344(4):276-85.
16. McCormack VA, dos Santos Silva I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(6):1159-69.

17. Ritte R, Lukanova A, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Mesrine S, et al. Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: a cohort study. *Int J Cancer*. 2013;132(11):2619-29.
18. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*. 2012;13(11):1141-51.
19. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 1994;139(8):819-35.
20. Tseng M, Weinberg CR, Umbach DM, Longnecker MP. Calculation of population attributable risk for alcohol and breast cancer (United States). *Cancer Causes Control*. 1999;10(2):119-23.
21. Schutze M, Boeing H, Pischon T, Rehm J, Kehoe T, Gmel G, et al. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. *BMJ*. 2011;342:d1584.
22. Mezzetti M, La Vecchia C, Decarli A, Boyle P, Talamini R, Franceschi S. Population attributable risk for breast cancer: diet, nutrition, and physical exercise. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(5):389-94.
23. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer*. 2015;112(3):580-93.
24. Chen WY, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA*. 2011;306(17):1884-90.
25. White AJ, DeRoo LA, Weinberg CR, Sandler DP. Lifetime Alcohol Intake, Binge Drinking Behaviors, and Breast Cancer Risk. *Am J Epidemiol*. 2017;186(5):541-9.
26. Gaudet MM, Carter BD, Brinton LA, Falk RT, Gram IT, Luo J, et al. Pooled analysis of active cigarette smoking and invasive breast cancer risk in 14 cohort studies. *Int J Epidemiol*. 2017;46(3):881-93.
27. Johnson KC, Miller AB, Collishaw NE, Palmer JR, Hammond SK, Salmon AG, et al. Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). *Tob Control*. 2011;20(1):e2.
28. Hansen J, Stevens RG. Case-control study of shift-work and breast cancer risk in Danish nurses: impact of shift systems. *Eur J Cancer*. 2012;48(11):1722-9.
29. Wang F, Yeung KL, Chan WC, Kwok CC, Leung SL, Wu C, et al. A meta-analysis on dose-response relationship between night shift work and the risk of breast cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(11):2724-32.
30. Pukkala E, Kesminiene A, Poliakov S, Ryzhov A, Drozdovitch V, Kovgan L, et al. Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident. *Int J Cancer*. 2006;119(3):651-8.
31. Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, Hudson MM, Meadows AT, Neglia JP, et al. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Ann Intern Med*. 2010;152(7):444-55; W144-54.
32. Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, et al. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(13):1460-8.

33. Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. *Science*. 2014;343(6178):1466-70.
34. Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell*. 1999;4(4):511-8.
35. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(2):110-20.
36. Kumar V AA, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Eighth ed. W S, editor. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
37. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 2017;317(23):2402-16.
38. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet*. 1996;14(2):185-7.
39. Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*. 2000;408(6811):429-32.
40. Morrow M, Schnitt SJ, Norton L. Current management of lesions associated with an increased risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(4):227-38.
41. Degnim AC, Visscher DW, Berman HK, Frost MH, Sellers TA, Vierkant RA, et al. Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. *J Clin Oncol*. 2007;25(19):2671-7.
42. Page DL, Kidd TE, Jr., Dupont WD, Simpson JF, Rogers LW. Lobular neoplasia of the breast: higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease. *Hum Pathol*. 1991;22(12):1232-9.
43. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Hodi Z, Lee AH, Reis-Filho JS, Ellis IO. High frequency of coexistence of columnar cell lesions, lobular neoplasia, and low grade ductal carcinoma in situ with invasive tubular carcinoma and invasive lobular carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(3):417-26.
44. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchio C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. *Histopathology*. 2010;57(2):171-92.
45. Allred DC. Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2010;2010(41):134-8.
46. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93(9):1046-52.
47. 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. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology*. 2002;41(3A):151-2, discussion 2-3.
48. Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F, et al. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*. 1996;13(9):1919-25.
49. Allred DC, Carlson RW, Berry DA, Burstein HJ, Edge SB, Goldstein LJ, et al. NCCN Task Force Report: Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer by Immunohistochemistry. *J Natl Compr Canc Netw*. 2009;7 Suppl 6:S1-S21; quiz S2-3.

50. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, Anbazhagan R, et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1992;10(7):1049-56.
51. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical practice guidelines in oncology. Breast Cancer, Version 3.2018, https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf 2018 2019/03/03.
52. 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*. 2008;26(35):5697-704.
53. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;63(1):181-7.
54. 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;19(5):403-10.
55. AJCC. AJCC Cancer Staging Form Supplement to the AJCC Cancer Staging Manual 2018.
56. Aleskandarany MA, Sonbul SN, Mukherjee A, Rakha EA. Molecular Mechanisms Underlying Lymphovascular Invasion in Invasive Breast Cancer. *Pathobiology*. 2015;82(3-4):113-23.
57. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1796-804.
58. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1275-81.
59. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014;384(9938):164-72.
60. (NCCN) NCCN. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast cancer treatment, Version 4.2020, <http://www.nccn.org>, May 18 2020. 2020.
61. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
62. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.
63. Perou CM, Borresen-Dale AL. Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(2).
64. Cheang MC, Martin M, Nielsen TO, Prat A, Voduc D, Rodriguez-Lescure A, et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist*. 2015;20(5):474-82.
65. 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.
66. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(6):560-9.

67. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018.
68. Sparano JA, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 2008;26(5):721-8.
69. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, et al. Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019;380(25):2395-405.
70. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(21):2005-14.
71. 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;351(27):2817-26.
72. Henry NL, Somerfield MR, Abramson VG, Ismaila N, Allison KH, Anders CK, et al. Role of Patient and Disease Factors in Adjuvant Systemic Therapy Decision Making for Early-Stage, Operable Breast Cancer: Update of the ASCO Endorsement of the Cancer Care Ontario Guideline. *J Clin Oncol*. 2019;37(22):1965-77.
73. Krop I, Ismaila N, Andre F, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. 2017;35(24):2838-47.
74. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(8):717-29.
75. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
76. Cardoso F, Van't Veer L, Rutgers E, Loi S, Mook S, Piccart-Gebhart MJ. Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *J Clin Oncol*. 2008;26(5):729-35.
77. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(25):1999-2009.
78. 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;98(17):1183-92.
79. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res*. 2011;17(18):6012-20.
80. Dubsy P, Brase JC, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, et al. The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2013;109(12):2959-64.
81. Denkert C, Kronenwett R, Schlake W, Bohmann K, Penzel R, Weber KE, et al. Decentral gene expression analysis for ER+/Her2- breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay. *Virchows Arch*. 2012;460(3):251-9.
82. Muller BM, Brase JC, Haufe F, Weber KE, Budzies J, Petry C, et al. Comparison of the RNA-based EndoPredict multigene test between core biopsies and corresponding surgical breast cancer sections. *J Clin Pathol*. 2012;65(7):660-2.

83. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*. 2004;5(6):607-16.
84. Sonnenblick A, de Azambuja E, Azim Jr HA, Piccart M. An update on PARP inhibitors[mdash]moving to the adjuvant setting. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(1):27-41.
85. Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1879-87.
86. Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, Liff JM, Flagg EW, Coates RJ, et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes Control*. 2009;20(7):1071-82.
87. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(5):1082-9.
88. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295(21):2492-502.
89. Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J*. 2009;15(6):593-602.
90. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
91. 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;121(7):2750-67.
92. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008;123(1):236-40.
93. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(10):814-9.
94. Shannon C, Smith I. Is there still a role for neoadjuvant therapy in breast cancer? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;45(1):77-90.
95. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi GN, Gianni L, von Minckwitz G, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *J Clin Oncol*. 2008;26(5):814-9.
96. Mamtani A, Barrio AV, King TA, Van Zee KJ, Plitas G, Pilewskie M, et al. How Often Does Neoadjuvant Chemotherapy Avoid Axillary Dissection in Patients With Histologically Confirmed Nodal Metastases? Results of a Prospective Study. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(11):3467-74.
97. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1168-76.
98. Blum JL, Flynn PJ, Yothers G, Asmar L, Geyer CE, Jr., Jacobs SA, et al. Anthracyclines in Early Breast Cancer: The ABC Trials-USOR 06-090, NSABP B-46-I/USOR 07132, and NSABP B-49 (NRG Oncology). *J Clin Oncol*. 2017;35(23):2647-55.
99. Moro S, Beretta GL, Dal Ben D, Nitiss J, Palumbo M, Capranico G. Interaction model for anthracycline activity against DNA topoisomerase II. *Biochemistry*. 2004;43(23):7503-13.

100. Capranico G, Binaschi M, Borgnetto ME, Zunino F, Palumbo M. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18(9):323-9.
101. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(4):253-65.
102. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, Im YH, Lee ES, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med.* 2017;376(22):2147-59.
103. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):330-8.
104. Luengo A, Gui DY, Vander Heiden MG. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol.* 2017;24(9):1161-80.
105. Weber GF. DNA Damaging Drugs. *Molecular Therapies of Cancer.* 2014.
106. Kasper DL FA, Hauser S, et al. *Harrison principes de médecine interne.* 16ème ed. Paris. 2788 p.
107. Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.* 1986;46(4 Pt 2):1972-9.
108. Hall MD, Amjadi S, Zhang M, Beale PJ, Hambley TW. The mechanism of action of platinum(IV) complexes in ovarian cancer cell lines. *J Inorg Biochem.* 2004;98(10):1614-24.
109. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep.* 2003;10(6):1663-82.
110. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-20.
111. Sorenson CM, Eastman A. Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 1988;48(23):6703-7.
112. Coluccia M, Natile G. Trans-platinum complexes in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007;7(1):111-23.
113. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol.* 2015;33(1):13-21.
114. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(7):747-56.
115. Loibl S, O'Shaughnessy J, Untch M, Sikov WM, Rugo HS, McKee MD, et al. Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrightNess): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018;19(4):497-509.
116. O'Shaughnessy J, Schwartzberg L, Danso MA, Miller KD, Rugo HS, Neubauer M, et al. Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32(34):3840-7.

117. Perez EA, Hillman DW, Stella PJ, Krook JE, Hartmann LC, Fitch TR, et al. A phase II study of paclitaxel plus carboplatin as first-line chemotherapy for women with metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2000;88(1):124-31.
118. Fountzilias G, Kalofonos HP, Dafni U, Papadimitriou C, Bafaloukos D, Papakostas P, et al. Paclitaxel and epirubicin versus paclitaxel and carboplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced breast cancer: a phase III study conducted by the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Ann Oncol*. 2004;15(10):1517-26.
119. Yardley DA, Coleman R, Conte P, Cortes J, Brufsky A, Shtivelband M, et al. nab-Paclitaxel plus carboplatin or gemcitabine versus gemcitabine plus carboplatin as first-line treatment of patients with triple-negative metastatic breast cancer: results from the tnAcity trial. *Ann Oncol*. 2018;29(8):1763-70.
120. Tutt A, Tovey H, Cheang MCU, Kernaghan S, Kilburn L, Gazinska P, et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nat Med*. 2018;24(5):628-37.
121. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012;481(7381):287-94.
122. Krokan HE, Bjoras M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a012583.
123. Sancar A. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:43-81.
124. Hegde ML, Hazra TK, Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res*. 2008;18(1):27-47.
125. Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(2):104-20.
126. McCann KE, Hurvitz SA. Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer. *Drugs Context*. 2018;7:212540.
127. Dawicki-McKenna JM, Langelier MF, DeNizio JE, Riccio AA, Cao CD, Karch KR, et al. PARP-1 Activation Requires Local Unfolding of an Autoinhibitory Domain. *Mol Cell*. 2015;60(5):755-68.
128. Murai J, Huang S-yN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Research*. 2012;72(21):5588-99.
129. Pareja F, Geyer FC, Marchio C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer*. 2016;2:16036.
130. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*. 2017;355(6330):1152-8.
131. Gomez LCM, Kondratova M, Ravel JM, Barillot E, Zinovyev A, Kuperstein I. Application of Atlas of Cancer Signalling Network in preclinical studies. *Brief Bioinform*. 2019;20(2):701-16.
132. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(6):523-33.
133. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Goncalves A, Lee KH, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2018;379(8):753-63.
134. Brower V. PARP Inhibitors Are Improving the Outlook of Hard-to-Treat Cancers. The scientist [Internet]. 2018. Available from: <https://www.the-scientist.com/bio-business/parp-inhibitors-are-improving-the-outlook-of-hard-to-treat-cancers-29870>.
135. Brown JS, Kaye SB, Yap TA. PARP inhibitors: the race is on. *Br J Cancer*. 2016;114(7):713-5.

136. Shen Y, Rehman FL, Feng Y, Boshuizen J, Bajrami I, Elliott R, et al. BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. *Clin Cancer Res.* 2013;19(18):5003-15.
137. Murai J, Huang S-YN, Renaud A, Zhang Y, Ji J, Takeda S, et al. Stereospecific PARP Trapping by BMN 673 and Comparison with Olaparib and Rucaparib. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2014;13(2):433-43.
138. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 2005;434(7035):917-21.
139. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med.* 2009;361(2):123-34.
140. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010;376(9737):235-44.
141. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010;376(9737):245-51.
142. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.
143. Ashworth A, Lord CJ. Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors? *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(9):564-76.
144. Evans KW, Yuca E, Akcakanat A, Scott SM, Arango NP, Zheng X, et al. A Population of Heterogeneous Breast Cancer Patient-Derived Xenografts Demonstrate Broad Activity of PARP Inhibitor in BRCA1/2 Wild-Type Tumors. *Clin Cancer Res.* 2017;23(21):6468-77.
145. Bruna A, Rueda OM, Greenwood W, Batra AS, Callari M, Batra RN, et al. A Biobank of Breast Cancer Explants with Preserved Intra-tumor Heterogeneity to Screen Anticancer Compounds. *Cell.* 2016;167(1):260-74 e22.
146. Hassan S, Esch A, Liby T, Gray JW, Heiser LM. Pathway-Enriched Gene Signature Associated with 53BP1 Response to PARP Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(12):2892-901.
147. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, et al. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol.* 2011;12(9):852-61.
148. Rugo HS, Olopade OI, DeMichele A, Yau C, van 't Veer LJ, Buxton MB, et al. Adaptive Randomization of Veliparib-Carboplatin Treatment in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(1):23-34.
149. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):7-18.
150. Beniey M, Haque T, Hassan S. Translating the role of PARP inhibitors in triple-negative breast cancer. *Oncoscience.* 2019;6(1-2):287-8.
151. Zhu G, Chang P, Lippard SJ. Recognition of platinum-DNA damage by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry.* 2010;49(29):6177-83.

152. Guggenheim ER, Ondrus AE, Movassaghi M, Lippard SJ. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity facilitates the dissociation of nuclear proteins from platinum-modified DNA. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(23):10121-8.
153. Lee JM, Peer CJ, Yu M, Amable L, Gordon N, Annunziata CM, et al. Sequence-Specific Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Phase I/Ib Study of Olaparib Tablets and Carboplatin in Women's Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(6):1397-406.
154. Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, et al. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(44):17079-84.
155. Evers B, Drost R, Schut E, de Bruin M, van der Burg E, Derksen PW, et al. Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin. *Clin Cancer Res*. 2008;14(12):3916-25.
156. Clark CC, Weitzel JN, O'Connor TR. Enhancement of synthetic lethality via combinations of ABT-888, a PARP inhibitor, and carboplatin in vitro and in vivo using BRCA1 and BRCA2 isogenic models. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(9):1948-58.
157. Donawho CK, Luo Y, Luo Y, Penning TD, Bauch JL, Bouska JJ, et al. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res*. 2007;13(9):2728-37.
158. Dhawan MS, Aggarwal R, Bartelink I, Leng J, Thomas S, Pawlowska N, et al. Abstract CT051: Carboplatin and talazoparib combination therapy results in differential efficacy and hematologic toxicity in BRCA-mutated patients. *Cancer Research*. 2016;76(14 Supplement):CT051-CT.
159. Rottenberg S. The study of PARPi resistance using genetically engineered mouse models for BRCA1/2-mutated breast cancer. *AACR*; Washington, DC2017.
160. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6(269):pl1.
161. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401-4.
162. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, Wilkerson MD, Rhie SK, Pastore A, et al. Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell*. 2015;163(2):506-19.
163. AJCC. American Joint Committee on Cancer cancer staging manual: Springer; 2010. Available from: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC%207th%20Ed%20Cancer%20Staging%20Manual.pdf>.
164. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346-52.
165. Razavi P, Chang MT, Xu G, Bandlamudi C, Ross DS, Vasan N, et al. The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers. *Cancer Cell*. 2018;34(3):427-38 e6.
166. Iorns E, Drews-Elger K, Ward TM, Dean S, Clarke J, Berry D, et al. A new mouse model for the study of human breast cancer metastasis. *PLoS One*. 2012;7(10):e47995.
167. Kumar S, Wilkes DW, Samuel N, Blanco MA, Nayak A, Alicea-Torres K, et al. DeltaNp63-driven recruitment of myeloid-derived suppressor cells promotes metastasis in triple-negative breast cancer. *J Clin Invest*. 2018;128(11):5095-109.

168. Yao H, Veine DM, Livant DL. Therapeutic inhibition of breast cancer bone metastasis progression and lung colonization: breaking the vicious cycle by targeting alpha5beta1 integrin. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157(3):489-501.
169. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 1974;53(3):661-74.
170. Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.* 1978;14(11):911-5.
171. Gazdar AF, Kurvari V, Virmani A, Gollahon L, Sakaguchi M, Westerfield M, et al. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer.* 1998;78(6):766-74.
172. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006;10(6):515-27.
173. Hoffmeyer MR, Wall KM, Dharmawardhane SF. In vitro analysis of the invasive phenotype of SUM 149, an inflammatory breast cancer cell line. *Cancer Cell Int.* 2005;5(1):11.
174. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis.* 2010;32(1-2):35-48.
175. 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.* 2010;12(5):R68.
176. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):25-35.
177. Hassan S, Buchanan M, Jahan K, Aguilar-Mahecha A, Gaboury L, Muller WJ, et al. CXCR4 peptide antagonist inhibits primary breast tumor growth, metastasis and enhances the efficacy of anti-VEGF treatment or docetaxel in a transgenic mouse model. *Int J Cancer.* 2011;129(1):225-32.
178. Hather G, Liu R, Bandi S, Mettetal J, Manfredi M, Shyu WC, et al. Growth rate analysis and efficient experimental design for tumor xenograft studies. *Cancer Inform.* 2014;13(Suppl 4):65-72.
179. Gupta SK, Smith EJ, Mladek AC, Tian S, Decker PA, Kizilbash SH, et al. PARP Inhibitors for Sensitization of Alkylating Chemotherapy in Glioblastoma: Impact of Blood-Brain Barrier and Molecular Heterogeneity. *Front Oncol.* 2018;8:670.
180. Garber H, Raghavendra AS, Hess KR, Arun B, Ibrahim NK. Brain metastasis in patients with hereditary BRCA-mutated invasive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2019;37(15_suppl):1074-.
181. Sun K, Mikule K, Wang Z, Poon G, Vaidyanathan A, Smith G, et al. A comparative pharmacokinetic study of PARP inhibitors demonstrates favorable properties for niraparib efficacy in preclinical tumor models. *Oncotarget.* 2018;9(98):37080-96.
182. Kizilbash SH, Gupta SK, Chang K, Kawashima R, Parrish KE, Carlson BL, et al. Restricted Delivery of Talazoparib Across the Blood-Brain Barrier Limits the Sensitizing Effects of PARP Inhibition on Temozolomide Therapy in Glioblastoma. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(12):2735-46.

183. Parrish KE, Cen L, Murray J, Calligaris D, Kizilbash S, Mittapalli RK, et al. Efficacy of PARP Inhibitor Rucaparib in Orthotopic Glioblastoma Xenografts Is Limited by Ineffective Drug Penetration into the Central Nervous System. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(12):2735-43.
184. Inno A, Di Noia V, D'Argento E, Modena A, Gori S. State of the art of chemotherapy for the treatment of central nervous system metastases from non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(6):599-609.
185. Zimmermann M, Murina O, Reijns MAM, Agathangelou A, Challis R, Tarnauskaite Z, et al. CRISPR screens identify genomic ribonucleotides as a source of PARP-trapping lesions. *Nature*. 2018;559(7713):285-9.
186. De P, Sun Y, Carlson JH, Friedman LS, Leyland-Jones BR, Dey N. Doubling down on the PI3K-AKT-mTOR pathway enhances the antitumor efficacy of PARP inhibitor in triple negative breast cancer model beyond BRCA-ness. *Neoplasia*. 2014;16(1):43-72.
187. Yang Y, Yang HH, Hu Y, Watson PH, Liu H, Geiger TR, et al. Immunocompetent mouse allograft models for development of therapies to target breast cancer metastasis. *Oncotarget*. 2017;8(19):30621-43.
188. Navas T, Pfister TD, Colantonio S, Aziz A, Dieckman L, Saul RG, et al. Novel antibody reagents for characterization of drug- and tumor microenvironment-induced changes in epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199361.
189. Deng X, Apple S, Zhao H, Song J, Lee M, Luo W, et al. CD24 Expression and differential resistance to chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(24):38294-308.
190. Martin JL, Julovi SM, Lin MZ, de Silva HC, Boyle FM, Baxter RC. Inhibition of basal-like breast cancer growth by FTY720 in combination with epidermal growth factor receptor kinase blockade. *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):90.
191. Volk-Draper LD, Rajput S, Hall KL, Wilber A, Ran S. Novel model for basaloid triple-negative breast cancer: behavior in vivo and response to therapy. *Neoplasia*. 2012;14(10):926-42.
192. Iqbal A, Syed MA, Haque MM, Najmi AK, Ali J, Haque SE. Effect of nerolidol on cyclophosphamide-induced bone marrow and hematologic toxicity in Swiss albino mice. *Exp Hematol*. 2020;82:24-32.
193. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Perol D, Gonzalez-Martin A, Berger R, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(25):2416-28.
194. Limjunyawong N, Mock J, Mitzner W. Instillation and Fixation Methods Useful in Mouse Lung Cancer Research. *J Vis Exp*. 2015(102):e52964.

