



HAL
open science

Facteurs prédictifs et pronostiques dans les cancers du sein de phénotype luminal HER2 négatif traités par chimiothérapie néo-adjuvante

Chloé Delfour

► **To cite this version:**

Chloé Delfour. Facteurs prédictifs et pronostiques dans les cancers du sein de phénotype luminal HER2 négatif traités par chimiothérapie néo-adjuvante. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03011576

HAL Id: dumas-03011576

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03011576>

Submitted on 18 Nov 2020

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

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

**Thèse pour l'obtention du
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**
Discipline : Anatomie et Cytologie Pathologiques

Présentée et soutenue publiquement le 8 Octobre 2020 par

Chloé, Bénédicte DELFOUR
Née le 01 Avril 1991 à Bordeaux (33)

**FACTEURS PRÉDICTIONNELS ET PRONOSTIQUES DANS LES CANCERS DU SEIN DE PHÉNOTYPE
LUMINAL HER2 NÉGATIF TRAITÉS PAR CHIMIOTHÉRAPIE NÉO-ADJUVANTE**

Analyse clinique, morphologique et immunohistochimique d'une série de 221 cas

Directeur de Thèse :

Monsieur le Docteur Gaëtan MAC GROGAN

Rapporteur :

Madame le Professeur Marie-Laure MARTIN-NÉGRIER

Membres du jury :

| | |
|---|--------------------|
| Madame le Professeur Béatrice VERGIER | Présidente du Jury |
| Madame le Docteur Marie-Cécile PARRENS | Membre du Jury |
| Madame le Docteur Christine TUNON DE LARA | Membre du Jury |
| Madame le Docteur Alix COULON | Membre du Jury |
| Monsieur le Docteur Marc DEBLED | Membre du Jury |
| Monsieur le Professeur Hervé BONNEFOI | Membre du Jury |

A mon juge et présidente du jury,

Madame le Professeur Béatrice Vergier,
Professeur des Universités,
Praticien Hospitalier,
Département de Pathologie,
Hôpital Haut-Lévêque, Centre Hospitalo-Universitaire de Bordeaux

Chère Béatrice,

Vous me faites un grand plaisir en acceptant de présider ma soutenance de thèse. Je vous remercie pour toute l'attention que vous portez à la qualité de formation des internes. Ce fut très enrichissant d'apprendre et de travailler avec une experte en dermatopathologie comme vous.
Veuillez recevoir le témoignage de toute ma reconnaissance.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Gaëtan Mac Grogan
Praticien Hospitalier
Coordonnateur du Département de Biopathologie
Institut Bergonié, Centre Régional de Lutte contre le Cancer

Cher Gaëtan,

Je suis très heureuse de présenter notre étude aujourd'hui. Je te remercie de m'avoir proposé de travailler avec toi, ce fut un plaisir, je savais que ce serait un travail de qualité et que je serai bien encadrée. Merci d'avoir été un directeur très présent.

Je te remercie également pour la qualité de ta formation en pathologie mammaire.

Je tiens à te témoigner mon profond respect et toute mon amitié.

A mon juge,

Madame le Docteur Marie-Cécile Parrens,
Maître de Conférence des Universités,
Praticien Hospitalier,
Département de Pathologie,
Hôpital Haut-Lévêque, Centre Hospitalo-Universitaire de Bordeaux

Chère Marie,

Je suis très honorée que vous ayez accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises en hématopathologie, vous savez transmettre votre savoir de manière claire et intéressante.
Croyez en l'expression de mon profond respect et de ma sincère gratitude.

A mon juge,

Madame le Docteur Christine Tunon de Lara
Praticien Hospitalier,
Institut Bergonié, Centre Régional de Lutte contre le Cancer

Chère Madame Tunon de Lara,

Vous me faites un grand honneur en acceptant de faire partie de mon jury de thèse. Je vous en remercie vivement. Veuillez recevoir le témoignage de tout mon respect et de toute ma reconnaissance.

A mon juge,

Madame le Docteur Alix Coulon
Ancien chef de clinique du CHU de Poitiers,
Institut d'histo-cyto-pathologie, IHCP Unilabs, Bruges

Chère Alix,

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail de thèse, j'espère qu'il t'intéressera.
Merci d'avoir contribué à cette étude. Je te remercie également de m'avoir aidé à désarchiver le matériel, tu m'as été d'une grande aide. Je tiens également à te remercier pour l'accueil que j'ai eu pendant mes quelques replacements à Unilabs. Ce fut un plaisir de travailler dans votre équipe.
Crois en l'expression de ma sincère gratitude.

A mon juge,

Monsieur le Docteur Marc Debled
Praticien Hospitalier,
Institut Bergonié, Centre Régional de Lutte contre le Cancer

Cher Marc,

Je vous remercie de juger ce travail de thèse et d'être à l'initiative de ce projet, j'espère qu'il répondra à vos attentes. J'ai apprécié avoir votre point de vue d'oncologue, donnant un sens clinique à cette thèse et montrant la collaboration étroite entre oncologues et pathologistes.

Je tiens à vous exprimer tout mon respect et ma sincère gratitude.

A mon juge,

Monsieur le Professeur Hervé Bonnefoi,
Professeur des Universités,
Praticien Hospitalier,
Université de Bordeaux,
Institut Bergonié, Centre Régional de Lutte contre le Cancer

Cher Monsieur Bonnefoi,

C'est un honneur que vous me faites en ayant accepté d'être membre de mon jury de thèse. J'espère que ce travail vous intéressera.
Croyez en l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A mon rapporteur,

Madame le Pr Marie-Laure Martin Négrier,
Professeur des Universités,
Praticien Hospitalier,
Département de Pathologie,
Hôpital Pellegrin, Centre Hospitalo-Universitaire de Bordeaux

Chère Marie-Laure,

Je vous remercie d'avoir accepté de relire et de rapporter ce travail de thèse. Je vous remercie également pour votre formation en pathologie maxillo-faciale. Veuillez croire en l'expression de ma sincère reconnaissance.

Après un an de travail assez intense, il est l'heure de soutenir ce travail de thèse qui finalise 5 années d'internat mais également ces années d'étude en médecine. Je tiens donc à remercier ma famille, mes amis et tous les pathologistes.

Merci à tous les pathologistes de Bergonié, Mr Coindre, Sabrina, Houda, Florence, François, Raoul, Benjamin, Isabelle et Emmanuel. Merci pour la grande qualité de formation donnée aux internes. Ce fut un grand plaisir de travailler avec chacun de vous.

Merci à tous les pathologistes de Haut-Lévêque, Marion, Hélène, Geneviève, Hugues, Marie-Laure, Annick, Elodie, Sarah et Marie J. Merci pour toutes ces séances de lames organisées le midi ou le matin à 8h, qui nous ont permis de bien progresser. Merci pour votre disponibilité et pour la qualité de votre enseignement. J'ai été ravie de vous rencontrer et de faire ma dernière année parmi vous.

Merci à l'équipe de Pellegrin, Mokrane, Anne, Claire, Brigitte, Skander, Guillaume et Fanny pour votre sympathie et la formation que vous donnez aux internes.

Merci à l'équipe de Pau, Valérie, Sophie et Marty pour ces deux semestres très formateurs en pathologie générale et pour votre grande gentillesse.

Merci aux radiologues de Périgueux, Aude Magontier, Georges Muret et Marion Van Vliet qui m'ont appris les bases de la radiologie. Merci à Aude pour avoir compris que travailler le vendredi matin, c'est compliqué quand on vit à l'internat.

Merci à Valérie Velasco pour ta disponibilité et ta redoutable efficacité pour couper un maximum de bloc en un minimum de temps. Grâce à toi, j'ai pu faire ma thèse en moins de 1 an, ce qui n'était pas gagné d'avance.

Merci à Gislaine qui a également été mise à contribution pour cette thèse.

Je suis très contente de vous avoir rencontrées toutes les deux et j'espère qu'on continuera à se voir.

Merci à toute l'équipe de techniciens, aides laboratoires et secrétaires de Bergonié, d'anapath et de biologie moléculaire, avec laquelle j'ai passé un an et demi de stage très agréable.

Merci à toute l'équipe de techniciens, aides laboratoires et secrétaires de Haut-Lévêque avec laquelle j'ai travaillé cette dernière année d'internat. Ce fut un plaisir de travailler avec vous, une équipe très sympa, disponible, efficace et gourmande.

Merci à toute l'équipe de techniciens, aides laboratoires et secrétaires du CH de Pau avec laquelle j'ai passé de très bons moments autour de nombreux cafés.

Merci à toute l'équipe de techniciens et aides laboratoires de Pellegrin.

Merci à toute l'équipe de radiologie du CH de Périgueux avec laquelle j'ai eu un grand plaisir à travailler.

Merci aux pathologistes d'Unilabs, Camille, Alix, Pierre, Catherine, Henri-Pierre, Anabelle et Olivier qui m'ont permis de faire mes premiers remplacements dans une équipe très sympa. Camille je te remercie plus particulièrement de m'avoir « forcé » à remplacer, j'aurai repoussé ce moment pendant longtemps...

Benjamin B., sans toi, les stages à Bergo n'auraient pas eu le même goût. Merci pour nos grandes discussions sur la vie. Allez « salut ».

Merci **Julia** pour ta bonne humeur et ton rire, merci **Aude** pour ta folie et ton fromage, merci **Paul C.** pour ces six mois de stage à Bergo, merci **Lucile** pour avoir les déguisements les plus stylés, merci **Léonie** d'être venue le dimanche à Bergonié en plein hiver, merci **Chloé C.** de me dire quels sont les plus beaux voyages à faire même si je sais que je t'inspire un peu.

Merci **Côme, Rémi** et **Mégane** pour nos soirées au Cercle ou au B***** qui finissent à 5h avec des lendemains compliqués en stage. J'attends les prochaines avec impatience !

Rémi, sans toi cette thèse n'aurait aucun style, je te remercie d'être bon en Word et en Excel. Bon après, je te remercie aussi parce que j'ai quand même bien rigolé avec toi pendant 1 an.

Mégane, j'ai beaucoup aimé passer cette dernière année d'internat avec toi, même si le master 2 nous a séparé.

Côme, merci d'être plus mal que nous les lendemains de soirée ;-).

Merci à tous mes autres co-internes **Bertrand, Sandra, Julien, Damien, Camille L., Marie, Anaïs, Mathieu, Yara, Laure-Amandine, Hugo, Zaki, Adeline, Pauline, Paul S.** et **Caroline**.

Merci à mes anciens co-internes déjà docteurs **Frantz, Déborah, Lisa** et **Clémence**.

Merci à **Thomas** et **Fanny**, grâce à vous j'ai rarement autant peu travaillé pendant un semestre. Je pense que Brigitte s'en souvient encore.

Merci à mes parents, **Papa** et **Maman**, de m'avoir soutenu jusqu'au bout, de m'avoir apporté à manger quand mon frigo était vide, de m'avoir fait le ménage quand c'était le chaos dans mon appartement. Merci d'être toujours là pour moi et d'être fier de moi. Merci de m'aimer autant, je vous aime fort.

Merci à ma **Mamie** qui est toujours à mes petits soins et qui me donne beaucoup d'amour.

Merci à mes **grands-parents** qui ne sont plus là, Mamie-Lu, Bon-papa et Papi, avec qui j'ai eu la chance de grandir et que j'ai beaucoup aimé.

Merci à mes oncles et tantes, **Patrick, Evelyne, Béatrice, Joël, Patrick et Nicole** de m'avoir fait passer des vacances inoubliables dans le Lot depuis que je suis toute petite que ce soit à Velles, à La Truite Dorée ou au Mas de Saboth.

Merci à mon cousin **Louis** qui m'a fait faire beaucoup de choses interdites quand on était petits, c'est un peu avec toi que j'ai appris à conduire ... Merci à mes grands cousins **Aurélié** et **Guillaume**.

Merci à mes cousins **Thibault** et **Quentin** de me faire toujours autant rire, de m'emmener pêcher, de faire du vélo avec moi, de passer du temps avec moi, de me faire des bons cocktails et de la bonne bouffe. Même si je viens de la « ville », je suis un peu une campagnarde grâce à vous.

Merci à **Antoine, Marie-Jo, Geneviève, Jean-Claude, Bernard** et **Christian** d'être venu à ma thèse.

Les insaisissables, **Marine, Olivia, Clarisse**, que dire de vous, de notre quatuor inséparable, de nos voyages au bout du monde, de nos fous rires, de nos débats probables et improbables, de nos soirées ... merci pour tout ce que vous m'apportez, je vous aime les filles !

Solenne, merci pour ton écoute, ta gentillesse, tes mots réconfortants et ton enthousiasme permanent. Merci à Clément et à Maïwen que j'ai hâte de voir grandir.

Mathilde, merci pour ton amitié, ton humour, tes imitations et bien sûr pour nos battles de dance.

Marie, merci d'avoir une maison à Marmande, ça m'évite de dormir dehors pour Garorock. 20 ans d'amitié et toujours là, je suis fière de nous !

Julie, merci d'avoir été présente et de m'avoir conseillé pendant mon internat même si tu es partie un peu trop tôt je trouve, tu sais bien que je suis perdue sans toi. Merci pour nos folles soirées qui j'espère vont durer... Et merci à David de nous supporter pendant ces soirées.

Claire, merci pour nos 6 mois de coloc, nos restos, nos virées à vélos, nos soirées anti-dimanche soir, nos balades au bout du monde ou en Bretagne. Merci pour ta bonne humeur et ton soutien. La vie à Bordeaux sans toi me manque.

Merci **Antoine V.** pour ces we au ski et ta persévérance pour me faire venir à Orléans (je viendrai je te jure), merci **Benjamin L.** pour ton soutien et les we à Saint-Jean, merci **Antoine T.** d'organiser les plus grandes soirées depuis le lycée, merci **Adèle** pour ta gentillesse et ton rire.

Merci à **Ondine, Morgan** et **Capucine** d'être toujours là.

Merci à mes anciens colocs et maintenant copains de Pau, **J.B, Oliv, Fabio, Jean-Jean, Guigui** avec qui j'ai passé 6 mois que je n'oublierai jamais !

Merci à tous les copains de Périgueux, avec qui j'ai passé un de mes meilleurs semestres, **Louise, Lucie, Boris, Quentin, Camille, Joris, Céline, Antoine, Baptiste, Pam** ...

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 14 |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE | 15 |
| I- CANCER DU SEIN : Épidémiologie, Facteurs de risque, Dépistage organisé, Diagnostic histologique | 15 |
| 1. Épidémiologie | 15 |
| 2. Facteurs de risque | 15 |
| 3. Dépistage organisé | 16 |
| 4. Diagnostic histologique | 16 |
| II- CLASSIFICATION MOLÉCULAIRE DES CANCERS DU SEIN | 17 |
| III- CARCINOMES MAMMAIRES DE PHÉNOTYPE LUMINAL | 21 |
| 1. Définition des carcinomes du sein de phénotype luminal | 21 |
| 2. Phénotype luminal A et luminal B | 21 |
| a) Tumeurs de phénotype luminal A | 21 |
| b) Tumeurs de phénotype luminal B | 22 |
| 3. Prise en charge par chimiothérapie néoadjuvante des tumeurs lumineales HER2- à un stade précoce 22 | |
| a) Chimiothérapie néoadjuvante..... | 23 |
| b) Chirurgie | 25 |
| c) Hormonothérapie adjuvante..... | 26 |
| d) Radiothérapie adjuvante | 28 |
| IV- FACTEURS HISTOPRONOSTIQUES ET HISTOPREDICTIFS DANS LE CANCER DU SEIN DE PHENOTYPE LUMINAL HER2 NEGATIF | 29 |
| 1. Grade d’Elston et Ellis..... | 29 |
| 2. Récepteurs hormonaux : RE et RP | 30 |
| 3. H-SCORE..... | 31 |
| 4. Index de prolifération Ki67 | 31 |
| a) Définition | 31 |
| b) Évaluation immunohistochimique | 32 |
| c) Seuil de l’index Ki67 | 34 |
| d) Valeurs pronostique et prédictive de réponse à la chimiothérapie néoadjuvante | 34 |
| 5. Équation 3 de Magee | 35 |
| 6. Score IHC4 | 36 |
| 7. Lymphocytes du stroma infiltrant la tumeur : sTILs | 36 |
| 8. Évaluation histologique de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante avec le RCB | 37 |
| 9. Emboles vasculaires | 38 |
| 10. Les signatures d’expression génique | 39 |
| OBJECTIFS DU TRAVAIL | 41 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 42 |
| ARTICLE ORIGINAL | 48 |
| CONCLUSIONS | 77 |
| ANNEXES | 80 |
| ANNEXE 1 : Classification ACR des images mammographiques (HAS)..... | 80 |
| ANNEXE 2 : Grade histologique des cancers du sein selon Elston et Ellis | 81 |
| ANNEXE 3 : Classification pTNM des cancers du sein selon l’AJCC 2017 (8ème édition)..... | 82 |
| ANNEXE 4 : Algorithme décisionnel pour l’évaluation du statut HER2 par immunohistochimie ASCO 2018..... | 83 |
| ANNEXE 5 : Algorithme décisionnel pour l’évaluation du statut Her2 par IHC et FISH ASCO 2018..... | 84 |
| SERMMENT D’HIPPOCRATE | 85 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ASCO : American Society for Clinical Oncology
CCIS : Carcinome Canalaire In Situ
CGH-a : Hybridation Génomique Comparative sur puce
CFG : champ fort grossissement
CI : carcinome infiltrant
CI-TNS : carcinome infiltrant de type non spécifique
CIS : carcinome in situ
CLI : carcinome infiltrant de type lobulaire
CTI : cellules tumorales isolées
CK : cytokératine
CNA : chimiothérapie néoadjuvante
DPD : dihydropyrimidine déshydrogénase
FISH : hybridation *in situ* en fluorescence
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor-2
HES : Hématoxyline Eosine Safran
PAM : plaque aréolo-mamelonnaire
pCR : réponse pathologique complète
PO : pièce opératoire
RCB : Residual Cancer Burden
RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RE : récepteur à l'estrogène α
RP : récepteur de la progestérone
RH : récepteurs hormonaux
RS : score de récurrence
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SFO : suppression de la fonction ovarienne
sTILs : lymphocytes du stroma infiltrant la tumeur

1. Épidémiologie

En France métropolitaine, avec 58 459 nouveaux cas en 2018, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme en termes d'incidence, nettement devant le cancer du côlon-rectum et le cancer du poumon. L'incidence du cancer du sein a augmenté de façon importante et constante depuis 1990. Ainsi, le taux d'incidence a presque doublé entre 1990 et 2018 passant de 30 000 à 58 400 cas annuels, soit +1,1% par an en moyenne (1).

Il représente également la première cause de décès par cancer chez la femme avec 14 % des décès féminins par cancer soit 12 146 décès en 2018. Cependant, le taux de mortalité a diminué entre 2005 et 2012, évalué en moyenne à -1,5 points par an (1).

De plus, la survie nette à 5 ans standardisée sur l'âge s'améliore au cours du temps. Elle est passée de 80 % pour les femmes diagnostiquées entre 1989 et 1993 à 87 % pour celles diagnostiquées entre 2005 et 2010. Cela s'explique en partie par l'amélioration des traitements et par un dépistage du cancer du sein de plus en plus adapté au niveau du risque de chaque femme, permettant un diagnostic précoce de cancer (1).

2. Facteurs de risque

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle. Les facteurs de risque sont le sexe féminin, l'âge, la nulliparité, une première grossesse tardive, une puberté précoce, une ménopause tardive, la prise de traitement hormonal substitutif prolongé, les prédispositions génétiques (BRCA), un antécédent familial de cancer du sein au premier degré et les antécédents personnels de cancers gynécologiques, un antécédent d'irradiation thoracique, l'obésité, le tabac et l'alcool (2,3).

3. Dépistage organisé

Le dépistage organisé du cancer du sein a été mis en place en France en 1994 puis généralisé à tout le territoire français depuis le début de l'année 2004. Il concerne les patientes à risque moyen, c'est-à-dire toutes les femmes âgées de 50 à 74 ans sans symptôme apparent ni facteur de risque particulier. Il consiste en un examen clinique des seins et une mammographie de dépistage tous les 2 ans avec une double lecture systématique en cas de cliché normal ou bénin. Les femmes présentant des facteurs de risque importants en sont exclues. En cas d'image ACR4 à ACR5 (**Annexe 1**), des prélèvements par microbiopsies ou macrobiopsies percutanées pour analyse histologique sont réalisés (4).

4. Diagnostic histologique

A partir des biopsies ou des pièces opératoires (PO), le pathologiste détermine le type histologique de la tumeur selon la classification OMS en vigueur ainsi que les éléments histopronostiques et histoprédictifs de réponse aux traitements essentiels pour une prise en charge thérapeutique optimale par le clinicien.

Les données histologiques minimales à renseigner dans un compte-rendu d'anatomopathologie pour une tumeur primitive du sein sont le type histologique, le grade histopronostique de Scarff Bloom Richardson modifié par Elston et Ellis (**Annexe 2**) permettant de grader les tumeurs (I à III) selon trois items : architecture tumorale, atypies cyto-nucléaires et nombre de mitoses évalué sur 10 champs au fort grossissement (CFG). Il faut également préciser la taille tumorale, la présence et le type de métastase ganglionnaire axillaire permettant de déterminer le stade pTNM (**Annexe 3**), l'extension tumorale, la présence d'emboles vasculaires, le pourcentage de carcinome in situ (CIS), le statut des récepteurs hormonaux (récepteur à l'œstrogène alpha et à la progestérone), l'index de prolifération Ki67 et le statut HER2 (**Annexe 4 et 5**). Pour les tumeurs ayant reçu un traitement néoadjuvant, il faut apprécier la réponse histologique après traitement néoadjuvant (grade RCB) (5–7).

Le cancer du sein est une maladie hétérogène composée de plusieurs sous-types moléculaires ayant des caractéristiques cliniques et histologiques différentes ainsi que des évolutions différentes. Les facteurs histopronostiques et histoprédictifs classiques sont pris à défaut dans un certain nombre de cas, notamment chez les patientes à haut risque qui présentent une longue survie sans récurrence ou à l'inverse chez des patientes initialement classées en bas risque qui rechutent rapidement. Donc à elles seules, les caractéristiques histologiques ne peuvent pas mettre en évidence de manière adéquate l'hétérogénéité moléculaire et la complexité du cancer du sein. C'est dans ce contexte que se sont développées, dans les années 2000, les signatures moléculaires de caractérisation moléculaire des tumeurs. Les premiers travaux ont été menés par Perou et Sorlie en 2000 avec la publication des portraits moléculaires des tumeurs du sein qui a révolutionné l'approche de la pathologie mammaire en proposant une approche complètement nouvelle, classant les tumeurs en fonction de patterns d'expression des gènes grâce à la technique cDNA array (8). Puis en 2001, Perou et Sorlie ont publié la première classification transcriptomique des cancers du sein reposant sur l'analyse simultanée du niveau d'expression des ARN messagers de milliers de gènes dans une même tumeur et le regroupement des différentes tumeurs mammaires en fonction de leurs profils d'expression génique (9).

Cette classification comprenait initialement 5 grands groupes de tumeurs mammaires avec des pronostics différents :

- **Tumeurs de phénotype luminal** : tumeurs sur-exprimant le gène *ESR1* codant pour le récepteur à l'œstrogène alpha ($RE\alpha$) et des gènes dont le niveau de transcription est dépendant d'*ESR1* (gènes de la cytokératine 8, *GATA3*, *FOXA1*, *XBP1* et *MYB*) (10).

Les tumeurs lumineuses sont divisées en 2 groupes avec d'une part, les tumeurs sous-exprimant les gènes liés à la prolifération cellulaire classées en « **luminal A** » et d'autre part les tumeurs sur-exprimant les gènes liés à la prolifération cellulaire dites « **luminal B** ».

- **Tumeur de phénotype HER2 enrichi** : tumeurs associées à une amplification du gène *ERBB2* responsable d'une surexpression d'HER2 en immunohistochimie. Ces tumeurs n'expriment pas le gène *ESR1*.

- **Tumeur de phénotype basal-like** : tumeurs sous-exprimant le gène *ESR1* et les gènes dépendant d'*ESR1* ainsi que le gène *ERBB2*. Elles sur-expriment les gènes basaux codant pour les cytokératines (CK) de haut poids moléculaire (CK5, CK14, CK17).

- **Tumeur de phénotype Normal Breast like** : tumeurs au profil d'expression ressemblant à celui des cellules épithéliales mammaires normales. Ce groupe a été créé de manière artéfactuelle et a donc été exclu secondairement. En effet, il serait lié à un artéfact de dilution de l'ARN tumoral dans l'ARN de tissu mammaire normal, particulièrement dans les tumeurs hypo-cellulaires et donc pauvres en cellule tumorales. Pour ces dernières, l'analyse moléculaire a fait ressortir l'expression des gènes des constituants normaux du sein. Ce dernier est de ce fait le plus souvent remplacé par la catégorie « inclassée ».

Cette classification intrinsèque, dans sa version initiale, a marqué un tournant dans l'approche de la carcinogenèse mammaire mais elle n'est pas applicable tel quel en routine à toutes les tumeurs mammaires car pour la réaliser il faut du matériel tumoral congelé. Une classification intrinsèque simplifiée a été élaborée en 2009, dénommée PAM50, non plus basée sur l'expression de 1900 gènes comme précédemment mais sur seulement 50 gènes (11). Le niveau d'expression des gènes est analysé par RT-PCR quantitative (réaction en chaîne de la polymérase de transcription inverse) à partir d'ARN extrait de tumeurs fixées en formol et incluses en paraffine. Elle est devenue la technique de référence pour le classement intrinsèque des tumeurs du sein même si, gagnant en simplicité d'utilisation, cette technique a perdu en précision de classement.

Les experts de la conférence de consensus de St Gallen en 2013 ont transposé cette classification intrinsèque en classification immunohistochimique avec l'individualisation de deux types de tumeurs luminales B en fonction du statut HER2. En effet, 50% des tumeurs HER2+ sont RE α - et sont classées dans les tumeurs HER2 enrichies et 50% sont RE α + et sont classées dans les tumeurs luminales B. Actuellement, 5 principaux sous-types histologiques sont reconnus : luminal A, luminal B-HER2 négatif, luminal B-HER2 positif, HER2 positif non luminal et triple négatif (**Tableau 1**) (12).

La classe moléculaire d'un cancer du sein est donc actuellement appréciée en routine par l'évaluation immunohistochimique systématique de l'expression de RE α , RP, HER2 et Ki67. Cette classification conditionne la prise en charge thérapeutique (**Figure 1**) (12,13).

Tableau 1. Classification immunohistochimique des cancers du sein

| Groupe | Type histologique | Profil immunohistochimique |
|---|--|--|
| Luminal A (56%)* | Carcinome infiltrant de grade I ou II | RE \geq 10% et RP \geq 10% HER2 score 0, 1+, 2+ non amplifié Ki67<14% ou 14% \leq Ki67<20% et RP \geq 20% |
| Luminal B (29%)* HER2- (23%)* HER2+ (6%)* | Carcinome infiltrant de grade II ou III | RE \geq 10% <u>HER2-</u> : HER2 score 0, 1+, 2+ non amplifié Ki \geq 20% ou 14% \leq Ki67<20% et RP<20% <u>HER2+</u> : HER2 score 3+ ou 2+ amplifié Quel que soit la valeur du Ki67 et de RP |
| Her2 enrichi (6%)* | Carcinome infiltrant de grade II ou III | RE<10% RP<10% Her2 3+ ou 2+ amplifié |
| Triple négatif (10%)* RA- (9%) RA+ (1%) | Carcinome infiltrant de grade III | RE<10% RP<10% HER2- : HER2 score 0, 1+, 2+ non amplifié Sous type basal-like : RA<10% et CK5/6 + et/ou CK14+ Sous type moléculaire apocrine : RA \geq 10% |

* Données Institut Bergonié

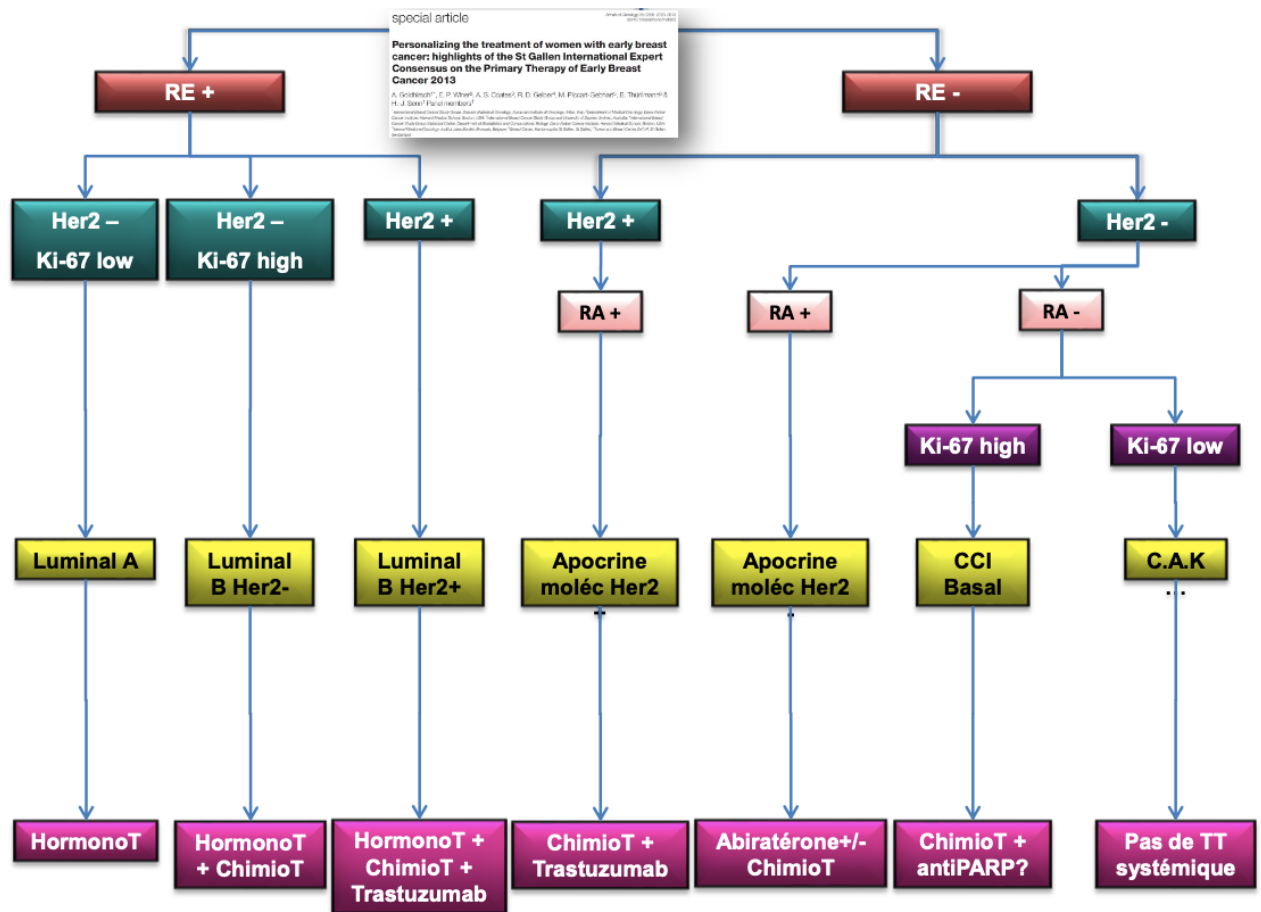


Figure 1. Classification immunophénotypique des cancers du sein et traitements systémiques. *Dr MacGrogan (14) d'après Goldhirsch et al. (13).*

1. Définition des carcinomes du sein de phénotype luminal

Les cancers du sein de phénotype luminal représentent environ 80% des carcinomes mammaires dont plus de 50 % sont de type luminal A.

Ils sont définis par une surexpression du gène *ESR1* se traduisant en immunohistochimie par une positivité du RE α . La définition d'une tumeur du sein RE positive est variable selon les pays. En France et dans de nombreux pays européens, la recommandation du GEPICIS est de considérer une tumeur RE positive à partir de 10% de cellules carcinomateuses infiltrantes positives (15). Les recommandations américaines (ASCO et CAP) retiennent le seuil de 1% (négativité <1%)(16).

2. Phénotype luminal A et luminal B

Une classification des tumeurs lumineales du sein a été définie par les experts de la conférence de consensus de Saint Gallen en 2013 (12) puis précisée par Maisonneuve *et al* en 2014 (12,17). Elle distingue deux groupes avec d'une part les tumeurs de phénotype luminal A et d'autre part les tumeurs de phénotype luminal B (**Tableau 1**).

a) Tumeurs de phénotype luminal A

Histologiquement, il s'agit de carcinomes infiltrants de grade I ou II.

En immunohistochimie, le sous-groupe luminal A est défini par RE \geq 10% et RP \geq 10%, HER2 score 0, 1+, 2+ non amplifié et Ki67<14% ou 14% \leq Ki67<20% et RP \geq 20%.

Sur le plan génétique, ces tumeurs présentent un profil génomique peu remanié en analyse par CGH-Array avec des profils de type « simplex » correspondant de manière caractéristique à une délétion du bras long du chromosome 16 (16q) associé à une duplication du bras long du chromosome 1 (1q) .

Sur le plan transcriptomique, ces tumeurs expriment fortement le gène *ESR1* associé à une expression élevée des gènes régulés par le gène *ESR1* (*GATA3*, *FOXA1*) et à une faible expression des gènes liés à la prolifération cellulaire (20).

Sur le plan mutationnel, le taux de mutation est plus faible que dans le groupe luminal B. Les gènes les plus fréquemment mutés sont *PIK3CA* (45%), *GATA3* (14%), *MAP3K1* (13%), *TP53* (12%), *CDH1* (9%), *MLL3* (8%) et *MAP2K4* (7%)(21).

b) Tumeurs de phénotype luminal B

Histologiquement, il s'agit de carcinomes infiltrants de grade II ou III.

En immunohistochimie, deux types de tumeurs lumineuses B ont été individualisés en fonction du statut HER2.

Les tumeurs lumineuses B HER2- sont définies par RE \geq 10%, HER2 score 0, 1+, 2+ non amplifié et un Ki \geq 20% quel que soit le statut de RP ou 14% \leq Ki67<20% et RP<20%.

Les tumeurs lumineuses B HER2+ sont définies par RE \geq 10%, Her2 score 3+ ou 2+ amplifié quel que soit la valeur du Ki67 et des RP.

En France, la détermination du statut HER2 est établie selon les recommandations de l'ASCO/CAP (5).

Les deux méthodes utilisées sont l'immunohistochimie et la FISH (Annexe 5 et 6).

Sur le plan génétique, ce sous-groupe présente un profil génomique en analyse par CGH-Array dit « amplificateur » en raison de nombreuses amplifications de partie du génome (18–20) avec un profil plus remanié que les tumeurs lumineuses A.

Sur le plan transcriptomique, ces tumeurs expriment plus faiblement le gène *ESR1* ainsi que les gènes régulés par le gène *ESR1* (*GATA3*, *FOXA1*). Ces tumeurs se différencient surtout des tumeurs de phénotype luminal A par une expression plus élevée des gènes liés à la prolifération cellulaire (20).

Sur le plan mutationnel, les gènes mutés sont sensiblement les mêmes que dans les tumeurs lumineuses A mais à des fréquences différentes. En effet, *PIK3CA* et *TP53* sont tous les deux mutés dans 29% de cas, *GATA3* dans 15% des cas, *MLL3* dans 6%, *CDH1* et *MAP3K1* dans 5% des cas (21).

3. Prise en charge par chimiothérapie néoadjuvante des tumeurs lumineuses HER2- à un stade précoce

Le cancer du sein précoce, défini par l'absence de métastases à distance, est une maladie potentiellement curable. Véritable spectre lésionnel, les cancers lumineux sont au cœur des enjeux de la désescalade thérapeutique entamée ces dernières années. Le traitement a considérablement progressé avec une réduction de l'intensité de la thérapie, tant pour la thérapie locorégionale que pour la thérapie systémique. Éviter les sur-traitements mais aussi les sous-traitements est devenu un objectif majeur.

En 2017, Harbeck et Gnant ont publié des recommandations sur la prise en charge du cancer du sein à un stade précoce en s'appuyant sur la conférence de consensus de saint Gallen menée par un groupe d'experts en 2013 (12,22). En 2019, le GEPFICS a également proposé des recommandations pour la prise en charge des prélèvements mammaires et ganglionnaires avant et après traitement néoadjuvant (23).

Les traitements utilisés pour traiter les cancers du sein luminaux HER2- sont la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Les carcinomes infiltrants (CI) de type canalaire et de type lobulaire sont traités de la même façon. Au stade précoce, en dehors de la chirurgie et de la radiothérapie, la prise en charge thérapeutique est basée sur le sous-type moléculaire défini à partir des biomarqueurs RE α , RP, Ki67 et HER2.

Une biopsie pré-thérapeutique percutanée radioguidée de la tumeur primitive, avec si possible la pose d'un clip au sein de la tumeur, est indispensable avant tout traitement néoadjuvant. En cas de réponse clinique complète (ycT0), le clip permet au radiologue de positionner le harpon qui servira de guide au chirurgien lors de la tumorectomie. En l'absence de clip et en cas de réponse clinique complète, il devient alors très difficile pour le chirurgien d'enlever le site de la tumeur initiale. Ce prélèvement biopsique est précieux, car en cas de réponse histologique complète (pCR), ce matériel sera le seul disponible.

a) Chimiothérapie néoadjuvante

La chimiothérapie néoadjuvante (CNA) dans le cancer du sein est une stratégie thérapeutique introduite vers la fin du XXe siècle dans le but de réduire la taille des tumeurs. Elle repose sur quatre principes. Elle devrait rendre opérable une tumeur initialement inopérable, permettre une chirurgie conservatrice pour les indications de mastectomie d'emblée. Elle devrait permettre une amélioration de la survie globale des patients atteints de cancer localement avancés qui ont un risque élevé de développer des métastases à distance. De plus, la CNA donne la possibilité de mesurer l'efficacité du traitement en mesurant cliniquement et par imagerie la régression tumorale. Cependant, des études ont démontré que les bénéfices en termes de survie sans maladie et la survie globale ne sont pas prouvés (24). Certaines études ont également mis en évidence une augmentation du risque de récurrence locale par rapport aux patientes ayant eu une chirurgie conservatrice d'emblée (25). Concernant les tumeurs lumineuses HER2 négatives, la CNA est donc indiquée actuellement pour les tumeurs de grande taille clinique (≥ 30 mm), des tumeurs dont la taille par rapport à la taille du sein ne permettrait pas un traitement conservateur d'emblée, des tumeurs localement avancées et les cancers inflammatoires (26,27).

La CNA est administrée avant la chirurgie, sur preuve histologique après détermination des facteurs histopronostiques (grade, RH, Ki67 et HER2). La décision d'administration de CNA est prise à la fois selon le choix de la patiente et les caractéristiques histologiques de la tumeur. La chimiosensibilité des cancers du sein luminaux HER2- dépend du niveau de prolifération cellulaire. En effet, alors que les tumeurs RE-/HER2- et HER2+ ont pour la plupart des scores de prolifération élevés, les tumeurs RE+/HER2- ont un spectre lésionnel allant d'une tumeur faiblement proliférante à une tumeur fortement proliférante, la

grande majorité de la population étant classée en zone intermédiaire (28). La discussion de chimiothérapie se fait pour les cas de prolifération intermédiaire avec un Ki67 entre 10 et 30% rendant difficile la prise en charge (28).

La réponse histologique au traitement néoadjuvant permet une évaluation de l'efficacité thérapeutique.

Contrairement à la maladie triple négative et à la maladie HER2 positive, la majorité des tumeurs lumineuses présentent une faible chimiosensibilité et sont moins souvent en pCR après CNA. Les tumeurs lumineuses HER2- les plus proliférantes répondent bien à la CNA et sont donc associées à une plus grande proportion de pCR après CNA (29). La réponse à la chimiothérapie s'est avérée être un prédicteur important de l'issue de la maladie HER2-positive et du cancer du sein triple négatif, les patientes obtenant une pCR montrant une amélioration de la survie par rapport à celles qui obtiennent moins qu'une pCR. Dans le cancer du sein luminal HER2-, la pCR n'est pas pronostique dans les tumeurs de grade I/II alors qu'elle est associée à un meilleur pronostic dans les tumeurs de grade III (30).

Le schéma thérapeutique standard actuel est une chimiothérapie combinée à base d'anthracycline et de taxanes avec un nombre de cycles variables, administrés le plus souvent selon un protocole séquentiel pour des raisons de toxicité.

Les antracyclines (doxorubicine et épirubicine) appartiennent à la famille des inhibiteurs de la topoisomérase II. Leur principal mécanisme d'action est d'inhiber l'action de cette enzyme responsable de la cassure bicaténaire de l'ADN nécessaire à la transcription, en s'intercalant entre les paires de bases azotées de l'ADN afin d'induire la mort cellulaire. L'effet indésirable majeur de ce traitement est l'insuffisance cardiaque chronique. Le régime FEC correspond à l'association de 3 agents cytotoxiques dont une antracycline : 5-fluorouracile (5-FU), épirubicine et cyclophosphamide. Depuis avril 2019, avant la prescription de 5-FU, l'HAS recommande la recherche d'un déficit de l'enzyme dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) présent chez 3 à 8% de la population. La DPD est une enzyme capable de dégrader le médicament, son déficit entraîne de graves effets indésirables. La recherche d'un déficit en DPD avant l'administration d'une chimiothérapie à base de 5-FU permet de réduire considérablement le risque de survenue d'effets indésirables liés à ce déficit (31).

Les taxanes regroupent deux molécules, le paclitaxel (Taxol) et le docetaxel (Taxotère). Ils appartiennent à la famille des poisons du fuseau. Leur principal mécanisme d'action est l'inhibition de la fonction des microtubules qui sont essentiels à la division cellulaire bloquant ainsi la division normale des cellules et entraînant la mort cellulaire.

b) Chirurgie

- Tumeur

Il existe deux types de chirurgie dans le cancer du sein : la chirurgie conservatrice et la chirurgie non conservatrice. Le choix entre les deux options dépend de la tumeur et de la patiente.

La chirurgie mammaire conservatrice correspond à une mastectomie partielle (tumorectomie ou quadrantectomie) emportant la tumeur en totalité avec des berges macroscopiquement saines, le cas échéant des recoupes tissulaires sont réalisées. L'exérèse est effectuée sur toute l'épaisseur du tissu mammaire jusqu'au plan musculaire. L'objectif de la mastectomie partielle est une berge non envahie pour le CI et une berge ≥ 2 mm est recommandée pour le CIS sans composante infiltrante. Les décisions de reprise chirurgicale sont discutées en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). La plaque aréolo-mamelonnaire (PAM) peut être préservée sous réserve que l'exérèse puisse être in sano. La mise en place de clips sur le site tumoral est recommandée, en particulier pour la radiothérapie et pour le repérage par le chirurgien en cas de réponse histologique complète. Une chirurgie conservatrice est réalisée quand l'exérèse complète est possible avec un résultat esthétique satisfaisant et des marges histologiques saines et suffisantes (32).

La chirurgie mammaire non conservatrice correspond à une mammectomie totale emportant la PAM. Elle est réalisée en cas de lésions plurifocales, de rapport volume tumoral/volume mammaire défavorable, de néoplasie inflammatoire, de prédisposition génétique connu, de récurrence d'un cancer du sein déjà traité par un traitement conservateur ou selon le désir de la patiente.

- Ganglion sentinelle

Les ganglions sentinelles (GS) du creux axillaire représente le premier relais ganglionnaire de drainage lymphatique du sein. En cas de CI, la chirurgie mammaire s'accompagne d'un geste chirurgical axillaire homolatéral. La technique du GS consiste à repérer le ou les premiers ganglions recevant le drainage lymphatique axillaire du sein et à en faire l'exérèse.

La procédure du GS constitue aujourd'hui la technique de référence pour l'exploration axillaire dans les CI du sein, histologiquement prouvés, unifocaux ou plurifocaux T1/T2-N0 sans atteinte ganglionnaire clinique et échographique (32–35) dans le but d'éviter un curage axillaire en cas de GS négatifs et donc les effets secondaires qui en découlent.

En situation néoadjuvante, une procédure du GS peut être réalisée en pré ou post-CNA chez les patients cN0 ou cN1 après une exploration négative de l'aisselle (échographie axillaire et biopsie ganglionnaire

négative). En cas de ganglion métastatique prouvé par biopsies ganglionnaires, un curage axillaire post-CNA est indiqué (36,37).

L'analyse histologique du GS peut se faire par examen extemporané ; si le GS est positif, un curage axillaire est réalisé dans le même temps opératoire.

- Curage axillaire

Un curage axillaire réalisé d'emblée est indiqué en cas d'échec de détection du ganglion sentinelle ou dans les situations suivantes : atteinte ganglionnaire prouvée sur biopsie ganglionnaire, stades T3/T4 et antécédent de procédure du ganglion sentinelle homolatérale.

c) Hormonothérapie adjuvante

L'hormonothérapie est une thérapie ciblée indiquée uniquement dans les tumeurs luminales, c'est-à-dire quand les récepteurs hormonaux (RE, RP) sont exprimés. Il est recommandé de déterminer le statut des RP même si leur rôle n'est pas clairement établi dans la prise en charge des cancers du sein (38).

La présence de RH dans les tumeurs est corrélée à l'efficacité de la thérapie endocrinienne adjuvante avec une réduction significative de la récurrence et de la mortalité dans le cancer du sein précoce. La sensibilité endocrinienne est directement corrélée au degré de positivité des récepteurs hormonaux (39).

L'hormonothérapie dans les cancers du sein de type luminal diminue la morbidité et la mortalité liée au cancer du sein (40–42).

Seulement 1,4% des tumeurs ont une expression des RE entre 1 et 10 % (1,4%). Ces tumeurs ont un profil transcriptomique proche du profil RE- et ont une faible hormonosensibilité (43). Les américains reconnaissent que la décision de faire une hormonothérapie doit prendre en compte le rapport bénéfices/risques pour les patientes dont les tumeurs présentent ce faible niveau d'expression de RE.

Les tumeurs RE-/RP+ sont très rares, ces résultats sont le plus souvent dus à des problèmes techniques. Elles sont le plus souvent de grade III (44). L'indication d'hormonothérapie pour ces tumeurs doit être discutée en RCP. Cependant, il semblerait que les tumeurs RE-/RP+ soient hormonosensibles (40).

L'hormonothérapie est prescrite indépendamment du statut HER2 et débutée en général après la fin de la radiothérapie.

Le choix de l'hormonothérapie est orienté selon le statut ménopausique de la patiente car les sites de synthèse de l'œstrogène circulant varient en fonction de ce statut.

Avant la ménopause, l'œstrogène circulant est principalement fabriqué dans les ovaires en réponse aux hormones hypophysaires FSH et LH.

Après la ménopause, les précurseurs de l'œstrogène sont produits dans les glandes surrénales et convertis en œstradiol dans les tissus périphériques après aromatisation.

Pour les femmes non ménopausées, l'hormonothérapie standard est le Tamoxifène pour une durée minimale de 5 ans. Le Tamoxifène est un inhibiteur compétitif des œstrogènes (SERM) qui peut avoir un effet antagoniste dans le sein ou agoniste sur l'endomètre et l'os. La méta-analyse du Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG)(39) a montré que 5 ans de traitement par Tamoxifène réduisent le risque de récurrence non seulement au cours des 4 premières années mais aussi au cours des années 5 à 9. L'essai ATLAS91 a montré que la poursuite du Tamoxifène pendant 5 ans supplémentaires, pour un total de 10 ans de traitement, réduisait significativement le risque de récurrence du cancer du sein et la mortalité (45).

En cas de contre-indications absolues ou relatives (antécédents thrombo-emboliques ou obésité), la suppression de la fonction ovarienne (SFO) est prescrite. La SFO peut être médicamenteuse avec les analogues de la LH-RH (=GnRH) ou par chirurgie (ovariectomie bilatérale) ou irradiation, les techniques non définitives étant privilégiées. Après 2-3 ans de traitement par Tamoxifène, si la ménopause est confirmée, le Tamoxifène peut être substitué par un inhibiteur de l'aromatase (IA) pour une durée totale d'hormonothérapie minimale de 5 ans. Les IA sont contre-indiqués chez la femme non ménopausée (46).

Chez les femmes pré-ménopausées atteintes d'un cancer du sein RE+, il n'existe pas de bénéfice clinique global à l'ajout d'une SFO au Tamoxifène. Cependant, chez les femmes atteintes d'un cancer du sein à haut risque ayant reçues une chimiothérapie mais qui sont restées pré-ménopausées, l'ajout d'une SFO au Tamoxifène réduit le risque de récurrence du cancer du sein (46).

Pour les femmes ménopausées, le traitement de référence est un IA (stéroïdien ou non stéroïdien) pour une durée minimale de 5 ans. Ils inhibent la synthèse des œstrogènes par blocage de l'enzyme aromatase. En cas de contre-indication ou d'intolérance aux IA, le Tamoxifène seul peut être pris pendant 5 ans.

En 2019, le groupe d'experts de l'ASCO recommande que les femmes atteintes d'un cancer du sein avec métastases ganglionnaires reçoivent un traitement endocrinien adjuvant prolongé pour un total de 10 ans sur la base de recommandations relatives au risque de récurrence (46).

d) Radiothérapie adjuvante

Les recommandations de l'INCa, émises en 2012, sur l'irradiation post-opératoire en cas de chimiothérapie néoadjuvante sont les suivantes (47) :

- En cas de tumeurs N- (cN0 et ypN0) et T3/T4 ou T2 externe, une radiothérapie du sein en cas de traitement conservateur ou de la paroi thoracique en cas de mastectomie et de la zone sus-claviculaire est proposée. En cas de tumeur T1 (interne ou externe) ou T2 externe et ypT0, la radiothérapie du ganglion ou de la paroi n'est pas indiquée. En cas de résidu tumoral, il faut discuter son indication en RCP.
- En cas de tumeur ypN+ prouvée au diagnostic (cytologie ou histologie GS), quelle que soit la réponse à la chimiothérapie, l'irradiation ganglionnaire (chaîne mammaire interne +/- axillaire) est recommandée quelle que soit la réponse à la chimiothérapie, mais chez des patientes sans atteinte ganglionnaire (ypN0), il n'a pas été montré de bénéfice de l'irradiation ganglionnaire (en plus de l'irradiation mammaire) sur la survie sans rechute, la survie spécifique et la survie globale à 5 ans (48–50).

Le schéma thérapeutique de référence est une dose de 50 Gy délivrée en 25 fractions de 2 Gy, 5 jours par semaine pendant 5 semaines.

Après CNA et traitement conservateur, une irradiation de la glande mammaire avec surimpression du lit tumoral est indiquée.

Le rôle des facteurs pronostiques est de fournir au clinicien des indications sur le risque de rechute locale ou métastatique et le risque de décès encouru par les patientes présentant un CI du sein. Ces indications lui permettent d'adapter le traitement.

Les facteurs prédictifs apprécient la capacité des tumeurs à répondre à un traitement néoadjuvant et l'influence d'un traitement médical adjuvant sur la survie des patientes opérées d'emblée. Ces facteurs permettent d'administrer une thérapeutique ciblée à la tumeur du patient.

Les principaux facteurs histologiques et biologiques sont résumés dans le **tableau 2**.

1. Grade d'Elston et Ellis

Tout CI du sein doit être gradé selon le grade histopronostique de Scarff Bloom Richardson modifié par Elston et Ellis (**Annexe 3**) au moment du diagnostic que ce soit sur biopsie ou sur PO. Ce grade permet de classer les tumeurs en trois groupes (I à III) selon trois items : architecture tumorale, atypies cytonucléaires et nombre de mitoses évalué sur 10 CFG (51).

Pour définir la taille des noyaux des cellules tumorales, il faut se référer à la taille des noyaux des cellules normales ou la taille d'un lymphocyte qui mesure environ moins d'une fois et demi la taille des cellules glandulaires normales.

Pour classer le pléomorphisme nucléaire en score 3, il est important de noter que les noyaux doivent représenter $\geq \frac{1}{4}$ de la surface tumorale.

Le compte des mitoses est un critère majeur nécessitant des prérequis indispensables pour un compte optimal. En effet, le pré-analytique a un rôle clé avec un temps d'ischémie froide minimal et une technique optimale (temps de fixation, qualité du fixateur, coloration HES, coupe fine). Le compte des mitoses s'effectue dans les secteurs tumoraux les plus mitotiques (hot spot), repérés au grossissement x200, sur 10 champs consécutifs à fort grossissement (x400). Généralement, les mitoses sont plus nombreuses au voisinage du front d'invasion. Il faut répéter ce compte plusieurs fois sur différentes zones et garder la valeur la plus élevée. Il est important de compter uniquement les vraies figures mitotiques selon les critères de Van Diest et Baak pour ne pas sur-grader la tumeur. Seuls les noyaux

avec des caractéristiques claires de métaphase, télophase et anaphase sont comptés. Les noyaux hyperchromatiques ou les images d'apoptoses ne sont pas à prendre en compte (51,52).

Le diamètre de champs au grossissement x400 étant variable d'un microscope à l'autre, le compte mitotique doit être adapté en fonction de ce diamètre. Pour cela, Elston et Ellis ont établi un abaque qui permet d'obtenir le score de mitose. Il est recommandé de compléter le grade SBR par l'index mitotique, correspondant au nombre de mitose/mm². Dans un compte-rendu, il faudra donc préciser le compte mitotique, le score de mitoses et l'index mitotique. Plusieurs études ont démontré que l'index mitotique était un facteur prédictif important de réponse à la CNA situation adjuvante (53) comme en situation néoadjuvante (54,55).

Quand il n'y a pas 10 CFG (prélèvements de petites tailles, composante infiltrante de petite taille), il ne faut pas grader ou émettre une réserve sur le grade proposé.

Le grade histologique est un facteur pronostique important et indépendant pour le risque métastatique et la survie dans les groupes N+ et N- (56–58).

Une étude menée en 2002, a montré que le grade est un fort facteur prédictif de réponse à la CNA, indépendamment du type de régime de chimiothérapie utilisé (59).

2. Récepteurs hormonaux : RE et RP

Le RE α est un facteur de transcription nucléaire activé par la fixation de l'estradiol sur ce récepteur entraînant la croissance et la différenciation cellulaire (60).

Le RP est également un facteur de transcription activé par la progestérone et dont l'activité est régulée par la liaison de l'œstrogène sur le récepteur à l'œstrogène. Les RP indiquent donc, de manière indirecte, que la voie des œstrogènes est fonctionnelle. Les RP sont impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire.

Tous les cancers du sein infiltrants doivent bénéficier d'une étude des RH. L'évaluation se fait par technique immunohistochimique sur biopsie ou sur PO. Seul le marquage nucléaire granuleux quel que soit son intensité est à prendre en compte. La valeur du marquage s'apprécie en évaluant le pourcentage de cellules carcinomateuses infiltrantes positives par rapport à l'ensemble des cellules carcinomateuses infiltrantes. Le résultat est exprimé en pourcentage en arrondissant à la dizaine et en intensité moyenne de marquage (faible/moyenne/intense).

Pour rappel, en France, le seuil de positivité des RE et RP est de 10%. L'ASCO/CAP et l'OMS 2012 retiennent le seuil de 1%. Cependant, la pertinence du seuil de 10% a été consolidée pour la prescription d'une hormonothérapie (61) qui montre que seulement une minorité de tumeurs exprimant les RE avec un % de cellules tumorales de 1 à 10% présente un profil moléculaire de type luminal.

Les RH doivent être réévalués sur PO après CNA en cas de reliquat tumoral infiltrant important ou de négativité des RH sur biopsie, car en cas de positivité la patiente est éligible à une hormonothérapie adjuvante.

La fiabilité de la technique IHC dépend d'une technique rigoureuse et du respect de certaines règles établies par le GEPICIS (62).

Les RH ont une valeur pronostique mais surtout une valeur prédictive de la réponse à l'hormonothérapie. La valeur du RP n'est pas toujours prise en compte dans les décisions thérapeutiques. Les tumeurs doublement positives (RE+/RP+) sont plus hormonosensibles que les tumeurs dissociées (RP+/RE- ou RE+/RP-). Les tumeurs double négative (RE-/RP-) sont non hormonosensibles.

3. H-SCORE

Le HSCORE est un score d'évaluation semi-quantitative prenant en compte l'intensité et la distribution de la coloration de immunomarqueurs RE et RP (63). Le HSCORE est obtenu en additionnant les pourcentages de noyaux colorés à chaque intensité, multipliés par l'intensité pondérée de la coloration.

On distingue 4 catégories d'intensité avec 0 (aucune coloration), 1+ (faible mais détectable au-dessus du contrôle), 2+ (distinct) et 3+ (fort, avec une transmission lumineuse minimale à travers les noyaux colorés). Le résultat s'exprime en % dont les valeurs sont comprises entre 0 et 300.

4. Index de prolifération Ki67

a) Définition

L'antigène Ki67 est une protéine nucléaire et nucléolaire codée par le gène MKI-67 situé sur le chromosome 17 et impliquée dans les étapes précoces de la synthèse de la polymérase. Le Ki67 est un

marqueur de prolifération exprimé dans le noyau des cellules lors des phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire. La prolifération est évalué par méthode immunohistochimique avec l'anticorps anti-Ki67.

b) Évaluation immunohistochimique

La principale critique du Ki67 est son manque de reproductibilité inter-observateur dû à un manque de standardisation des techniques et des méthodes de notation, introduisant une grande variabilité dans les résultats (64). En conséquence, ce biomarqueur n'est toujours pas complètement intégré dans la prise de décision clinique, les cliniciens préfèrent se tourner vers les signatures moléculaires qu'ils considèrent plus fiables. Dans ce contexte, un groupe international de chercheurs ayant une grande expertise dans l'évaluation du Ki67 s'est réuni pour proposer des recommandations détaillées sur l'évaluation pré-analytique et analytique, l'interprétation et la notation du Ki67 sur la base de données actuelles dans le but d'harmoniser la méthodologie et de mettre en place une méthodologie reproductible (65). Ce groupe a convenu que la mesure du Ki67 par l'IHC était le test actuel de choix pour mesurer et surveiller la prolifération des tumeurs.

Les exigences pré-analytiques sont identiques à celles des autres marqueurs évalués dans le cancer du sein (RE, RP et HER2)(66).

L'anticorps monoclonal de souris anti-Ki67 humain, le clone MIB1, est considéré comme le gold standard. Pour valider la technique, un témoin interne doit être positif (cellules glandulaires normales, lymphocytes) et un témoin externe (appendice) est recommandé, surtout en l'absence de témoin interne.

Seuls les marquages nucléaire et nucléolaire sont à considérer comme des marquages positifs quel que soit leur intensité, c'est-à-dire allant d'un marquage punctiforme faible à nucléaire homogène. Les noyaux négatifs ne présentent qu'une contre-coloration bleue de l'hématoxyline, sans coloration nucléaire brune.

L'appréciation peut se faire par eyeballing (appréciation à l'œil en balayant la lame) ou par comptage manuel (au microscope optique, sur écran ou sur photo papier, avec ou sans compteur). L'évaluation doit se faire sur 500 à 1000 cellules tumorales invasives. L'index Ki67 est exprimé en pourcentage de cellules positives par rapport au nombre total de cellules invasives dans la zone évaluée.

Deux cas de figures existent selon si le marquage est homogène ou hétérogène.

En cas de marquage homogène, il est recommandé de compter au moins trois CFG (objectif ×40) choisis au hasard.

En cas de marquage hétérogène, deux types d'hétérogénéité prédominent. L'hétérogénéité peut se voir avec une positivité plus importante en périphérie qu'au centre, dans ce cas, il faut analyser trois champs

à la périphérie de la tumeur. L'hétérogénéité peut également se voir sous la forme de hot spot, c'est-à-dire des zones au sein de la tumeur, où le marquage est très fort. Dans ce cas, il faut intégrer ces données dans le score global sans se restreindre uniquement à ces hot spot. Pour cela, il faut sectoriser en 2 à 3 surfaces de niveaux d'index Ki67 différents à faible grossissement et apprécier la part occupée par chaque surface. Puis, il faut évaluer l'index Ki67 pour chaque surface sur 1 CFG représentatif tout en prenant en compte la densité cellulaire (une tumeur modérément cellulaire comporte environ 500 à 700 cellules tumorale). Le site de l'AFAQAP propose un outil d'aide à la lecture du Ki67 pour les cas hétérogènes avec hot spot (67).

En 2018, ce groupe de travail a créé une application gratuite pour aider à calculer le Ki67 selon un comptage manuel pour la méthode globale pondérée ou non pondérée et la méthode des hot spot (68). Dans ces 3 cas, 4 champs de 100 cellules sont à analyser. Pour chaque champ, le compte des noyaux tumoraux invasifs positifs et négatifs se fait à fort grossissement en partant du haut du champ sélectionné puis selon un comptage comme une machine à écrire jusqu'à 100 noyaux.

Pour déterminer la méthode utilisée, la première étape consiste à examiner l'ensemble de la section tumorale à faible grossissement puis d'estimer les pourcentages de la tumeur invasive qui présentent des taux de Ki67 négatif, faible, moyen et élevé. Si la coloration est homogène sur l'ensemble du CI, c'est-à-dire un taux Ki67 égal sur toute la composante de la tumeur infiltrante, il faut indiquer 100 % dans le taux de Ki67 approprié, et 0 % pour les autres taux de Ki67. Pour chaque densité, le résultat correspond au pourcentage de cellules infiltrantes positives dans cette catégorie divisée par le pourcentage total de cellules invasives, le total multiplié par 100.

Pour la méthode globale non pondérée et des hot spots, le score est obtenu en comptant le nombre total de noyaux positifs divisés par le nombre total de noyaux de tumeurs comptés (dans le champ d'un hotspot, ou dans tous les champs pour la méthode globale).

Pour la méthode globale pondérée, le score est obtenu en pondérant le nombre de noyaux de tumeurs dans chaque champ évalué par le pourcentage estimé de la surface totale du cancer couverte par chaque densité de Ki67.

Le temps moyen nécessaire pour obtenir un score, une fois les champs sélectionnés, est de 3 à 4 minutes, quelle que soit la méthode utilisée.

Dans notre étude, nous avons utilisé la méthode globale pondérée car c'est la plus reproductible (69).

c) Seuil de l'index Ki67

Il n'existe pas de consensus sur le seuil de positivité dans la littérature aussi bien en ce qui concerne la valeur pronostique que prédictive du Ki67 (70). En France et dans la littérature, le seuil de 20% est le plus souvent utilisé dans les arbres décisionnels de traitement, mais la dernière conférence de consensus de Saint Gallen utilisent le seuil de 14%, seuil corrélé avec les données de la biologie moléculaire (13). Sans normalisation de la méthodologie, ces seuils ont une valeur limitée en dehors des études dont ils sont issus et des centres qui les ont réalisés.

d) Valeurs pronostique et prédictive de réponse à la chimiothérapie néoadjuvante

Bien que la détection immunohistochimique de l'antigène Ki67 soit utilisée depuis de nombreuses années pour évaluer la prolifération du cancer, ce marqueur n'est toujours pas recommandé pour la prise de décision thérapeutique d'une CNA (71). En effet, il existe une théorie générale selon laquelle les biomarqueurs de prolifération peuvent prédire la réponse au traitement systémique, les tumeurs très prolifératives répondant davantage à la chimiothérapie (72). Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de preuves solides que l'index Ki67 puisse servir d'outil pour identifier les patients qui bénéficieront d'une chimiothérapie (73).

La prolifération a un rôle pronostique majeur dans les tumeurs lumineales HER2- (28) qui ont un faible risque de métastase avant 5 ans comparé aux tumeurs HER2+ et aux tumeurs triples négatives. Après 5 ans, la courbe s'inverse avec un risque métastatique plus élevé pour les tumeurs de phénotype luminal. De plus, les tumeurs lumineales B ont un pronostic plus défavorable que les tumeurs lumineales A.

L'index Ki67 est facteur pronostic indépendant mais de moindre importance que le grade SBRm et le compte des mitoses (70). Malgré la corrélation robuste entre Ki67 et la survie globale avec une signification statistique, les chercheurs n'ont pas recommandé d'ajouter Ki67 aux indices pronostiques couramment utilisés (74).

La valeur pronostique de l'index Ki67 est démontrée sur les biopsies avant CNA et sur les reliquats tumoraux retrouvés après CNA, en l'absence de pCR. Cependant, le Ki67 sur PO après CNA a un impact pronostique plus fort que sur biopsie (75). Un index de prolifération élevé après CNA est associé à une survie prolongée en cas d'index bas (76).

5. Équation 3 de Magee

L'équation originale de Magee a été développée comme modèle immunohistochimique pour prédire le score de récurrence (RS) du test Oncotype Dx[®] (77,78). Le test Oncotype DX[®] est un test commercial qui analyse l'expression d'un panel de 21 gènes, dont RE, RP et HER2, à partir d'un échantillon tumoral FFPE par RT-PCR. Selon le niveau d'expression de chaque gène, un RS allant de 0 à 100 est calculé. Ce test est une signature moléculaire pronostique (72) et prédictive de réponse à la chimiothérapie en situation adjuvante (79–81) et néoadjuvante (82,83), les patientes présentant un RS élevé sont plus susceptibles de bénéficier d'une chimiothérapie.

Le score de récurrence peut être estimé en incorporant des variables histologiques et immunohistochimiques standards dans des équations donnant ainsi l'équation originale de Magee. En s'appuyant sur l'équation originale, Klein et *al.* ont publié trois équations de Magee supplémentaires (1, 2 et 3) qui sont des modèles multivariés utilisant différentes combinaisons de variables clinicopathologiques standards (taille de la tumeur, score de Nottingham, Ki-67, RE, RP et HER2)(78).

Dans notre étude, nous avons utilisé l'équation 3 de Magee, car elle ne requiert que des résultats semi-quantitatifs, immunohistochimiques (RE, RP, Ki67 et HER2) et de FISH (HER2), systématiquement déterminés par le pathologiste au diagnostic initial.

L'équation 3 de Magee est la suivante : $24,30812 + \text{H-SCORE RE} \times (-0,02177) + \text{H-score RP} \times (-0,02884) + (0 \text{ pour HER2 négatif}, 1,46495 \text{ pour HER2 équivoque ou } 12,75525 \text{ pour HER2 positif}) + \text{Ki-67} \times 0,18649$.

Le Ki67 est exprimé en pourcentage selon la méthode précisée dans le paragraphe Ki67.

Les scores de l'équation 3 de Magee sont divisés en 3 catégories de risque, de manière similaire à l'Oncotype Dx[®], à savoir, 0 à <18 (faible), 18 à <31 (intermédiaire), et 31 ou plus (élevé).

Il a été démontré que cette équation peut être utilisée comme une alternative rentable pour prédire le RS à partir de biopsies avant CNA dans les cancers du sein luminaux HER2- (84).

Par ailleurs, l'équation 3 de Magee a une valeur prédictive de réponse à la CNA dans les tumeurs lumineuses HER2- (85,86). Un score élevé est associé à une forte chance de pCR. Ces résultats montrent l'utilité de cette équation pour déterminer les groupes de patients qui tireront un bénéfice de la CNA, permettant d'éviter d'administrer une CNA pour rien avec les effets indésirables en conséquence.

La valeur pronostique de cette équation n'a cependant pas été clairement démontrée (87).

6. Score IHC4

Cuzick et *al.* ont développé le score IHC4, score pronostique, basé sur quatre marqueurs immunohistochimiques largement mesurés en pratique : RE, RP, HER2 et Ki-67 (88).

La formule initialement publiée était la suivante : $94.7 \times [(-0.100RE_{10} - 0.079 * RP_{10} + 0.586HER2_{neur0/1} + 0.240 \ln(1 + 10 \times Ki-67_{\%pos})]$. Le résultat du score Ki67 avait été initialement obtenu à partir d'une analyse automatisée d'images numériques, les auteurs ont par la suite adapté l'algorithme à une analyse visuelle du Ki67 : $94.7 \times [(-0.100RE_{10} - 0.079 * RP_{10} + 0.586HER2_{neur0/1} + 0.240 \ln(1 + 4 \times Ki-67_{\%pos})]$.

La variable RE₁₀ est obtenue en divisant le H-score de RE par 30 pour obtenir une variable entre 0 et 10. La variable RP₁₀ est obtenue en divisant le pourcentage de cellules positives aux RP par 10 pour obtenir une variable entre 0 et 10. La valeur d'HER2 est de 0 ou 1 avec un score de 0 pour les tumeurs 0, 1+ ou 2+ non amplifiées et un score de 1 pour les tumeurs 2+ amplifiée ou 3+. Le Ki67 est évalué en pourcentage de cellules positives selon la méthode précisée dans le paragraphe Ki67.

Le score IHC4 est un outil permettant de calculer le risque de récurrence à distance. Cet algorithme a été développé et validé dans les cancers du sein luminaux (88,89).

Certaines études suggèrent que c'est également est un facteur prédictif de réponse à la CNA dans les cancers du sein de type luminal (90,91).

7. Lymphocytes du stroma infiltrant la tumeur : sTILs

Les TILs correspondent à l'infiltration de la tumeur par des lymphocytes matures, des lymphocytes activés, des cellules lympho-plasmocytoïdes et des plasmocytes. On distingue les TILs stromaux (sTILs) situés dans le stroma, entre les amas tumoraux, et les TILs intra-tumoraux. Pour l'instant, il est recommandé de ne déterminer que les sTILs (92)

En 2014, Salgado et *al.* ont émis des recommandations sur l'évaluation des sTILs dans les cancers du sein (92). Les sTILs s'évaluent sur coupe HES fine au sein du stroma intra-tumoral sans prendre en compte la périphérie de la tumeur, les lésions de CIS, les lobules normaux ni les zones de nécrose souvent riches en éléments inflammatoires. Les cellules stromales mésenchymateuses, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes et les cellules tumorales altérées ne doivent pas être pris en compte.

La valeur des sTILs est obtenue en évaluant le pourcentage de la surface stromale occupée par les TILs, c'est-à-dire la surface occupée par les sTILs sur la surface totale stromale. Le pathologiste doit réaliser une évaluation complète des sTILs moyens dans la zone tumorale sans se focaliser sur les zones de hot

spot. Le résultat est une variable continue entre 0 et 100 %. Il est préférable de compter par incrément de 10%.

Dans tous les sous-types de cancer du sein, des sTILs élevés, déterminés sur la biopsie pré-thérapeutique, sont un facteur prédictif de bonne réponse à la CNA. Cependant, en ce qui concerne les critères de survie, il existe des différences majeures entre les sous-types. Pour les cancers du sein triple négatif et HER2+, les sTILs élevés sont un facteur de bon pronostic (93–95) avec une amélioration de la survie globale et de la survie sans maladie. Pour les tumeurs lumineuses HER2-, les sTILs élevés sont un facteur pronostique défavorable pour la survie globale avec un meilleur pronostic quand les sTILs sont faibles (93).

8. Évaluation histologique de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante avec le RCB

La réponse à la CNA est évaluée cliniquement, radiologiquement et histologiquement sur la PO mais l'examen histologique reste le gold standard pour évaluer la réponse thérapeutique.

Histologiquement, l'évaluation de la maladie résiduelle après CNA sur la tumeur et les ganglions peut se faire selon différentes classifications histologiques reconnues comme le RCB (7) ou les classifications de Chevallier et de Sataloff.

Le calcul du RCB se fait à partir de 6 variables, obtenues à partir d'un examen pathologique et entrées dans un algorithme disponible gratuitement sur Internet (96). Les 6 variables correspondent aux deux plus grandes dimensions de la tumeur évaluées microscopiquement en mesurant l'ensemble des foyers résiduels, la cellularité tumorale comprenant le pourcentage moyen de cellules carcinomateuses in situ et invasives par rapport à la surface tumorale, le pourcentage de CIS par rapport à la surface de cellules carcinomateuses totales, le nombre de ganglions positifs en comptant les cellules tumorales isolées (CTI) et le diamètre de la plus grande métastase. Chaque variable est précisée par Symmans et *al.* (96,97). En 2015, en raison d'un manque d'uniformité dans la définition de la réponse pathologique complète, un groupe de travail international mené par Provenzano et *al.* a émis des recommandations pratiques pour évaluer la maladie résiduelle (7). Ce groupe a admis que la présence d'embolus en l'absence de carcinome invasif ne correspond pas à une pCR. Ce groupe a proposé d'utiliser le score RCB comme évaluation standardisée internationale de la réponse histologique complète.

Une fois les critères remplis, on obtient 2 résultats : le score RCB (variable continue) et la classe RCB. Il existe 4 classes RCB avec la réponse histologique complète noté pCR, la classe I (maladie résiduelle minimale), la classe II (maladie résiduelle modérée) et la classe III (maladie résiduelle extensive).

Dans la classification RCB, une pCR correspond à l'absence de carcinome infiltrant et de métastases ganglionnaires, le CIS est accepté (ypT0N0 ou ypTisN0). La présence de carcinome infiltrant, de même que la présence de cellules tumorales isolées (CTI) entraîne un score RCB >0. Dans un étude réalisée à partir de 12 essais internationaux en situation néoadjuvante, Cortazar n'a pas retrouvé de différence significative, en terme de survie, entre ypT0/is ypN0 et ypT0 ypN0 (30).

Avant de conclure à une pCR, en raison de son impact pronostique, il faut s'assurer que la prise en charge macroscopique ait été bien réalisée.

Les taux de pCR varient selon le type histologique et le grade. Les CI de type non spécifique (CI-TNS) sont plus souvent en pCR que les carcinomes lobulaires infiltrants. De plus, les CI de grade III sont plus souvent en pCR que les CI de grade I ou de grade II (30).

Les taux de pCR varient également en fonction de la classe moléculaire avec des taux respectifs de pCR de 50,3% pour les tumeurs RE- HER2+ traitées par Trastuzumab (anti-HER2), 33,6% pour les tumeurs triples négatives, 16,2% pour les tumeurs RE+ HER2- de grade III et 7,5% pour les tumeurs RE+ HER2- de grade I ou de grade II (30).

Plusieurs études ont validé la valeur pronostique du système RCB pour prédire le risque de rechute à distance dans les tous les sous-types de cancers du sein traité par CNA (7,30,96,98). La pCR est un facteur de meilleur pronostic en termes de survie globale (99). Cependant, l'association de la pCR avec une meilleure survie se voit pour les CI-TNS mais pas pour les CLI. Cette association se retrouve également pour les CI de III et de grade II mais pas pour les grades I (30). L'association de la pCR avec une meilleure survie est également observée pour toutes les tumeurs luminales HER2- de grade III et pour toutes les tumeurs de RE- quel que soit le statut HER2 (30).

9. Emboles vasculaires

Un embole vasculaire (EV) est défini par la présence d'amas carcinomateux dans des petits vaisseaux en dehors de la masse tumorale principale, le plus souvent en périphérie d'un carcinome infiltrant (embolies péri-tumorales) (100). Les EV pris en considération sont situés dans les tissus mammaires normaux adjacents au carcinome infiltrant, en théorie, à une distance correspondant à au moins 1 champ microscopique au x400 de la bordure du carcinome infiltrant. Mais en pratique, de véritables EV peuvent être observés à moins de 1 CFG de la bordure de la tumeur.

Les EV sont situés au sein de lumières bordées d'un endothélium, souvent à proximité d'artères, veines ou filets nerveux, ce qui permet de les différencier de phénomène de rétraction artéfactuelle autour d'amas carcinomateux observés notamment dans les tissus sous-fixés.

Seules les images évidentes sont à prendre en compte.

La présence d'embolie péri-tumoraux est un facteur pronostique péjoratif indépendant pour la survie sans métastase et la survie globale, dans les tumeurs du sein N-, mais aussi dans les tumeurs du sein N+ où c'est un facteur indépendant pour la prédiction des récives locales (100,101).

10. Les signatures d'expression génique

Bien qu'étant en dehors du champ de notre thèse, il nous a semblé important de citer les signatures d'expression génique dans l'arsenal des facteurs pronostiques des cancers du sein de phénotype luminal HER2 négatif. Les signatures d'expression génique correspondent à des tests biologiques évaluant le niveau d'expression des ARN messagers de certains gènes à partir du tissu fixé d'une tumeur. Ces gènes sont impliqués dans la caractérisation, la progression et l'agressivité de la maladie.

Elles peuvent être utilisées en pratique clinique dans certains pays, quand elles sont disponibles et remboursées, pour la prise de décision d'une chimiothérapie adjuvante. Les patients définis à faible risque par une signature moléculaire peuvent être épargnés par la chimiothérapie alors que les patients définis à haut risque devront bénéficier d'une chimiothérapie. Chaque signature comporte un ensemble spécifique de gènes. Ces signatures ont un intérêt uniquement dans les tumeurs lumineales HER2-. Elles sont indiquées dans les tumeurs du sein lumineales HER2- à un stade précoce sans atteinte ganglionnaire (N-) ou avec 1 à 3 ganglions atteints (N+). Elles ont été développées dans le but d'améliorer la capacité à prédire le risque de récive du cancer du sein et d'identifier les patientes susceptibles de bénéficier d'une chimiothérapie adjuvante.

Les différentes signatures reconnues à l'heure actuelle pour prédire le risque individuel de récive de maladie sont Mammaprint® (102,103), Oncotype Dx® (72), Prosigna® (PAM50)(104,105), Endopredict® (106), Breast Cancer Index® (107,108) et le Genomic Grade Index® (109). L'utilité de tests MammaPrint® (110) et Oncotype Dx® (111) a été validée en clinique permettant de déterminer quels patients peuvent bénéficier d'une chimiothérapie adjuvante. La signature Oncotype Dx® a également montré sa valeur prédictive pour la réponse à la CNA (82,83).

Tableau 2. Principaux facteurs pronostiques et prédictifs histologiques dans les cancers infiltrants du sein

| | Facteurs pronostiques | Facteurs prédictifs |
|---|-----------------------|---------------------|
| Facteurs histologiques | | |
| Envahissement des ganglions axillaires | +++ | |
| Taille tumorale histologique | +++ | |
| Grade histologique | +++ | +++ |
| Compte des mitoses | ++ | +++ |
| Type histologique | ++ | |
| Emboles vasculaires péri-tumoraux | ++ | |
| Nécrose tumorale extensive | + | |
| Facteurs biologiques et moléculaires | | |
| Récepteurs hormonaux | ++ | +++ |
| Statut HER2 | ++ | +++ |
| Ki67 | +++ | pas démontré |
| Équation 3 de Magee | pas démontré | ++ |
| Score IHC4 | ++ | + |
| Signatures moléculaires | +++ | Oncotype Dx® |

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Dans le contexte de la chimiothérapie néoadjuvante des cancers du sein de phénotype luminal HER2 négatif, il nous a paru important de redéfinir d'une part, les facteurs prédictifs clinico-pathologiques de chimiosensibilité et d'autre part, les facteurs pronostiques à partir des données obtenues sur les microbiopsies pré-thérapeutiques et sur la pièce opératoire post-chimiothérapie.

Les objectifs de ce travail étaient donc :

- d'évaluer sur microbiopsie, la valeur prédictive des facteurs clinicopathologiques évalués en routine, de l'équation 3 de Magee, du score IHC4 et des sTILs ;
- d'évaluer sur microbiopsie et pièce opératoire, la valeur pronostique de certains de ces mêmes facteurs.

Notre étude porte sur une cohorte de 221 patientes présentant un carcinome mammaire de phénotype luminal HER2-, non métastatique et traité par chimiothérapie néoadjuvante suivie d'une chirurgie à l'Institut Bergonié (IB).

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée à partir de la base de données de l'IB entre janvier 2006 et décembre 2018. Sur les 221 biopsies examinées, 60 biopsies sont issues du laboratoire privé d'anatomie et cytologie pathologique Unilabs à Bruges. Les autres biopsies et l'ensemble des pièces opératoires ont été prélevées à l'Institut Bergonié. L'ensemble des lames et des blocs FFPE est disponible à l'IB.

Les lames HES réalisées avant 2012 et les lames HES des biopsies issues du laboratoire privé ont été refaites à l'IB.

Chaque biopsie et chaque pièce opératoire ont été relues par un pathologiste.

Pour chaque biopsie, nous avons fait une relecture des lames HES et des lames d'immunohistochimie (RE, RP, Ki67 et HER2) pour confirmer le phénotype luminal HER2- de la tumeur, le sous-type histologique, le grade d'Elston et Ellis et l'index mitotique. Nous avons analysé d'autres facteurs pour répondre à l'objectif de notre étude : sTILs, RE H-SCORE, RP H-SCORE, équation 3 de Magee et score IHC4.

Pour chaque pièce opératoire post-CNA, nous avons fait une relecture des lames pour établir le grade d'Elston et Ellis, l'index mitotique, la présence d'embolus vasculaires, l'index Ki67, les sTILs, le score RCB, la classe RCB et le stade ypTN.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Le cancer du sein - Les cancers les plus fréquents [Internet]. [cité 16 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-sein>
2. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 9 sept 2000;321(7261):624-8.
3. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive Factors and Breast Cancer. *Epidemiol Rev*. 1 janv 1993;15(1):36-47.
4. ANAES Service des recommandations et références professionnelles. Classification en 6 catégories des images mammographiques en fonction du degré de suspicion de leur caractère pathologique - correspondance avec le système BIRADS de l'American College of Radiology (ACR) [Internet]. 2002 [cité 16 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/ACR.pdf>
5. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 2018;36(20):2105-22.
6. Institut National du Cancer. Mise à jour 2011 des comptes rendus d'anatomopathologie : données minimales à renseigner pour une tumeur primitive [Internet]. 2011 [cité 14 août 2020]. Disponible sur: https://www.afaqap.fr/sites/default/files/donnees_minimales_acp_inca_2011_dec.pdf
7. Provenzano E, Bossuyt V, Viale G, Cameron D, Badve S, Denkert C, et al. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. sept 2015;28(9):1185-201.
8. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, Rijn M van de, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. août 2000;406(6797):747-52.
9. Sørli 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*. 11 sept 2001;98(19):10869-74.
10. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 sept 2003;100(18):10393-8.
11. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol*. 10 mars 2009;27(8):1160-7.
12. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. sept 2013;24(9):2206-23.
13. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. août 2011;22(8):1736-47.
14. Mac Gorgan G, Vincent-Salomon A, Arnould L. EPU Pathologie Mammaire. 2018.
15. Iwamoto T, Booser D, Valero V, Murray JL, Koenig K, Esteva FJ, et al. Estrogen receptor (ER) mRNA and ER-related gene expression in breast cancers that are 1% to 10% ER-positive by immunohistochemistry. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 mars 2012;30(7):729-34.
16. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol*. 20 avr 2020;38(12):1346-66.
17. Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, Curigliano G, Colleoni M, Dellapasqua S, et al. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res BCR*. 2014;16(3):R65.
18. Hicks J, Krasnitz A, Lakshmi B, Navin NE, Riggs M, Leibin E, et al. Novel patterns of genome rearrangement and their association with survival in breast cancer. *Genome Res*. déc

2006;16(12):1465-79.

19. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo W-L, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*. déc 2006;10(6):529-41.

20. 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*. 27 avr 2006;7:96.

21. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. oct 2012;490(7418):61-70.

22. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *The Lancet*. mars 2017;389(10074):1134-50.

23. Maran-Gonzalez A, Franchet C, Duprez-Paumier R, Antoine M, Barlier C, Becette V, et al. Recommandations du GEFPICS pour la prise en charge des prélèvements dans le cadre du traitement néoadjuvant du cancer du sein. *Ann Pathol*. déc 2019;39(6):383-98.

24. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative Chemotherapy: Updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 10 févr 2008;26(5):778-85.

25. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative Chemotherapy in Patients With Operable Breast Cancer: Nine-Year Results From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *JNCI Monogr*. 1 déc 2001;2001(30):96-102.

26. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. août 2019;30(8):1194-220.

27. Réseau Régional de Cancérologie Grand Est RR de cancérologie BF-C. Référence inter-régional de prise en charge du cancer du sein 2019. 2019.

28. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res BCR*. 2008;10(4):R65.

29. Stover DG, Coloff JL, Barry WT, Brugge JS, Winer EP, Selfors LM. The Role of Proliferation in Determining Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Gene Expression-Based Meta-Analysis. *Clin Cancer Res*. 15 déc 2016;22(24):6039-50.

30. 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. *The Lancet*. juill 2014;384(9938):164-72.

31. Cancer : recherche d'un déficit en enzyme DPD avant chimiothérapie [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 16 août 2020]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2966449/fr/cancer-recherche-d-un-deficit-en-enzyme-dpd-avant-chimiotherapie

32. Vincent L, Margueritte F, Uzan J, Owen C, Seror J, Pouget N, et al. Synthèse des recommandations nationales et internationales concernant les indications de la technique du ganglion sentinelle et du curage axillaire complémentaire après ganglion sentinelle positif dans la prise en charge des cancers du sein. *Bull Cancer (Paris)*. avr 2017;104(4):356-62.

33. Curigliano G, Burstein HJ, Winer EP, Gnant M, Dubsy P, Loibl S, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol*. août 2017;28(8):1700-12.

34. Lyman GH, Somerfield MR, Bosserman LD, Perkins CL, Weaver DL, Giuliano AE. Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 10 févr 2017;35(5):561-4.

35. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, et al. NCCN Guidelines Insights: Breast Cancer, Version 1.2017. *J Natl Compr Canc Netw*. avr 2017;15(4):433-51.

36. Classe J-M, Bordes V, Campion L, Mignotte H, Dravet F, Leveque J, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy After Neoadjuvant Chemotherapy for Advanced Breast Cancer: Results of Ganglion Sentinelle et Chimiothérapie Neoadjuvante, a French Prospective Multicentric Study. *J Clin Oncol*. 10 févr 2009;27(5):726-32.

37. Boileau J-F, Poirier B, Basik M, Holloway CMB, Gaboury L, Sideris L, et al. Sentinel Node Biopsy After Neoadjuvant Chemotherapy in Biopsy-Proven Node-Positive Breast Cancer: The SN FNAC Study. *J Clin Oncol*. 20 janv 2015;33(3):258-64.

38. Rhodes A, Jasani B. The oestrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive breast

tumour: a biological entity or a technical artefact? *J Clin Pathol.* janv 2009;62(1):95-6.

39. Group (EBCTCG) EBCTC. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet.* 27 août 2011;378(9793):771-84.

40. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet Lond Engl.* 14 mai 2005;365(9472):1687-717.

41. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer.* sept 2009;9(9):631-43.

42. Visvanathan K, Chlebowski RT, Hurley P, Col NF, Ropka M, Collyar D, et al. American society of clinical oncology clinical practice guideline update on the use of pharmacologic interventions including tamoxifen, raloxifene, and aromatase inhibition for breast cancer risk reduction. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 juill 2009;27(19):3235-58.

43. Iwamoto T, Booser D, Valero V, Murray JL, Koenig K, Esteva FJ, et al. Estrogen Receptor (ER) mRNA and ER-Related Gene Expression in Breast Cancers That Are 1% to 10% ER-Positive by Immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 1 mars 2012;30(7):729-34.

44. De Maeyer L, Van Limbergen E, De Nys K, Moerman P, Pochet N, Hendrickx W, et al. Does Estrogen Receptor–Negative/Progesterone Receptor–Positive Breast Carcinoma Exist? *J Clin Oncol.* 10 janv 2008;26(2):335-6.

45. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *The Lancet.* mars 2013;381(9869):805-16.

46. Burstein HJ, Lacchetti C, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KA, et al. Adjuvant Endocrine Therapy for Women With Hormone Receptor–Positive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol.* 10 févr 2019;37(5):423-38.

47. Institut National du Cancer S française de sénologie et de pathologie mammaire. Cancer du sein infiltrant non métastatique - Questions d'actualité - Rapport intégral. 2012.

48. Daveau C, Stevens D, Brain E, Berges O, Villette S, Moisson P, et al. Is regional lymph node irradiation necessary in stage II to III breast cancer patients with negative pathologic node status after neoadjuvant chemotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 oct 2010;78(2):337-42.

49. Huang EH, Tucker SL, Strom EA, McNeese MD, Kuerer HM, Buzdar AU, et al. Postmastectomy Radiation Improves Local-Regional Control and Survival for Selected Patients With Locally Advanced Breast Cancer Treated With Neoadjuvant Chemotherapy and Mastectomy. *J Clin Oncol.* 1 déc 2004;22(23):4691-9.

50. McGuire SE, Gonzalez-Angulo AM, Huang EH, Tucker SL, Kau S-WC, Yu T-K, et al. Postmastectomy Radiation Improves the Outcome of Patients With Locally Advanced Breast Cancer Who Achieve a Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Int J Radiat Oncol.* juill 2007;68(4):1004-9.

51. 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.* nov 1991;19(5):403-10.

52. van Diest PJ, Baak JPA, Matze-Cok P, Wisse-Brekemans ECM, van Galen CM, Kurver PHJ, et al. Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens: Results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Hum Pathol.* juin 1992;23(6):603-7.

53. Andre F, Khalil A, Slimane K, Massard C, Mathieu MC, Vignot S, et al. Mitotic index and benefit of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 mai 2005;23(13):2996-3000.

54. Bollet MA, Sigal-Zafrani B, Gambotti L, Extra J-M, Meunier M, Nos C, et al. Pathological response to preoperative concurrent chemo-radiotherapy for breast cancer: results of a phase II study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. sept 2006;42(14):2286-95.

55. Chakravarthy AB, Kelley MC, McLaren B, Truica CI, Billheimer D, Mayer IA, et al. Neoadjuvant concurrent paclitaxel and radiation in stage II/III breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 mars 2006;12(5):1570-6.

56. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* août

2010;12(4):207.

57. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *J Clin Oncol.* 1 juill 2008;26(19):3153-8.
58. Dabakuyo TS, Bonnetain F, Roinot P, Poillot M-L, Chaplain G, Altwegg T, et al. Population-based study of breast cancer survival in Cote d'Or (France): prognostic factors and relative survival. *Ann Oncol.* 1 févr 2008;19(2):276-83.
59. Amat S, Penault-Llorca F, Cure H, Le Bouedec G, Achard J-L, Van Praagh I, et al. Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *Int J Oncol.* avr 2002;20(4):791-6.
60. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol Rev.* 1 juill 2007;87(3):905-31.
61. Ali HR, Dawson S-J, Blows FM, Provenzano E, Pharoah PD, Caldas C. Aurora kinase A outperforms Ki67 as a prognostic marker in ER-positive breast cancer. *Br J Cancer.* 22 mai 2012;106(11):1798-806.
62. Recommandations du GEFPICS concernant la phase pré-analytique pour l'évaluation de HER2 et des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein : mise à jour 2014. *Ann Pathol.* 1 oct 2014;34(5):366-72.
63. Kinsel LB, Szabo E, Greene GL, Konrath J, Leight GS, McCarty KS. Immunocytochemical Analysis of Estrogen Receptors as a Predictor of Prognosis in Breast Cancer Patients: Comparison with Quantitative Biochemical Methods. :6.
64. Polley M-YC, Leung SCY, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG, et al. An International Ki67 Reproducibility Study. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 18 déc 2013;105(24):1897-906.
65. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 16 nov 2011;103(22):1656-64.
66. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol.* 20 avr 2020;38(12):1346-66.
67. AFAQAP. Notice d'utilisation de l'index Ki67 dans le cancer du sein [Internet]. 2014 [cité 7 juin 2020]. Disponible sur: https://www.afaqap.fr/index-ki67/notice-utilisation_Ki67_nov2014.pdf
68. The International Ki67 in Breast Cancer Working Group. Ki67-QC international working group: whole section scoring protocol (global method) [Internet]. 2018 [cité 6 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.ki67inbreastcancerwg.org/wp-content/uploads/2018/12/Ki67-Phase-3b-WS-protocol-v1.pdf>
69. Leung SCY, Nielsen TO, Zabaglo L, Arun I, Badve SS, Bane AL, et al. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration. *Npj Breast Cancer.* 18 mai 2016;2(1):1-9.
70. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 21 mai 2007;96(10):1504-13.
71. Beckmann MW, Blohmer J-U, Costa S-D, Diedrich K, Diel I, Eiermann W, et al. Zurich Consensus: German Expert Opinion on the St. Gallen Votes on 15 March 2009 (11th International Conference at St. Gallen: Primary Therapy of Early Breast Cancer). *Breast Care.* mai 2009;4(2):109-16.
72. Paik S, Kim C, Baehner FL, Park T, Wickerham DL, Wolmark N. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2004;10.
73. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* févr 2010;11(2):174-83.
74. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast Edinb Scotl.* août 2008;17(4):323-34.
75. Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho JS, et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1 juill 2009;116(1):53-68.
76. Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology (Phila).* 1 févr 2017;49(2):166-71.
77. Flanagan MB, Dabbs DJ, Brufsky AM, Beriwal S, Bhargava R. Histopathologic variables predict

Oncotype DXt Recurrence Score. *Mod Pathol.* 2008;7.

78. Klein ME, Dabbs DJ, Shuai Y, Brufsky AM, Jankowitz R, Puhalla SL, et al. Prediction of the Oncotype DX recurrence score: use of pathology-generated equations derived by linear regression analysis. *Mod Pathol.* mai 2013;26(5):658-64.

79. 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.* 19 nov 2015;373(21):2005-14.

80. 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.* 12 juill 2018;379(2):111-21.

81. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 10 août 2006;24(23):3726-34.

82. Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J, et al. Gene Expression Profiles in Paraffin-Embedded Core Biopsy Tissue Predict Response to Chemotherapy in Women With Locally Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 10 oct 2005;23(29):7265-77.

83. Pease AM, Riba LA, Gruner RA, Tung NM, James TA. Oncotype DX® Recurrence Score as a Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Surg Oncol.* 1 févr 2019;26(2):366-71.

84. Soran A, Tane K, Sezgin E, Bhargava R. The Correlation of Magee Equations™ and Oncotype DX® Recurrence Score From Core Needle Biopsy Tissues in Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy in ER+ and HER2– Breast Cancer. *Eur J Breast Health.* 1 avr 2020;16(2):117-23.

85. Farrugia DJ, Landmann A, Zhu L, Diego EJ, Johnson RR, Bonaventura M, et al. Magee Equation 3 predicts pathologic response to neoadjuvant systemic chemotherapy in estrogen receptor positive, HER2 negative/equivocal breast tumors. *Mod Pathol.* août 2017;30(8):1078-85.

86. Bhargava R, Esposito NN, O'Connor SM, Li Z, Turner BM, Moisini I, et al. Magee Equations™ and response to neoadjuvant chemotherapy in ER+/HER2-negative breast cancer: a multi-institutional study. *Mod Pathol.* 13 juill 2020;1-8.

87. Chen Y-Y, Tseng L-M, Yang C-F, Lien P-J, Hsu C-Y. Adjust cut-off values of immunohistochemistry models to predict risk of distant recurrence in invasive breast carcinoma patients. *J Chin Med Assoc.* déc 2016;79(12):649-55.

88. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, et al. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health Recurrence Score in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 10 nov 2011;29(32):4273-8.

89. Abubakar M, Figueroa J, Ali HR, Blows F, Lissowska J, Caldas C, et al. Combined quantitative measures of ER, PR, HER2, and KI67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer. *Mod Pathol.* 2019;32(9):1244-56.

90. Elsamany S, Elmorsy S, Alzahrani A, Rasmy A, Abozeed WN, Mohammed AA, et al. Predictive Value of IHC4 Score for Pathological Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2015;16(17):7975-9.

91. Sheri A, Smith IE, Hills M, Jones RL, Johnston SR, Dowsett M. Relationship between IHC4 score and response to neo-adjuvant chemotherapy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* juill 2017;164(2):395-400.

92. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* févr 2015;26(2):259-71.

93. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* janv 2018;19(1):40-50.

94. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol.* 20 sept 2014;32(27):2959-66.

95. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(Pt 2):16-25.

96. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of Residual Breast Cancer Burden to Predict Survival After Neoadjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1 oct 2007;25(28):4414-22.
97. The university of Texas MD Anderson Cancer Center WFS. Detailed Pathology Methods for Using Residual Cancer Burden [Internet]. 2007 [cité 7 juin 2020]. Disponible sur: https://www.mdanderson.org/education-and-research/resources-for-professionals/clinical-tools-and-resources/clinical-calculators/calculators-rcb-pathology-protocol2.pdf?_ga=2.66923246.1766407703.1591548652-1228020703.1591548652
98. Symmans WF, Wei C, Gould R, Yu X, Zhang Y, Liu M, et al. Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. *J Clin Oncol*. 1 avr 2017;35(10):1049-60.
99. Wang-Lopez Q, Chalabi N, Abrial C, Radosevic-Robin N, Durando X, Mouret-Reynier M-A, et al. Can pathologic complete response (pCR) be used as a surrogate marker of survival after neoadjuvant therapy for breast cancer? *Crit Rev Oncol Hematol*. 1 juill 2015;95(1):88-104.
100. de Mascarel I, Bonichon F, Durand M, Mauriac L, MacGrogan G, Soubeyran I, et al. Obvious peritumoral emboli: an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of 1320 node-negative breast cancers. *Eur J Cancer*. janv 1998;34(1):58-65.
101. Ragage F, Debled M, MacGrogan G, Brouste V, Desrousseaux M, Soubeyran I, et al. Is it useful to detect lymphovascular invasion in lymph node-positive patients with primary operable breast cancer? *Cancer*. 2010;116(13):3093-101.
102. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 19 déc 2002;347(25):1999-2009.
103. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. janv 2002;415(6871):530-6.
104. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol*. 10 mars 2009;27(8):1160-7.
105. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 nov 2010;16(21):5222-32.
106. 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 Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 sept 2011;17(18):6012-20.
107. Ma X-J, Salunga R, Dahiya S, Wang W, Carney E, Durbecq V, et al. A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 mai 2008;14(9):2601-8.
108. Jerevall P-L, Ma X-J, Li H, Salunga R, Kesty NC, Erlander MG, et al. Prognostic utility of HOXB13:IL17BR and molecular grade index in early-stage breast cancer patients from the Stockholm trial. *Br J Cancer*. 24 mai 2011;104(11):1762-9.
109. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 15 févr 2006;98(4):262-72.
110. 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*. 25 août 2016;375(8):717-29.
111. Sparano JA. TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx). *Clin Breast Cancer*. oct 2006;7(4):347-50.

Predictive and prognostic values of tumor-infiltrating lymphocytes, Magee Equation 3 and IHC4 in luminal HER2-negative breast cancer treated by neoadjuvant chemotherapy

Running title: sTIL, Magee and IHC4 in luminal breast cancer.

Chloé Delfour^{1,2}, Marc Debled³, Houda Ben Rejeb¹, Valérie Velasco¹, Sophie Auriol⁴, Véronique Brouste⁵,
Nathalie Quenel-Tueux³, Hervé Bonnefoi^{2,3,6}, Gaëtan MacGrogan^{1,6}

¹Department of Biopathology, Institut Bergonié, Comprehensive Cancer Center, F-33000 Bordeaux, France

²University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

³Department of Medical Oncology, Institut Bergonié, F-33000 Bordeaux, France

⁴Department of Surgery, Institut Bergonié, F-33000 Bordeaux, France;

⁵Department of Clinical Research and Medical Information, Institut Bergonié, F-33000 Bordeaux, France

⁶INSERM U1218, F-33000 Bordeaux, France

Corresponding author:

Gaëtan MacGrogan, Department of Biopathology, Institut Bergonié, 229, Cours de l'Argonne 33076
Bordeaux cedex

Mail: g.macgrogan@bordeaux.unicancer.fr

Phone: 3355633323

ABSTRACT

BACKGROUND: The indications of neoadjuvant chemotherapy (NAC) for patients with estrogen receptor (ER)-positive HER2 negative early breast cancer (BC) remain controversial. We assessed the predictive and prognostic values of clinicopathological factors, stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTIL), Magee equation 3 and IHC4 score in luminal Her2-negative BC treated by NAC.

METHODS: 221 patients with ER+HER2- early BC treated with NAC followed by surgery, were included in the study. Histological grade, sTIL, Magee equation 3, IHC4, Ki67 and Residual Cancer Burden (RCB) were determined on pre-treatment core biopsies and/or on surgical specimens.

RESULTS: sTIL (HR = 5.030, CI95% [2.027-12.479], $P = 0.0005$) and grade (HR = 4.291, CI95% [1.783-10.324], $P = 0.0011$) were independent factors associated with RCBO/1. Independent prognostic factors for DRFI before chemotherapy were clinical stage (HR = 3.570, CI95% [1.990-6.404], $P < 0.0001$) and IHC4 (HR = 9.307, CI95% [3.251-26.640], $P < 0.0001$) and after chemotherapy were Ki67 (HR = 5.816, CI95% [2.688-12.584], $P < 0.0001$), vascular emboli (HR = 2.484, CI95% [1.366-4.516], $P = 0.0029$) and grade (HR = 5.395, CI95% [1.164-24.995], $P = 0.0312$).

CONCLUSIONS: These findings enhance the value of sTIL and grade as tools for aiding chemotherapy decision-making and IHC4 and Ki-67 for assessing prognosis in HER2-negative luminal BC.

BACKGROUND

Breast cancer (BC) is the most frequent cancer in women worldwide, both in the developed and less developed countries, and it's a leading cause of death from cancer. In 2011, 508 000 women died due to BC¹. BC is a heterogeneous disease with varied morphological appearances and molecular features. Subtypes can be defined by genetic array testing²⁻⁴ or approximations of this classification using immunohistochemistry⁵. Tumors expressing the estrogen receptor alpha (ER), also named luminal tumors, represent approximately 80% of invasive BC. A classification of luminal breast tumors was proposed by the St Gallen conference in 2013⁵ and further refined by Maisonneuve et al. in 2014⁶. It distinguishes the Luminal A and the Luminal B HER2-negative intrinsic molecular subtypes. The presence of hormone receptors in tumors is correlated with the efficacy of adjuvant endocrine therapy with a significant reduction in recurrence and mortality in early BC⁷⁻⁹.

A neoadjuvant systemic therapy approach is more and more often applied to the treatment of BC^{10,11}. Neoadjuvant systemic therapies (chemotherapy and/or endocrine therapies) are indicated for HER2-positive disease, triple-negative breast cancer (TNBC), inflammatory BC and locally advanced disease, whatever phenotype^{12,13}. The COVID-19 pandemic has accelerated this approach with the use of primary systemic therapy to postpone surgery after confinement¹⁴.

For luminal breast tumors, neoadjuvant hormone therapy or neoadjuvant chemotherapy (NAC) are two different options. Unlike TNBC and HER2-positive disease, most luminal tumors display low neoadjuvant chemosensitivity and achieve less often pathological complete response (pCR). Response to chemotherapy has proven to be a strong predictor of outcome in HER2-positive disease and TNBC, with patients achieving pCR demonstrating improved survival compared with those achieving less than a pCR. However, pCR in luminal BC is not prognostic in grade I/II tumors whereas it is associated with better prognosis in grade III tumors¹⁵.

Concerning proliferation, while TNBC and HER2-positive tumors have mostly high proliferation scores, ER-positive/HER2-negative tumors display a wide range of values, encompassing the low values and the high values typical for ER-negative/HER2-negative and HER2-positive tumors. Previous studies have shown that luminal BC chemosensitivity depends on the level of cellular proliferation; more highly proliferative tumors are associated with a greater proportion of pCR after NAC¹⁶.

Several multi-gene signatures are available to determine response to NAC^{4,16–20}. Their widespread use in routine practice is still being debated, due to several reasons including their cost and availability. In this context, equations incorporating standard immunohistochemical variables were developed to provide useful prognostic and predictive information. The two main equations, IHC4 score²¹ and Magee equation 3^{22,23} were validated to be prognostic²⁴ and to predict the response to NAC^{25–27} in patients with luminal BC.

Recent studies have demonstrated the impact of the immune microenvironment on the chemosensitivity of BC²⁸. A high stromal tumor infiltrating lymphocyte (sTIL) score is associated with increased response to neoadjuvant chemotherapy in triple negative BC, Her2-positive BC and also Luminal Her2-negative BC^{29,30}.

Given this data we decided to assess the predictive and prognostic values of current clinicopathological factors, Magee equation 3 and IHC4 score as well as sTIL in luminal Her2-negative BC treated by neoadjuvant chemotherapy in an independent cohort of patients treated in a single institution.

MATERIALS AND METHODS

Study population and tumor material

Two hundred and seventy-three patients, with ER-positive and HER2-negative tumors and treated by NAC followed by surgery for primary BC in our institute, were included in the study. The pre- and post-treatment samples were available for review. Patients were identified retrospectively as a consecutive cohort from a prospectively maintained hospital research database between January 2006 and December 2018. Patients with a distant metastasis at the time of diagnosis, who did not undergo surgery in our institute, with a HER-2 positive tumor, who had undergone anti-HER2 treatment, who were male, who were less than 18 years, who had not given consent, were excluded from the study. Similarly, patients whose pathological material was not available or insufficient for review were also excluded. Finally, 221 patients were included in this study. Patients were informed of the study project and those who consented to use their tumor material were included in this study. This study was approved by the institutional review board of Institut Bergonié and data collection was in compliance with the Jardé law reference methodology 004 (MR-004).

Treatment

All 221 patients in this study underwent NAC. The majority (98.2%) received sequentially an anthracycline-containing regimen and taxanes [(median number of cycles: 6 (4-16)]. Four patients were treated with other protocols: two received anthracyclines only, one received anthracyclines with alkylating agents and one received a taxane with alkylating agents. All patients received adjuvant radiotherapy. The majority (99.1%) were treated by adjuvant endocrine therapy (median duration of therapy: 60 months).

Pathological evaluation

Hematoxylin and eosin stained (H&E) slides, ER, PR, HER2 and Ki67 immunostains on pre-NAC biopsy specimens of all patients were reviewed to confirm the luminal HER2-negative tumor status, tumor subtype, Elston & Ellis (E&E) grade and mitotic index. For the purpose of this study supplementary factors including: sTIL score, ER H-SCORE, PR H-SCORE, Magee equation 3 score and IHC4 score were assessed. Likewise, the post-NAC surgical specimens were reviewed to assess E&E grade, mitotic index, presence of lymphovascular invasion, and Ki67 index. Furthermore, sTIL score, residual invasive carcinoma cellularity, ypTN stage, Residual Cancer Burden (RCB) index and RCB class were assessed on the same specimens.

The mitotic count was defined as the number of mitotic figures in 10 consecutive high-power fields. The mitosis score, depending on the field diameter, was obtained from an abacus provided by the Royal College of Pathologists³¹. The mitotic index was defined as the number of mitoses per 10 consecutive high-power fields divided by the surface area of those 10 high power fields. This count was reported by mm².

sTIL evaluation was performed on one representative H&E section of the biopsy and surgical specimens according to the recommendations of the international Immuno-Oncology Biomarker Working Group^{32,33}.

Peritumoral emboli were defined by the presence of neoplastic emboli within vascular lumina in areas adjacent to but outside the margins of the invasive carcinoma³⁴.

Immunohistochemical stainings were performed in each case on 3- μ -thick serial sections from a representative FFPE tumor block of the biopsy (ER, PR, Her2, Ki67) and surgical specimens (Ki67). The immunohistochemical study was carried out on a Benchmark[®]ULTRA (ROCHE-VENTANA) automat with the UltraView Universal DAB (760–500) or OptiView DAB IHC (760–700) detection kits according to the protocols of the different primary antibodies used. Detailed information is provided in Supplementary Materials (Table S1).

A negative ER and/or PR status was defined by the presence of less than 1% of positive tumor cells. HER-2 status was determined according to the 2014 French National GEPFICS's recommendations³⁵.

The H-SCORE was derived by summing percentages of cells stained at each intensity multiplied by the weighted intensity³⁶. This score was performed for ER (ER H-SCORE) and PR (PR H-SCORE) immunostains.

Ki67 index was determined according to the international recommendations on the assessment of Ki-67 in BC³⁷ with a free mobile application implementing this scoring protocol. This application helps determine the number of fields to score and calculate the final Ki67 index. We used the unweighted Ki67 to calculate the indexes³⁸.

Luminal A tumors were defined as estrogen receptor (ER)-positive and HER2-negative with low Ki-67 positivity (<14%) or with intermediate Ki-67 positivity (14% to 19%) and high progesterone receptor (PR) levels ($\geq 20\%$). Luminal B HER2-negative tumors were defined as ER-positive and HER2-negative with intermediate Ki-67 expression (14% to 19%) and low PR levels (<20%) or with high Ki-67 positivity ($\geq 20\%$)⁶.

Magee Equation 3

Pre-therapy ER, PR, HER2 and Ki-67 results obtained from the biopsies were used to calculate Magee Equation 3 scores, using the equation: $24.30812 + \text{ER H-score} \times (-0.02177) + \text{PR H-score} \times (-0.02884) + (0 \text{ for HER2 negative, } 1.46495 \text{ for equivocal, } 12.75525 \text{ for HER2 positive}) + \text{Ki-67 index} \times 0.18649$. Due to our population selection, HER2 was scored 0. Magee scores were divided into 3 categories similar to Oncotype DX, ie, 0 to <18 (low), 18 to <31 (intermediate), and 31 or higher scores (high)²³.

IHC4 score

Similarly, the IHC4 score was calculated using the pre-therapy IHC markers, ER, PR, HER2 and Ki-67 and the following equation: $94.7 \times [(-0.100ER_{10} - 0.079 * PR_{10} + 0.586HER2_{neur0/1} + 0.240 \ln(1 + 4 \times Ki-67_{index})]$. ER was quantified by using the H-score. The variable ER₁₀ was obtained by dividing the HSCORE by 30 to obtain a variable with a range of 0 to 10. PR was scored as a percentage of cells staining positive. PR₁₀ was obtained by dividing this percentage by 10 to obtain a variable with a range of 0 to 10. Again, due to our population selection, HER2 was scored 0²¹.

RCB index

The extent of residual disease in the post-treatment surgical resection specimen was evaluated as described by Symmans et al.³⁹. The RCB index of the tumors in our series was categorized into one of four classes: pathological complete response (RCB-0), minimal residual disease (RCB-I), moderate residual disease (RCB-II), or extensive residual disease (RCB-III). pCR corresponds to ypT0/Tis and ypN0 stages according to the ypTN stage of the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the 9.4 SAS software version (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

The qualitative data were described by their numbers and percentages, the quantitative data by their medians and their ranges [min-max]. The quantitative data were analyzed either as continuous variables or were categorized in two groups using predefined cutoffs: 5% and 20%, for sTIL and Ki67, respectively or three groups using the tertile values as thresholds (mitotic index, Magee equation 3, IHC4). In the absence of consensus regarding the ideal cut point for Ki67³⁷, we chose 20%, as it is the one we use in clinical practice and it is coherent with what has been previously published^{5,6,40}.

For assessing the predictive value of the different factors, the associations between RCB index and pre NAC clinicopathological variables, sTIL, Magee equation 3 and IHC4 score, obtained from the biopsy specimens, were analyzed using the χ^2 test for qualitative data and Kruskal Wallis test for continuous quantitative data. We defined two groups of tumor response to chemotherapy, with the responder group corresponding to RCBO and RCB1 (RCBO/RCB1) cases and the non-responder group corresponding

to RCB2 and RCB3 (RCB2/RCB3) cases. We chose this dichotomy because ER+ disease has been associated with a favorable long-term outcome even in the presence of minimal or minimal proliferative disease following neo-adjuvant chemotherapy ⁴¹. Multivariate analysis was performed with a binary logistic regression procedure using the descending and stepwise options.

For assessing the prognostic value of the different factors, distant recurrence-free interval (DRFI) was evaluated. DRFI was defined as the time interval between the surgery date and the date of death from BC or distant recurrence/metastases, whichever occurred first ⁴². Follow-up times were censored at last contact if no distant relapse had occurred or if patients had died without distant relapse. The follow-up was calculated using the inverse Kaplan-Meier method, where deaths are censored. For the prognosis study pre NAC variables including clinicopathological variables, sTIL, Magee equation 3, and IHC4 score obtained from the biopsy specimens were assessed as well as post NAC variables obtained from the surgical specimens, including RCB index, E&E grade, mitotic index, Ki-67 index, sTIL and vascular emboli. The Kaplan-Meier method was used to estimate DRFI and OS, and the results were compared between groups with log-rank tests.

For the univariate analysis of DRFI, hazard ratios (HR) and 95% confidence interval (95%CI) were calculated with the Cox proportional hazard regression model, P Wald is also reported.

Only variables with $P < 0.05$ in the univariate analysis were included in multivariate analyzes using a Cox model with the stepwise and descending procedures to investigate their prognostic value. The proportionality of the risks was verified by the schoenfeld test. A P-value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Population and tumor characteristics

Tables 1, 2 and 3 show the detailed clinico-pathological characteristics of the patient cohort.

Among the 221 patients included in this study, a total of 134 (60.6%) patients had cT2 disease. The invasive carcinomas were of no special type in 202 cases (91.4%) and lobular in 19 cases (8.6%).

Predictive value of pretherapeutic clinicopathological factors obtained from the biopsies for response to NAC

Results of univariate and multivariate analyses are reported in **Table 4**.

Thirty-three patients (15%) achieved RCB0/RCB1, 20 were RCB0 and 13 were RCB1, whereas 188 (85%) achieved RCB2/RCB3, 113 were RCB2 and 75 were RCB3.

Prediction: univariate analysis

By univariate analysis, using categorical variables, the following factors were significantly associated with RCB0/RCB1: sTIL, E&E grade, Ki67 index, mitotic index, Magee equation 3, tumor phenotype, tubule formation and nuclear pleomorphism. Patients with a sTIL $\geq 5\%$ or an E&E grade III or Ki67 $\geq 20\%$ or a luminal B phenotype or tubule formation score 3 or nuclear pleomorphism score 3 had a better response to NAC. Patients with a low mitotic index (< 1.5 mitoses per mm^2) or Magee score < 18 were less likely to respond to NAC.

Age, pre-NAC clinical stage, histological subtype, mitotic score, ER H-SCORE, PR H-SCORE and IHC4 score showed no significant association with response to NAC.

Using continuous variables, sTIL, Ki67 index, Magee equation 3, IHC4 score and mitotic index were significantly associated with RCB0/RCB1.

Prediction: multivariate analysis

The multivariate analysis was adjusted to 7 factors: sTIL, E&E grade, Ki67 index, mitotic index, Magee equation 3, tumor phenotype and IHC4 score. Tubule formation and nuclear pleomorphism were significant by univariate analysis but were not included in the multivariate model because they are part of the definition of the E&E grade.

In a multivariate model not including sTIL, Magee equation 3 (OR = 1.104, CI95% [1.027-1.188], $P = 0.007$) and E&E grade (OR = 2.960, CI95% [1.279-6.846], $P = 0.011$) were independent factors.

When sTIL were included in the multivariate model, Magee equation 3 didn't remain significant whereas sTIL and E&E grade were independent factors associated with RCB0/1.

Patients with sTIL $\geq 5\%$ or E&E grade III had a better response to NAC. RCB0/RCB1 was achieved in 15 (8.9%) of 168 patients with low sTIL ($<5\%$) and 18 (34%) of 53 patients with high sTIL ($\geq 5\%$).

RCB0/RCB1 was achieved in 12 (8.2%) of 147 patients with E&E grade I+II and 21 (28.8%) of 73 patients with grade III.

Prognosis (DRFI)

Median follow-up was 6.5 years [79.8 months, 95%CI (72.8-91.2)]. At last follow-up, 165 patients were alive without cancer and 43 (19.5%) had died, out of which 39 breast cancer-specific deaths were observed (all metastatic). One other death was due to uterine carcinosarcoma and three patients died from another cause. Four patients (1.8%) suffered a contralateral BC, five patients (2.3%) had a locoregional relapse out of which two suffered from distant metastasis. Forty-eight patients (21.7%) developed a distant metastasis nine of whom were still alive at last follow up. The most frequent metastatic sites were liver, bone and brain. The majority of metastatic patients had multiple metastatic sites (37/48).

Overall 5-year and 10-year survival rates were 91.2% (95% CI [85.9-94.5]) and 68.6% (95% CI [58.6-76.6]), respectively.

The DRFI at 3, 5 and 10 years were 89.2% (95% CI [84.1-92.8]), 82.6% (CI 95% [76.3-87.3]) and 69.9% (CI95% [61.3-76.9]) respectively.

Prognostic value of pre-NAC factors obtained from biopsy specimens

Results from univariate and multivariate analyses are reported in **Table 5**.

DRFI: univariate analysis of prognostic factors obtained from biopsy specimens

One clinical criterion and four histological criteria were correlated to DRFI: pre-therapeutic clinical stage (cT), E&E grade, tumor phenotype, mitotic index, and tubule formation. Patients with a low cT (T0/T1/T2), E&E grade I or II, luminal A subtype, low mitotic index (<1.5 mitoses per mm^2) or score 1 or 2 for tubule formation had a better prognosis than those without these criteria.

Concerning immunohistochemical factors, DRFI was significantly longer for patients with IHC4 score <9.96, Magee equation 3 <18, Ki67 <20% and PR H-SCORE >200.

Age, mitotic score, ER H-SCORE, nuclear pleomorphism and sTILs showed no significant association with DRFI.

DRFI: multivariate analysis of prognostic factors obtained from biopsy specimens

By multivariate analysis, including cT, IHC4 score, E&E grade, Magee equation 3, tumor phenotype, and mitotic index, only the pretherapeutic clinical stage and IHC4 were independent prognostic factors for DRFI. Patients with cT3 or IHC4>9.96 had a significantly shorter DRFI compared to cT0/T1/T2 stage or IHC4 ≤9.96 tumors.

Prognostic value of post-NAC variables obtained from surgical specimens

Results from univariate and multivariate analyses are reported in **Table 6**.

DRFI: univariate analysis of prognostic factors obtained from surgical specimens

Five criteria were correlated with the DRFI: Ki67 index, vascular emboli, E&E grade, sTIL and mitotic score. Patients with Ki67 <20%, no vascular emboli, E&E grade I or II, sTIL <5%, or mitotic score 1 had a better prognosis than those without these criteria. Mitotic index and RCB showed no significant association with DRFI. However, when considering only patients with an E&E grade 3 tumor on biopsy, RCB was a significant prognostic factor: probability of non-metastasis at 3 years was 95.2% [70.7-99.3] for patients achieving RCB0/RCB1 compared to 80.8% [66.2-89.5] for RCB2/RCB3 patients (p=0.0255).

DRFI: multivariate analysis on surgical specimens

By multivariate analysis, including Ki67 index, vascular emboli, E&E grade and sTIL, only Ki67 index, vascular emboli and E&E grade were retained in the final model.

DISCUSSION

While there has been considerable progress in systemic treatment of BC over the last years, avoiding over-treatment has become a major objective. In patients with ER+ tumors, there remains a critical need to better identify tumors who will benefit from systemic chemotherapy, especially NAC. Multi-gene assays have shown some efficacy in selecting patients who will likely benefit from NAC^{17,20}. However, because of their cost and availability, their widespread use is not at present a reasonable alternative in everyday practice. For these reasons, it seems important to identify histological and immunohistochemical factors that predict the response to NAC.

Our findings show the independent chemo-predictive values of sTIL and E&E grade in luminal Her2-negative BC in the neoadjuvant setting. Magee equation 3 was also a predictive factor in our series. However, when sTIL was added to the multivariate model Magee equation 3 was excluded.

Pre-NAC clinical stage and IHC4 obtained from biopsies were the two independent prognostic factors for DRFI.

Post-NAC, proliferation factors obtained from surgical specimens like E&E grade, and Ki67 as well as vascular emboli were independent prognostic factors for DRFI.

Predictive and prognostic values of sTIL

Our study confirms a strong positive association of increased sTIL with increased RCB0/RCB1 after NAC. Denkert et al. previously identified the predictive value of sTIL in the neoadjuvant chemotherapy setting, in all molecular subtypes analyzed, including TNBC, Her2-positive BC as well as luminal HER2-negative BC³⁰. sTIL was a strong independent predictive factor in our study, outperforming Magee equation 3 in the multivariate analysis. Therefore, evaluation of sTIL may help to better select patient with luminal HER2-negative BC for NAC. Conversely, in this study, we showed that for luminal HER2-negative tumours, increased sTIL on post NAC residual disease, was an adverse prognostic factor for DRFI by univariate analysis but not multivariate. However, we didn't find any significant association between sTIL and DFRI in pre NAC biopsies. Denkert et al. have previously shown the negative effect of pre NAC sTIL on overall survival, but not disease free survival, in luminal Her2-negative tumors, contrarily to TNBC and HER2-positive BC³⁰.

Predictive and prognostic value: Ki67 and E&E grade

E&E grade and mitotic index were predictive factors of response to NAC in our cohort of luminal Her2-negative BC, E&E being an independent predictive factor in the multivariate analysis. Surprisingly, few studies have studied and found a predictive impact in of the E&E grade in the NAC setting ⁴³ and we would like to stress the utility of such a simple factor to implement in everyday practice for the decision to perform NAC.

Multiple studies have shown an independent prognostic significance of histological grade in BC in the adjuvant setting ⁴⁴⁻⁴⁶. In our study, E&E grade performed on the pretherapeutic biopsy specimens was prognostic by univariate analysis but not by multivariate analysis. This could be explained by the fact that luminal Her2-negative E&E grade III tumors that achieve pCR have a good prognosis, contrarily to E&E grade III tumors that do not ¹⁵, introducing a somewhat confounding effect of pretherapeutic grade on prognosis. However, in post NAC surgical specimens, E&E grade in residual disease was an independent prognostic factor, E&E grade III residual tumors showing the worse prognosis.

Our study showed that Ki67 levels $\geq 20\%$ were associated with increased RCB0/RCB1 rates in univariate analysis but it was not significant in multivariate analysis. Although immunohistochemical detection of the Ki67 antigen has been used for many years to assess cancer proliferation, there is no strong evidence at present, that the Ki67 index can be used as a tool to select patients who are receiving chemotherapy in the neoadjuvant setting ⁴⁷. This situation could be partly explained by the absence of a standardized procedure for Ki67 assessment in previously published studies. Our current study, although retrospective, is strengthened by the use of a standardized and reproducible methodology according to the recommendations of the international Ki67 in BC working group ^{33,37}.

On pre-NAC biopsy and on post-NAC surgical specimens, Ki67 was prognostic by univariate or multivariate analysis with a lower metastatic risk when Ki67 was $< 20\%$. A previous study by Jones and co-workers ⁴⁸ demonstrated the prognostic value of Ki67 assessed on pre-NAC biopsy and on post-NAC surgical specimens with a stronger prognostic impact for Ki67 on surgical specimens.

Predictive and prognostic value: Magee equation 3 vs IHC4

The Magee equation 3 was significantly associated with RCBO/RCB1, by univariate analysis, in our study. We confirm previously published data on the chemo-predictive value of Magee equation 3 in the neoadjuvant setting in luminal Her2-negative BC^{27,49}. The Magee equations, including equations 1, 2 and 3 were originally designed to predict Oncotype DX recurrence score using standard histopathological and immunohistochemical factors^{22,50}. In our study, Magee equation 3 was a significant predictive factor in univariate and multivariate analyses, but only when sTIL was not included in the multivariate model. Farrugia et al. previously found Magee equation 3, as determined on the pretherapeutic biopsy, to be an independent prognostic factor in patients not achieving pCR²⁷. Although significant by univariate analysis in our study, Magee equation 3, was not an independent prognostic factor when IHC4 was included in the multivariate model. IHC4 was a strong independent prognostic factor with a stronger prognostic value than Magee equation 3 on biopsy. Higher values of IHC4 were associated with worse prognosis.

In our study, IHC4, as a continuous variable, was strongly associated with chemotherapy response, by univariate analysis. This was less clear when IHC4 was assessed as a discrete variable. RCBO/RCB1 rates were 21.6% in the highest tertile and 9.6% in the lowest tertile of IHC4 ($P=0.049$). IHC4 was not an independent predictive factor in our multivariate model, when in competition with sTIL and Magee equation 3. When we didn't include Magee equation 3 and sTIL in our multivariate model, IHC4 became an independent predictive factor ($P = 0.024$) along with E&E grade ($P = 0.004$). We conclude that in our study Magee equation 3 had a stronger predictive value than IHC4 in luminal HER2-negative BC. Sheri et al. previously demonstrated the predictive value of IHC4 in luminal Her2-negative tumours in the neoadjuvant setting, with a higher IHC4 score associated with improved pCR or near pCR²⁶. In their study RCBO/RCB1 rates were 35% in the highest quartile with no pCR in the lowest quartile of IHC4. Differences in cut off points, population characteristics and chemotherapy regimens may explain this discrepancy. In summary, in our study, Magee equation 3 was more predictive and IHC4 more prognostic than the other, in the neoadjuvant chemotherapy setting of luminal Her2-negative BC.

Prognostic value of RCB

In our study, we found a significant prognostic value of RCB only for patients with E&E grade III tumors on biopsy. This is concordant with the meta-analysis performed by Cortazar et al. where, in luminal Her2-negative BC, pCR was significantly associated with overall survival in grade III tumors, but not in grade I-II tumors¹⁵. The RCB index is a significant prognostic factor in TNBC^{51,52} but matters are less clear in luminal Her2-negative breast disease. In their study, Symmans et al. found the RCB index to be prognostic in luminal Her2-negative BC, however in their study, when considering different RCB classes, RCB1 patients had better prognosis than RCB0 patients and survival of RCB0 patients was not significantly different from survival of RCB2 patients⁵¹.

Findings from this study show that evaluation of sTIL in pre-NAC biopsies should be considered to better select patients with luminal HER2-negative BC for NAC. Increased sTIL concentrations were associated with increased frequency of response to NAC. However, increased sTIL in the post-NAC surgical specimens was an adverse prognostic factor for DRFI.

Proliferation factors (E&E grade, Ki67 index) are also important predictive factors on the pre-NAC specimens and represent prognostic factors on the post-NAC surgical specimens.

Magee equation 3 and IHC4 scores are both predictive and prognostic on pre-NAC biopsies, Magee equation 3 being more predictive and IHC4 being more prognostic. We have shown that common histopathological and immunohistochemical factors can be used to select patients with luminal HER2-negative BC for NAC and assess their prognosis.

ADDITIONAL INFORMATION

Acknowledgements

We thank D. Quincy for manuscript submission.

Authors' contributions

Chloé Delfour acquired data and drafted and revised the manuscript.

Marc Debled designed the study and revised the manuscript.

Houda Ben Rejeb acquired data and revised the manuscript.

Valérie Velasco acquired data and revised the manuscript.

Sophie Auriol acquired data and revised the manuscript.

Véronique Brouste performed the statistics and revised the manuscript.

Nathalie Quenel-Tueux acquired data and revised the manuscript.

Hervé Bonnefoi acquired data and revised the manuscript.

Gaëtan MacGrogan designed the study drafted and revised the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the institutional review board of Institut Bergonié and data collection was in compliance with the Jardé law reference methodology 004 (MR004). Patients were informed of the study project and those who consented to use their tumor material were included in this study. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Consent for publication

Not relevant.

Data availability

Data supporting the results reported in this article can be provided by corresponding author Dr MacGrogan (g.macgrogan@bordeaux.unicancer.fr) upon request.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

Funding for the realization of this study was provided by patient's donations to breast cancer research at Institute Bergonié.

REFERENCES

- 1 WHO | Breast cancer: prevention and control. WHO. <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/> (accessed 20 Jun2020).
- 2 Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Rijn M van de, Jeffrey SS, Rees CA *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; **406**: 747–752.
- 3 Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* 2001; **98**: 10869–10874.
- 4 Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T *et al.* Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 1160–1167.
- 5 Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013; **24**: 2206–2223.
- 6 Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, Curigliano G, Colleoni M, Dellapasqua S *et al.* Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res BCR* 2014; **16**: R65.
- 7 Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet Lond Engl* 1998; **351**: 1451–1467.
- 8 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet Lond Engl* 2005; **365**: 1687–1717.
- 9 Group (EBCTCG) EBCTC. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* 2011; **378**: 771–784.
- 10 Vaidya JS, Massarut S, Vaidya HJ, Alexander EC, Richards T, Caris JA *et al.* Rethinking neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *BMJ* 2018; : j5913.
- 11 Reyat F, Hamy A, Piccart MJ. Neoadjuvant treatment: the future of patients with breast cancer. *ESMO Open* 2018; **3**: e000371.
- 12 Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M *et al.* Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015; **26**: 1533–1546.
- 13 Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT *et al.* Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2019; **30**: 1194–1220.
- 14 Spring LM, Specht MC, Jimenez RB, Isakoff SJ, Wang GX, Ly A *et al.* Case 22-2020: A 62-Year-Old Woman with Early Breast Cancer during the Covid-19 Pandemic. *N Engl J Med* 2020; **383**: 262–272.
- 15 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. *The Lancet* 2014; **384**: 164–172.

- 16 Stover DG, Coloff JL, Barry WT, Brugge JS, Winer EP, Selfors LM. The Role of Proliferation in Determining Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Gene Expression-Based Meta-Analysis. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 6039–6050.
- 17 Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J *et al*. Gene Expression Profiles in Paraffin-Embedded Core Biopsy Tissue Predict Response to Chemotherapy in Women With Locally Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 7265–7277.
- 18 Esserman LJ, Berry DA, Cheang MCU, Yau C, Perou CM, Carey L *et al*. Chemotherapy response and recurrence-free survival in neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Res Treat* 2012; **132**: 1049–1062.
- 19 Bertucci F, Finetti P, Viens P, Birnbaum D. EndoPredict predicts for the response to neoadjuvant chemotherapy in ER-positive, HER2-negative breast cancer. *Cancer Lett* 2014; **355**: 70–75.
- 20 Pease AM, Riba LA, Gruner RA, Tung NM, James TA. Oncotype DX® Recurrence Score as a Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2019; **26**: 366–371.
- 21 Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E *et al*. Prognostic Value of a Combined Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Ki-67, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Immunohistochemical Score and Comparison With the Genomic Health Recurrence Score in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 4273–4278.
- 22 Flanagan MB, Dabbs DJ, Brufsky AM, Beriwal S, Bhargava R. Histopathologic variables predict Oncotype DX Recurrence Score. *Mod Pathol* 2008; : 7.
- 23 Klein ME, Dabbs DJ, Shuai Y, Brufsky AM, Jankowitz R, Puhalla SL *et al*. Prediction of the Oncotype DX recurrence score: use of pathology-generated equations derived by linear regression analysis. *Mod Pathol* 2013; **26**. doi:10.1038/modpathol.2013.36.
- 24 Bartlett JMS, Christiansen J, Gustavson M, Rimm DL, Piper T, de Velde CJH van *et al*. Validation of the IHC4 Breast Cancer Prognostic Algorithm Using Multiple Approaches on the Multinational TEAM Clinical Trial. *Arch Pathol Lab Med* 2016; **140**: 66–74.
- 25 Tan W, Luo W, Jia W, Liang G, Xie X, Zheng W *et al*. A combination of Nottingham prognostic index and IHC4 score predicts pathological complete response of neoadjuvant chemotherapy in estrogen receptor positive breast cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 87312–87322.
- 26 Sheri A, Smith IE, Hills M, Jones RL, Johnston SR, Dowsett M. Relationship between IHC4 score and response to neo-adjuvant chemotherapy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2017; **164**: 395–400.
- 27 Farrugia DJ, Landmann A, Zhu L, Diego EJ, Johnson RR, Bonaventura M *et al*. Magee Equation 3 predicts pathologic response to neoadjuvant systemic chemotherapy in estrogen receptor positive, HER2 negative/equivocal breast tumors. *Mod Pathol* 2017; **30**: 1078–1085.
- 28 Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ *et al*. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; **13**: 228–241.
- 29 Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M *et al*. Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 105–113.
- 30 Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE *et al*. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of

3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 2018; **19**: 40–50.

- 31 The Royal College of Pathologists. Pathology reporting of breast disease in surgical excision specimens incorporating the dataset for histological reporting of breast cancer. 2016. https://www.rcpath.org/uploads/assets/7763be1c-d330-40e8-95d08f955752792a/G148_BreastDataset-hires-Jun16.pdf (accessed 25 Jul2020).
- 32 Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G *et al*. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015; **26**: 259–271.
- 33 Dieci MV, Radošević-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F *et al*. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol* 2018; **52**: 16–25.
- 34 de Mascarel I, Bonichon F, Durand M, Mauriac L, MacGrogan G, Soubeyran I *et al*. Obvious peritumoral emboli: an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of 1320 node-negative breast cancers. *Eur J Cancer* 1998; **34**: 58–65.
- 35 Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, MacGrogan G, Roger P, Treilleux I, Valent A *et al*. Mise à jour 2014 des recommandations du GEPICS pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers du sein en France. *Ann Pathol* 2014; **34**: 352–365.
- 36 Kinsel LB, Szabo E, Greene GL, Konrath J, Leight GS, McCarty KS. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer Res* 1989; **49**: 1052–1056.
- 37 Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J *et al*. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2011; **103**: 1656–1664.
- 38 Leung SCY, Nielsen TO, Zabaglo L, Arun I, Badve SS, Bane AL *et al*. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration. *Npj Breast Cancer* 2016; **2**: 1–9.
- 39 Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V *et al*. Measurement of Residual Breast Cancer Burden to Predict Survival After Neoadjuvant Chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 4414–4422.
- 40 Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast Edinb Scotl* 2008; **17**: 323–334.
- 41 Sheri A, Smith IE, Johnston SR, A'Hern R, Nerurkar A, Jones RL *et al*. Residual proliferative cancer burden to predict long-term outcome following neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 2015; **26**: 75–80.
- 42 Gourgou-Bourgade S, Cameron D, Poortmans P, Asselain B, Azria D, Cardoso F *et al*. Guidelines for time-to-event end point definitions in breast cancer trials: results of the DATECAN initiative (Definition for the Assessment of Time-to-event Endpoints in CANcer trials). *Ann Oncol* 2015; **26**: 873–879.
- 43 Amat S, Penault-Llorca F, Cure H, Le Bouedec G, Achard J-L, Van Praagh I *et al*. Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast

carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *Int J Oncol* 2002; **20**: 791–796.

- 44 Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z *et al*. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 3153–3158.
- 45 Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V *et al*. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 2010; **12**: 207.
- 46 Dabakuyo TS, Bonnetain F, Rignot P, Poillot M-L, Chaplain G, Altwegg T *et al*. Population-based study of breast cancer survival in Cote d’Or (France): prognostic factors and relative survival. *Ann Oncol* 2008; **19**: 276–283.
- 47 Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010; **11**: 174–183.
- 48 Jones RL, Salter J, A’Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho JS *et al*. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009; **116**: 53–68.
- 49 Bhargava R, Esposito NN, O’Connor SM, Li Z, Turner BM, Moisini I *et al*. Magee Equations™ and response to neoadjuvant chemotherapy in ER+/HER2-negative breast cancer: a multi-institutional study. *Mod Pathol* 2020; : 1–8.
- 50 Klein ME, Dabbs DJ, Shuai Y, Brufsky AM, Jankowitz R, Puhalla SL *et al*. Prediction of the Oncotype DX recurrence score: use of pathology-generated equations derived by linear regression analysis. *Mod Pathol* 2013; **26**: 658–664.
- 51 Symmans WF, Wei C, Gould R, Yu X, Zhang Y, Liu M *et al*. Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. *J Clin Oncol* 2017; **35**: 1049–1060.
- 52 Pinard C, Debled M, Ben Rejeb H, Velasco V, Tunon de Lara C, Hoppe S *et al*. Residual cancer burden index and tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in triple-negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2020; **179**: 11–23.

Table 1. Clinical characteristics of patients included in the study

| Characteristics | <i>n</i> = 221 | |
|---|--------------------|------------------------------|
| | Total (<i>n</i>) | % |
| Age | Median 48.3 | Min-max (years) 26.9-76.4 |
| Clinical tumor size | | |
| <20 | 6 | 2.7 |
| ≥20-30 | 9 | 4.1 |
| ≥30 | 205 | 92.7 |
| unknown | 1 | 0,5 |
| Ultrasound tumor size | Median 28.5 | Min-max (mm) 0-90 |
| cT stage | | |
| cT0 | 4 | 1.8 |
| cT1 | 4 | 1.8 |
| cT2 | 134 | 60.6 |
| cT3 | 78 | 35.3 |
| cT4 | 0 | 0 |
| unknown | 1 | 0.5 |
| Neoadjuvant therapy | 221 | 100 |
| Anthracycline + Taxane | 217 | 98.2 |
| Taxane + Alkylating agents | 1 | 0.4 |
| Anthracycline | 2 | 0.9 |
| Anthracycline + Alkylating agents | 1 | 0.4 |
| Surgery | 221 | 100 |
| Breast conservation | 146 | 66.1 |
| with axillary lymph node dissection | 107 | 48.4 |
| with sentinel lymph node dissection | 31 | 14 |
| with axillary lymph node and sentinel lymph node dissection | 8 | 3,6 |
| Mastectomy | 75 | 33.9 |
| with axillary lymph node dissection | 66 | 29.9 |
| with sentinel lymph node dissection | 6 | 1.8 |
| with axillary lymph node and sentinel lymph node dissection | 3 | 1.4 |
| Revision surgery | 33 | 14.9 |
| Breast conservation | 10 | 4.5 |
| Mastectomy | 23 | 10.4 |
| Radiotherapy | 221 | 100 |
| First adjuvant endocrine therapy | 219 | 99.1 |
| Aromatase inhibitor (AI) | 105 | 47.5 |
| Tamoxifen | 94 | 42.5 |
| AI + ovarian suppression | 16 | 7.2 |
| Tamoxifen + ovarian suppression | 4 | 1.8 |
| None | 2 | 0.9 |
| Duration First adjuvant endocrine therapy | Median 54 | Min-max (months) 0-121 |
| Second adjuvant endocrine therapy | 45 | 20.4 |
| Duration second adjuvant endocrine therapy | Median 36 | Min-max (months) 4-108 |
| Median duration of endocrine therapy | Median 60 | Min-max (months) 0-130 |

Table 2. Pre therapeutic histologic characteristics of luminal HER2 negative breast cancer assessed on biopsy

| Characteristics | <i>n</i> = 221 | | | |
|-----------------------------------|----------------|------------------|--------------|--------------|
| | Total (%) | Median (min-max) | Quartile 25% | Quartile 75% |
| Histological subtype | | | | |
| Invasive ductal/no special type | 202 (91.4) | | | |
| Invasive lobular | 19 (8.6) | | | |
| E&E grade | | | | |
| I | 24 (10.9) | | | |
| II | 123 (55.7) | | | |
| III | 73 (33) | | | |
| Unknown/unfeasible | 1 (0.4) | | | |
| Tubule formation | | | | |
| 1 | 4 (1.8) | | | |
| 2 | 36 (16.3) | | | |
| 3 | 181 (81.9) | | | |
| Nuclear pleomorphism | | | | |
| 1 | 1 (0.5) | | | |
| 2 | 150 (67.9) | | | |
| 3 | 70 (31.7) | | | |
| Mitotic score | | | | |
| 1 | 118 (53.4) | | | |
| 2 | 53 (24) | | | |
| 3 | 48 (21.7) | | | |
| Unknown/unfeasible | 2 (0.9) | | | |
| Mitotic index per mm ² | | 2.7 (0-29.9) | 0.9 | 6.4 |
| <1,5 | 74 (33.5) | | | |
| 1.5 - 4.59 | 73 (33) | | | |
| ≥4,6 | 73 (33) | | | |
| Unknown | 1 (0.5) | | | |
| ER status | | | | |
| Positive | 221 (100) | 95 (1-100) | 80 | 95 |
| 1-9% | 2 (0.9) | | | |
| ≥10% | 219 (99.1) | | | |
| Negative | 0 (0) | | | |
| ER HSCORE | | | | |
| 1-100 | 20 (9) | 290 (1-300) | 220 | 295 |
| 101-200 | 23 (10.4) | | | |
| 201-300 | 178 (80.5) | | | |
| PR status | | | | |
| Positive | 206 (93.2) | 40 (0-100) | 10 | 80 |
| 1-9% | 28 (12.7) | | | |
| ≥10% | 178 (80.5) | | | |
| Negative | 15 (6.8) | | | |
| PR HSCORE | | | | |
| 0 | 16 (7.2) | 110 (0-300) | 30 | 260 |
| 1-100 | 93 (42.1) | | | |
| 101-200 | 32 (14.5) | | | |
| 201-300 | 80 (36.2) | | | |

Table 2. Pre therapeutic histologic characteristics of luminal HER2 negative breast cancer assessed on biopsy (suite)

| Characteristics | <i>n</i> = 221 | | | |
|------------------------|----------------|--------------------|--------------|--------------|
| | Total (%) | Median (min-max) | Quartile 25% | Quartile 75% |
| ER/PR status | | | | |
| ER+PR+ | 178 (80.5) | | | |
| ER+PR- | 43 (19.5) | | | |
| HER2 status | | | | |
| Negative | 221 (100) | | | |
| Equivocal | 0 (0) | | | |
| Positive | 0 (0) | | | |
| Ki67 index | | 31.5 (1-91) | 19.8 | 47.5 |
| <20% | 56 (25.3) | | | |
| ≥20% | 165 (74.7) | | | |
| Molecular subtype | | | | |
| Luminal A | 46 (20.8) | | | |
| Luminal B | 175 (79.2) | | | |
| sTIL | | 1 (1-90) | 1 | 2 |
| <5% | 168 (76) | | | |
| ≥5% | 53 (24) | | | |
| IHC4 | | 12,9 (-76.4-139.1) | -16 | 38.2 |
| ≤-9,96 | 73 (33) | | | |
| -9,95 - 28,5 | 74 (33.5) | | | |
| >28,50 | 74 (33.5) | | | |
| Magee Equation 3 score | | 21 (10.4-39.5) | 17.7 | 25 |
| <18 | 61 (27.6) | | | |
| 18-30 | 144 (65.2) | | | |
| ≥31 | 16 (7.2) | | | |

Table 3: Post chemotherapy histological characteristics in luminal HER2 negative breast cancer assessed on surgical specimens

| Characteristics | <i>n</i> = 221 | | | |
|-----------------------------------|----------------|------------------|--------------|--------------|
| | Total (%) | Median (min-max) | Quartile 25% | Quartile 75% |
| E&E grade | | | | |
| 1 | 47 (21.3) | | | |
| 2 | 139 (62.9) | | | |
| 3 | 11 (5) | | | |
| Unknown/unfeasible | 24 (10.9) | | | |
| Mitotic index per mm ² | 201 | 0.5 (0-20) | 0 | 1.4 |
| 0 | 77 (34.8) | | | |
| 0.1-0.90 | 58 (26.2) | | | |
| ≥0.91 | 66 (29.9) | | | |
| Unknown/unfeasible | 20 (9) | | | |
| Ki67 index | 201 | 4.5 (0-77.5) | 1.7 | 9.7 |
| <20% | 175 (79.2) | | | |
| ≥20% | 26 (11.8) | | | |
| Unknown/unfeasible | 20 (9) | | | |
| Residual invasive cellularity | 221 | 40 (0-90) | 15 | 60 |
| ≤20 | 81 (36.7) | | | |
| 21-45 | 66 (29.9) | | | |
| >45 | 74 (33.5) | | | |
| sTILs | | 1 (0-80) | 1 | 2 |
| <5% | 160 (72.4) | | | |
| ≥5% | 36 (16.3) | | | |
| Unknown/unfeasible | 25 (11.3) | | | |
| RCB class | | | | |
| 0 | 20 (9) | | | |
| 1 | 13 (5.9) | | | |
| 2 | 113 (51.1) | | | |
| 3 | 75 (33.9) | | | |
| ypT | | | | |
| T0/Tis | 25 (11.3) | | | |
| T1 | 87 (39.4) | | | |
| T2 | 85 (38.5) | | | |
| T3 | 23 (10.4) | | | |
| T4 | 1 (0.5) | | | |
| ypN | | | | |
| N0/N0i+ | 101 (45.7) | | | |
| N1 | 77 (34.8) | | | |
| N2 | 29 (13.1) | | | |
| N3 | 14 (6.3) | | | |
| Emboli | | | | |
| Yes | 51 (23.1) | | | |
| No | 170 (76.9) | | | |

Table 4. Predictive value of clinicopathological factors for chemotherapy response in luminal HER2 negative breast cancer by univariate and multivariate analysis

| Variables | RCB0/1 | | RCB2/3 | | Univariate | | Multivariate | |
|---------------------------------|-----------|------------|-----------------------|----------------|----------------------|----------------|--------------|--------|
| | n (%) | n (%) | HR [95%CI] | P value (Wald) | HR [95%CI] | P value (Wald) | | |
| sTILs | | | | | | | | |
| <5% | 15 (8.9) | 153 (91.1) | | | 1 | | | |
| ≥5% | 18 (34) | 35 (66) | 6.027 [2.533-14.340] | <0.0001 | 5.030 [2.027-12.479] | 0.0005 | | |
| continuous variable | | | 1.04 [1.02-1.06] | <0.0001 | | | | |
| E&E grade | | | | | | | | |
| . | . | 1 (100) | | | 1 | | | |
| I+II | 12 (8.2) | 135 (91.8) | | | 1 | | | |
| III | 21 (28.8) | 52 (71.2) | 4.543 [2.087-9.892] | 0.0001 | 4.291 [1.783-10.324] | 0.0011 | | |
| Ki67 index | | | | | | | | |
| <20% | 3 (5.4) | 53 (94.6) | | | 1 | | | |
| ≥20% | 30 (18.2) | 135 (81.8) | 3.926 [1.149-13.413] | 0.029 | | | | |
| continuous variable | | | 1.039 [1.019-1.058] | <0.0001 | NR | 0.2025 | | |
| Mitotic index | | | | | | | | |
| . | . | 1 (100) | | | | | NR | 0.2986 |
| <1.5 | 4 (5.4) | 70 (94.6) | | | 1 | 0.024 | | |
| 1.5-4.59 | 13 (17.8) | 60 (82.2) | 3.792 [1.174-12.247] | 0.026 | | | | |
| ≥4.6 | 16 (21.9) | 57 (78.1) | 4.912 [1.555-15.515] | 0.007 | | | | |
| continuous variable | | | 1.086 [1.025-1.151] | 0.005 | | | | |
| Magee Equation 3 score | | | | | | | | |
| <18 | 4 (6.6) | 57 (93.4) | | | 1 | 0.003 | NR | 0.4621 |
| 18-30 | 22 (15.3) | 122 (84.7) | 2.569 [0.846-7.800] | 0.096 | | | | |
| ≥31 | 7 (43.8) | 9 (56.3) | 11.081 [2.691-45.630] | 0.001 | | | | |
| continuous variable | | | 1.142 [1.068-1.221] | 0.0001 | | | | |
| Tumor phenotype | | | | | | | | |
| Luminal A | 1 (2.2) | 45 (97.8) | | | 1 | | NR | 0.9626 |
| Luminal B | 32 (18.3) | 143 (81.7) | 10.07 [1.338-75.785] | 0,025 | | | | |
| IHC4 | | | | | | | | |
| ≤-9.96 | 7 (9.6) | 66 (90.4) | | | 1 | 0.122 | | |
| -9.95 - 28.50 | 10 (13.5) | 64 (86.5) | 1.473 [0.528-4.107] | 0.459 | | | | |
| >28.50 | 16 (21.6) | 58 (78.4) | 2.601 [1.000-6.764] | 0.049 | | | | |
| continuous variable | | | 1.014 [1.006-1.023] | 0.001 | | | NR | 0.9982 |
| Histology | | | | | | | | |
| Invasive ductal/no special type | 30 (14,9) | 172 (85.1) | 0.93 [0.255-3.388] | 0.913 | | | NI | |
| Invasive lobular | 3 (15.8) | 16 (84.2) | | | 1 | | | |

Table 5. Factors associated with distant recurrence-free survival on pre NAC luminal HER2-negative breast cancer on biopsy by univariate and multivariate analysis

| Variables | Univariate | | | | Multivariate | | |
|------------------------|--|--------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|
| | Probability of non-metastasis at 3 years (%) | HR | CI 95% | P vaue (Wald) | HR | CI 95% | P vaue (Wald) |
| cT stage | | | | | | | |
| T0/T1/T2 | 96.2 [91.1-98.4] | 1 | | | 1 | | |
| T3 | 76.5 [64.9-84.7] | 3.431 | 1.921-6.127 | <0.0001 | 3.57 | 1.990-6.404 | <0.0001 |
| IHC4 score | | | | | | | |
| ≤-9.96 | 98.6 [90.7-99.8] | 1 | | <0.0001 | 1 | | <0.0001 |
| -9.95 - 28.5 | 89.8 [79.7-95.0] | 3.811 | 1.272-11.425 | 0.017 | 4.283 | 1.426-12.865 | 0.0095 |
| >28.50 | 79.1 [67.3-87.1] | 9.099 | 3.194-25.926 | <0.0001 | 9.307 | 3.251-26.640 | <0.0001 |
| E&E grade | | | | | | | |
| I+II | 91.4 [85.3-95.0] | 1 | | | NR | | 0.12 |
| III | 84.5 [72.9-91.4] | 2.409 | 1.373-4.229 | 0.0022 | | | |
| Magee Equation 3 score | | | | | | | |
| <18 | 98.4 [88.9-99.8] | 1 | | 0.0004 | NR | | 0.299 |
| 18-30 | 86.9 [79.7-91.6] | 7.194 | 2.220-23.310 | 0.0010 | | | |
| ≥31 | 73.1 [43.0-89.0] | 15.696 | 4.030-61.131 | <0.0001 | | | |
| Tumor phenotype | | | | | | | |
| luminal A | 97.8 [85.6-99.7] | 1 | | | NR | | 0.706 |
| luminal B | 86.6 [80.2-91.1] | 5.726 | 2.328-14.081 | 0.0001 | | | |
| Mitotic index | | | | | | | |
| <1.5 | 90.3 [80.7-95.3] | 1 | | 0.012 | NR | | 0.896 |
| 1.5-4.59 | 91.0 [81.1-95.9] | 0.755 | 0.347-1.646 | 0.480 | | | |
| ≥4.6 | 85.6 [74.0-92.3] | 2.056 | 1.068-3.956 | 0.031 | | | |
| Ki67 index | | | | | | | |
| <20% | 98.2 [88.0-99.8] | 1 | | | | NI | |
| ≥20% | 85.8 [79.1-90.6] | 9.646 | 1.604-57.997 | 0.013 | | | |
| PR H-SCORE | | | | | | | |
| 0 | 84.0 [48.7-95.9] | 3.618 | 1.085-12.061 | 0.036 | | | |
| 1-100 | 83.8 [74.2-90.1] | 3.895 | 1.788-8.487 | 0.0006 | | NI | |
| 101-200 | 88.7 [68.7-96.2] | 1.948 | 0.676-5.617 | 0.217 | | | |
| 201-300 | 96.2 [88.8-98.8] | 1 | | 0.005 | | | |
| Tubule formation | | | | | | | |
| 1+2 | 97.2 [81.9-99.6] | 1 | | | | NI | |
| 3 | 87.5 [81.5-91.7] | 2.896 | 1.040-8.063 | 0.042 | | | |
| sTILs | | | | | | | |
| <5% | 87.9 [81.7-92.1] | 1 | | | | NI | |
| ≥5% | 93.0 [74.7-98.2] | 0.898 | 0.402-2.006 | 0.793 | | | |

Table 6. Factors associated with distant recurrence-free survival by univariate and multivariate analysis on post-therapeutic surgical specimens in luminal HER2 negative breast cancer

| Variables | Univariate | | | | Multivariate | | |
|---------------|--|--------|---------------|----------------------|--------------|--------------|----------------------|
| | Probability of non-metastasis at 3 years (%) | HR | CI 95% | <i>P</i> vaue (Wald) | HR | CI 95% | <i>P</i> vaue (Wald) |
| Ki67 index | | | | | | | |
| <20% | 93.2 [88.0-96.2] | 1 | | | 1 | | |
| ≥20% | 57.3 [34.9-74.5] | 6.435 | 3.436-12.050 | <0.0001 | 5.816 | 2.688-12.584 | <0.0001 |
| Emboli | | | | | | | |
| no | 93.0 [87.7-96.1] | 1 | | | 1 | | |
| yes | 75.7 [60.3-85.9] | 3.104 | 1.751-5.500 | 0.0001 | 2.484 | 1.366-4.516 | 0.0029 |
| E&E grade | | | | | | | |
| I | 100.0 | 1 | | <0.0001 | 1 | | 0.0449 |
| II | 87.7 [80.7-92.3] | 5.696 | 1.755-18.488 | 0.004 | 4.408 | 1.345-14.452 | 0.0143 |
| III | 41.7 [10.9-70.8] | 26.446 | 6.756-103.526 | <0.0001 | 5.395 | 1.164-24.995 | 0.0312 |
| sTILs | | | | | | | |
| <5% | 91.5 [85.7-95.0] | 1 | | | | | |
| ≥5% | 80.4 [61.2-90.7] | 2.009 | 1.039-3.884 | 0.038 | NR | | 0.2741 |
| Mitotic score | | | | | | | |
| 1 | 92.1 [86.7-95.3] | 1 | | | | NI | |
| 2+3 | 57.6 [32.7-76.1] | 4.336 | 2.247-8.367 | <0.0001 | | | |
| Mitotic index | | | | | | | |
| . | | | | | | | |
| 0 | 94.3 [85.5-97.8] | 1 | | 0.074 | | NI | |
| 0.1-0.90 | 91.0 [79.6-96.2] | 1.116 | 0.522-2.385 | 0.777 | | | |
| ≥0.91 | 80.4 [68.0-88.4] | 2.045 | 1.036-4.034 | 0.039 | | | |
| RCB | | | | | | | |
| 0 | 93.8 [63.2-99.1] | 0.292 | 0.039-2.167 | 0.229 | | | |
| 1 | 92.3 [56.6-98.9] | 1.319 | 0.395-4.410 | 0.653 | | NI | |
| 2 | 91.2 [83.8-95.4] | 1 | | 0.171 | | | |
| 3 | 84.7 [74.0-91.2] | 1.655 | 0.922-2.970 | 0.092 | | | |

Table supplementary 1 (Table S1): characteristics of antibodies and immunohistochemical techniques used in this study

| Antibody | Clone | Vendor | Dilution | Incubation time | Pretreatment | Detection |
|----------|-------|-------------------|--------------|-----------------|-------------------|----------------------------|
| ER | SP1 | Roche Diagnostics | Prediluted | | CC1standard (64') | UltraView Universal DAB |
| | | (760-4605) | Ready to use | 32 min | | |
| PR | 1 E2 | Roche Diagnostics | Prediluted | | CC1 short (36') | UltraView Universal DAB |
| | | (790-4296) | Ready to use | 12 min | | |
| HER2 | 4B5 | Roche Diagnostics | Prediluted | | CC1 short (36') | UltraView Universal DAB |
| | | (790-4493) | Ready to use | 12 min | | |
| Ki67 | 30.9 | Roche Diagnostics | Prediluted | | CC1standard (64') | UltraView Universal DAB |
| | | (790-4493) | Ready to use | 32 min | | |

CONCLUSIONS

D'après les résultats de notre étude, nous avons pu montrer que les facteurs histologiques et immunohistochimiques déterminés en routine peuvent être utilisés pour sélectionner les patients, présentant un cancer du sein de type luminal HER2-négatif, qui bénéficieront d'une chimiothérapie néo-adjuvante ainsi que pour évaluer leur pronostic.

D'une part, nous avons mis en évidence la valeur chimio-prédictive du grade et des sTILs. Nous avons étudié la prédiction de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante dans les cancers du sein de type luminal HER2-négatif car, dans ces tumeurs, il reste indispensable de mieux identifier les candidats à une chimiothérapie systémique et notamment à une chimiothérapie néo-adjuvante pour ne pas sur-traiter les patients. Le grade et les sTILs sont deux facteurs histologiques que le pathologiste détermine aisément sans technique complémentaire. Ces deux facteurs peuvent donc servir d'outil simple et rapide pour aider le clinicien à sélectionner les patients pour une chimiothérapie néo-adjuvante. L'équation 3 de Magee est également un facteur de prédiction de réponse mais dont la valeur prédictive est moins forte que le grade et les sTILs. L'équation 3 de Magee peut donc être une aide supplémentaire pour la prise de décision thérapeutique dans les cas difficiles. Le score IHC4 a également été étudié mais nous avons montré que l'équation 3 de Magee est plus prédictive que le score IHC4. Notre étude fait partie des rares études à avoir étudié la valeur prédictive des sTILs et du grade malgré leur facilité d'accès dans la pratique quotidienne. Il semble donc important que les sTILs soient déterminés de manière systématique par les pathologistes sur les biopsies mammaires au diagnostic.

Dans notre étude, nous avons étudié l'index Ki67 qui est utilisé depuis de nombreuses années pour évaluer la prolifération du cancer du sein. La prescription d'une chimiothérapie est, à l'heure actuelle, essentiellement basée sur la valeur du Ki67. Nous avons montré que le Ki67 a une forte valeur prédictive en analyse univariée, en valeur continue et catégoriel, avec une coupure à 20%. Cependant, avec cette coupure et en présence du grade et des sTILs, le Ki67 ne ressort pas comme un facteur prédictif en analyse multivariée. Une coupure à 50% a été réalisée et montre que le Ki67 est un facteur prédictif plus fort avec un nombre de répondeurs (RCB0/1) plus important qu'avec une coupure à 20%. Cependant, en pratique clinique, la coupure de 20% est la plus couramment utilisée pour la décision de chimiothérapie. Ces éléments permettent de montrer la puissance prédictive du grade et des sTILs par rapport au Ki67 qui ne constitue pas un facteur prédictif robuste dans notre étude.

Dans un deuxième temps, la valeur pronostique pour la survie sans métastase des facteurs histologiques et immunohistochimiques a été déterminée sur biopsie pré-chimiothérapie néo-adjuvante et sur pièce opératoire post-chimiothérapie néo-adjuvante.

Sur biopsie, nous avons démontré la valeur pronostique du stade clinique pré-thérapeutique et du score IHC4. L'équation 3 de Magee a également une valeur pronostique sur biopsie mais plus faible que le score IHC4. Le score IHC4 est donc plus pronostique que l'équation 3 de Magee dans notre étude.

Après chimiothérapie néo-adjuvante, sur pièce opératoire, nous avons démontré la valeur pronostique du grade, du Ki67 et des emboles vasculaires. Dans notre étude, les sTILs ne sont pas un facteur pronostique indépendant en analyse multivariée mais sont significatifs en analyse univariée, les 3 autres facteurs ayant une grande valeur pronostique. Une augmentation des sTILs sur pièce opératoire post-chimiothérapie néo-adjuvante est un facteur de mauvais pronostic pour la survie sans métastase dans les cancers du sein luminal HER2-négatif.

Au final, l'équation 3 de Magee et le score IHC4 sont à la fois prédictifs et pronostiques sur les biopsies pré-chimiothérapie néo-adjuvante, l'équation 3 de Magee étant plus prédictive et le score IHC4 étant plus pronostique. De plus, un taux de sTILs élevé sur biopsie prédit une bonne réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante alors que sur pièce opératoire post-chimiothérapie néo-adjuvante, un taux élevé de sTILs est associé à un mauvais pronostic pour la survie sans métastase.

Il serait intéressant de déterminer la composition précise de l'infiltrat immun des sTILs dans les cancers du sein luminal HER2-négatif pour déterminer quels sont les facteurs immuns impliqués dans la prédiction de réponse. Dans une étude menée par Denkert, cet infiltrat inflammatoire a en partie été caractérisé, suggérant une différence de composition cellulaire de l'infiltrat inflammatoire entre les tumeurs lumineuses HER2-négatif, et les tumeurs triples négatives et HER2 enrichie. Ceci pourrait expliquer la différence de valeur pronostique des sTILs sur pièce opératoire entre les tumeurs lumineuses HER2- et les autres tumeurs. Le cancer du sein est donc une maladie immunogène qui pourrait être ciblée par des immunothérapies.

De plus, il serait intéressant d'étudier la valeur prédictive d'une ou plusieurs signatures moléculaires à partir des biopsies pré-chimiothérapie néo-adjuvante pour comparer leurs valeurs prédictives à celles des facteurs histologiques et immunohistochimiques utilisés en routine. En effet, seule la signature Oncotype Dx® a été étudiée sur biopsie avant chimiothérapie néo-adjuvante.

L'anatomie et cytologie pathologique, comme d'autres spécialités médicales, est au cœur d'une révolution numérique avec le développement de l'intelligence artificielle. L'analyse d'images numériques promet une précision de l'évaluation morphologique des tumeurs du sein à partir des lames

HES ce qui pourrait permettre de mieux caractériser les facteurs prédictifs dans le cancer du sein luminal HER2-négatif avec une meilleure reproductibilité.

ANNEXE 1 : Classification ACR des images mammographiques (HAS)

Classification en six catégories des images mammographiques en fonction du degré de suspicion de leur caractère pathologique (en dehors des images construites et des variantes du normal) – correspondance avec le système BIRADS de l'American College of radiology (ACR)

ACR 0 : Des investigations complémentaires sont nécessaires : comparaison avec les documents antérieurs, incidences complémentaires, clichés centrés comprimés, agrandissement de microcalcifications, échographie, etc. C'est une classification « d'attente », qui s'utilise en situation de dépistage ou dans l'attente d'un second avis, ou avant que le bilan d'imagerie soit complet et permette une classification définitive.

ACR 1 : Mammographie normale.

ACR 2 : Anomalies bénignes ne nécessitant ni surveillance ni examen complémentaire :

- Opacité ronde avec macrocalcifications (adénofibrome ou kyste)
- Ganglion intramammaire
- Opacité(s) ronde(s) correspondant à un/des kyste(s) typique(s) en échographie
- Image(s) de densité grasseuse ou mixte (lipome, hamartome, galactocèle, kyste huileux)
- Cicatrice(s) connue(s) et calcification(s) sur matériel de suture
- Macrocalcifications sans opacité (adénofibrome, kyste, adiponécrose, ectasie canalaire sécrétante, calcifications vasculaires, etc.)
- Microcalcifications annulaires ou arciformes, semi-lunaires, sédimentées, rhomboédriques
- Calcifications cutanées et calcifications punctiformes régulières diffuses

ACR 3 : Anomalie probablement bénigne pour laquelle une surveillance à court terme est conseillée :

- Microcalcifications rondes ou punctiformes régulières ou pulvérulentes, peu nombreuses, en petit amas rond isolé
- Petit(s) amas rond(s) ou ovale(s) de calcifications amorphes, peu nombreuses, évoquant un début de calcifications d'adénofibrome
- Opacité(s) bien circonscrite(s), ronde(s), ovale(s) ou discrètement polycyclique(s) sans microlobulation, non calcifiée(s), non liquidiennes en échographie
- Asymétrie focale de densité à limites concaves et/ou mélangée à de la graisse

ACR 4 : Anomalie indéterminée ou suspecte qui indique une vérification histologique :

- Microcalcifications punctiformes régulières nombreuses et/ou groupées en amas aux contours ni ronds, ni ovales
- Microcalcifications pulvérulentes groupées et nombreuses
- Microcalcifications irrégulières, polymorphes ou granulaires, peu nombreuses
- Image(s) spiculée(s) sans centre dense
- Opacité(s) non liquidiennes(s) ronde(s) ou ovale(s) aux contours lobulés, ou masqués, ou ayant augmenté de volume
- Distorsion architecturale en dehors d'une cicatrice connue et stable
- Asymétrie(s) ou surcroît(s) de densité localisé(s) à limites convexes ou évolutif(s)

ACR 5 : Anomalie évocatrice d'un cancer :

- Microcalcifications vermiculaires, arborescentes ou microcalcifications irrégulières, polymorphes ou granulaires, nombreuses et groupées
- Groupement de microcalcifications quelle que soit leur morphologie, dont la topographie est galactophorique
- Microcalcifications associées à une anomalie architecturale ou à une opacité
- Microcalcifications groupées ayant augmenté en nombre ou microcalcifications dont la morphologie et la distribution sont devenues plus suspectes
- Opacité mal circonscrite aux contours flous et irréguliers
- Opacité spiculée à centre dense

Critères

Différenciation tubulo-glandulaire :

Score 1 : bien différencié (>75% de la surface tumorale)

Score 2 : moyennement différencié (10-75% de la surface tumorale)

Score 3 : peu différencié (<10% de la surface tumorale)

Pléomorphisme nucléaire :

Score 1 : petits noyaux réguliers (<2N)

Score 2 : noyaux légèrement augmentés de taille (2 à 3N)

Score 3 : noyaux augmentés de taille (>3N) ou irréguliers

Compte mitotique (diamètre de champs = 0,50 mm)

Score 1 : 0-7

Score 2 : 8-14

Score 3 : >14

Grade histologique (addition des 3 scores)

Grade I (3-5)

Grade II (6-7)

Grade III (8-9)

T – Primary Tumour

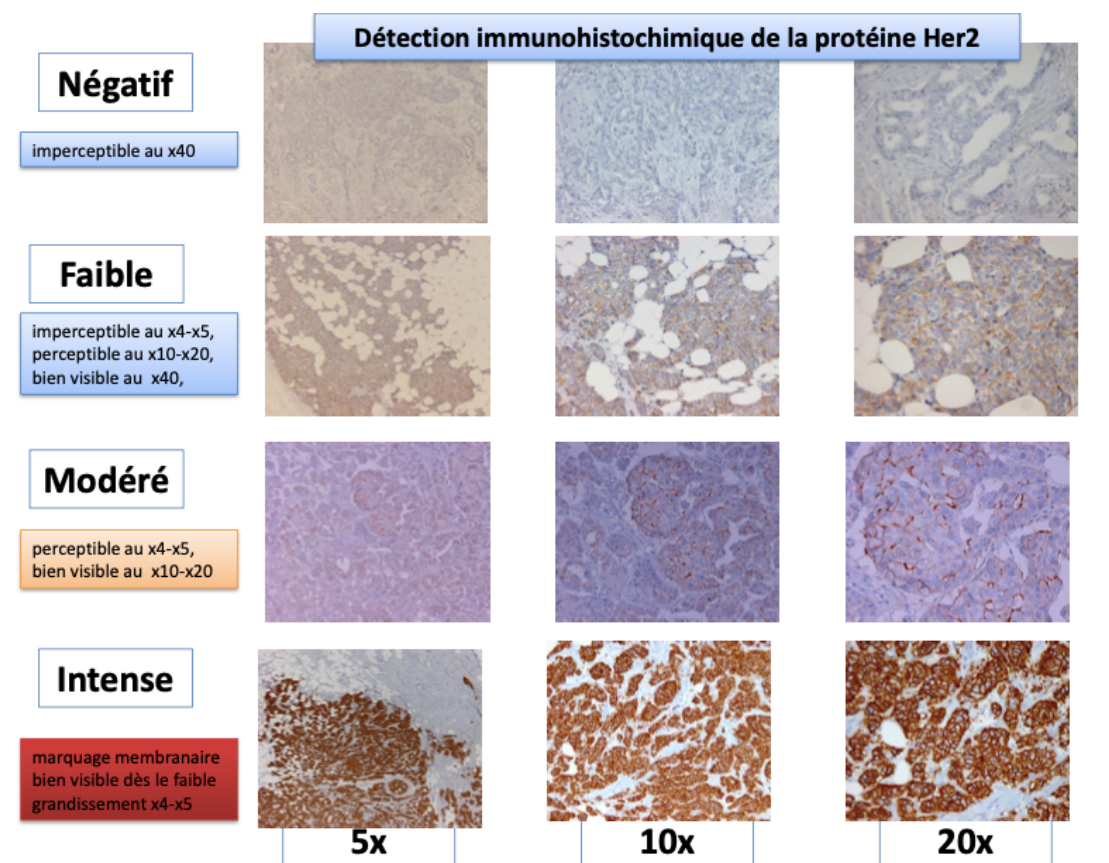
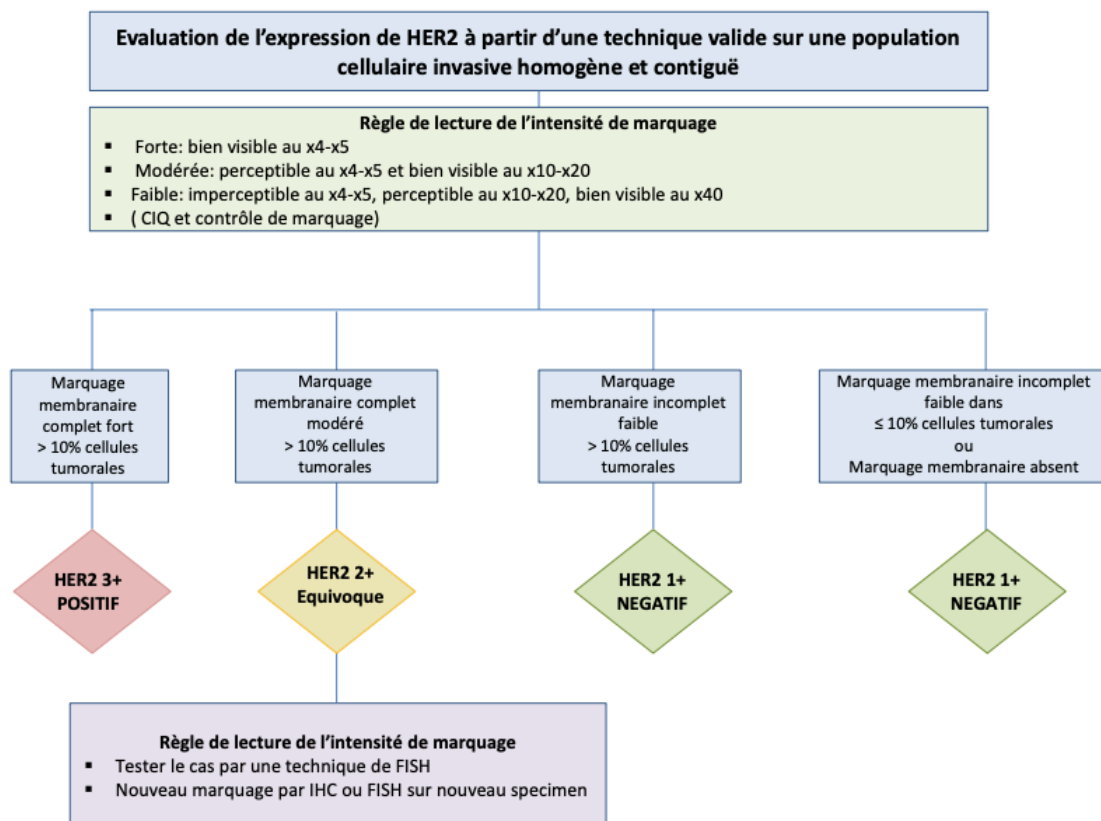
- TX Primary tumour cannot be assessed
- T0 No evidence of primary tumour
- Tis Carcinoma in situ
- Tis Ductal carcinoma in situ (DCIS)
- Tis Lobular carcinoma in situ^a (LCIS)
- Tis Paget disease of the nipple not associated with invasive carcinoma and/or carcinoma *in situ* (Paget) (DCIS and/or LCIS) in the underlying breast parenchyma. Carcinomas in the breast parenchyma associated with Paget disease are categorized based on the size and characteristics of the parenchymal disease, although the presence of Paget disease should still be noted.
- T1 Tumour 2 cm or less in greatest dimension
- T1mi Microinvasion 0.1 cm or less in greatest dimension^b
- T1a More than 0.1 cm but not more than 0.5 cm in greatest dimension
- T1b More than 0.5 cm but not more than 1 cm in greatest dimension
- T1c More than 1 cm but not more than 2 cm in greatest dimension
- T2 Tumour more than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension
- T3 Tumour more than 5 cm in greatest dimension
- T4 Tumour of any size with direct extension to chest wall and/or to skin (ulceration or skin nodules)^c
- T4a Extension to chest wall (does not include pectoralis muscle invasion only)
- T4b Ulceration, ipsilateral satellite skin nodules, or skin oedema (including peau d'orange)
- T4c Both 4a and 4b
- T4d Inflammatory carcinoma^d

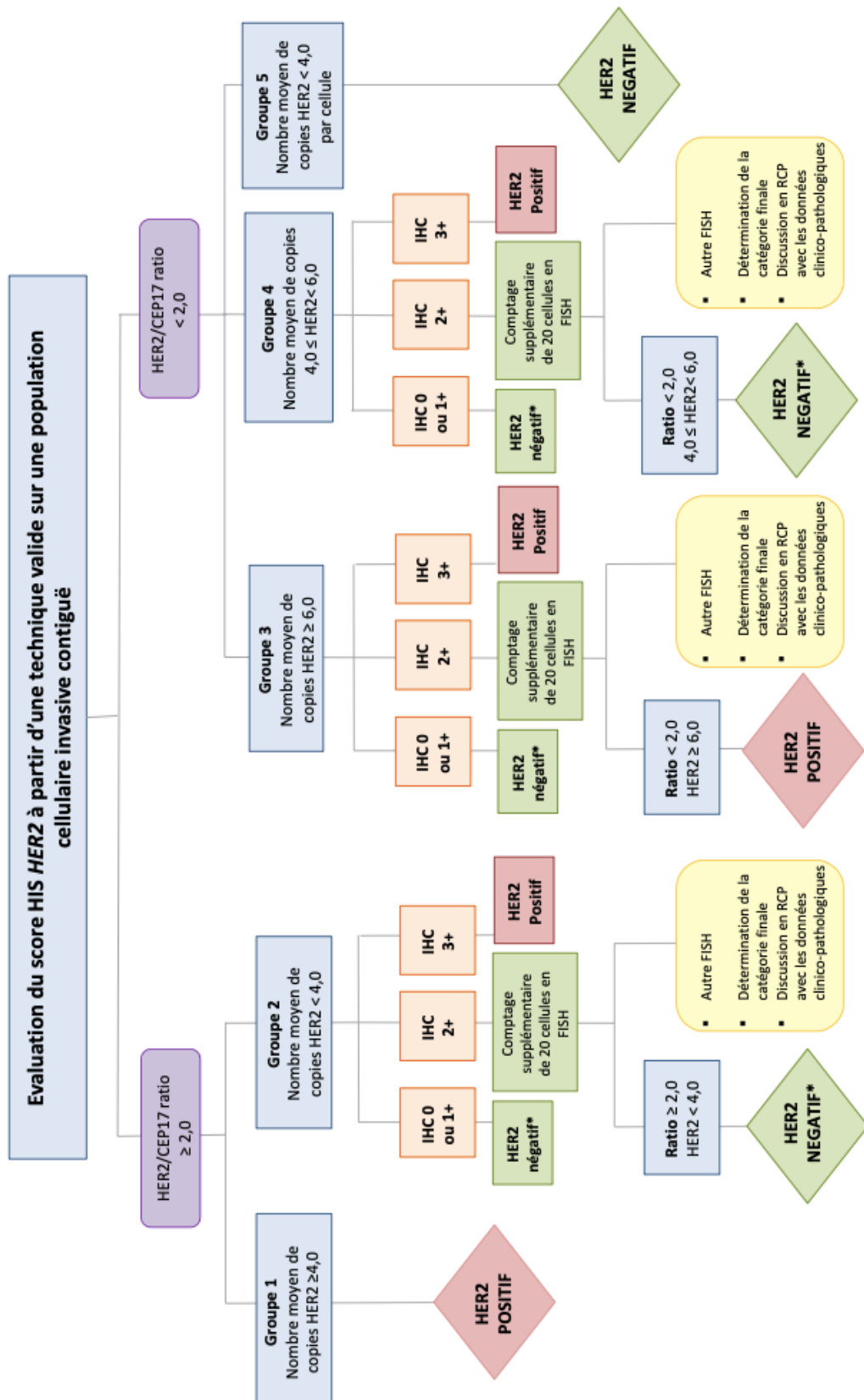
N – Regional Lymph Nodes

- NX Regional lymph nodes cannot be assessed (e.g., previously removed)
- N0 No regional lymph node metastasis
- N1 Metastasis in movable ipsilateral level I, II axillary lymph node(s)
- N2 Metastasis in ipsilateral level I, II axillary lymph node(s) that are clinically fixed or matted; or in clinically detected^e ipsilateral internal mammary lymph node(s) in the *absence* of clinically evident axillary lymph node metastasis
- N2a Metastasis in axillary lymph node(s) fixed to one another (matted) or to other structures
- N2b Metastasis only in clinically detected^e internal mammary lymph node(s) and in the *absence* of clinically detected axillary lymph node metastasis
- N3 Metastasis in ipsilateral infraclavicular (level III axillary) lymph node(s) with or without level I, II axillary lymph node involvement; or in clinically detected^e ipsilateral internal mammary lymph node(s) with clinically evident level I, II axillary lymph node metastasis; or metastasis in ipsilateral supraclavicular lymph node(s) with or without axillary or internal mammary lymph node involvement
- N3a Metastasis in infraclavicular lymph node(s)
- N3b Metastasis in internal mammary and axillary lymph nodes
- N3c Metastasis in supraclavicular lymph node(s)

M – Distant Metastasis

- M0 No distant metastasis
- M1 Distant metastasis





SERMENT D'HIPPOCRATE

Edition Novembre 2012

“Au moment d’être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d’être fidèle aux lois de l’honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J’interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l’humanité.

J’informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n’exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l’indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l’intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.

Reçue à l’intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l’indépendance nécessaire à l’accomplissement de ma mission. Je n’entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J’apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu’à leurs familles dans l’adversité.

Que les hommes et mes confrères m’accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j’y manque.”

RÉSUMÉ

Les indications de la chimiothérapie néo-adjuvante (CNA) chez les patients atteints d'un cancer du sein luminal HER2- à un stade précoce restent controversées. Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer, sur microbiopsie, la valeur prédictive des facteurs clinicopathologiques évalués en routine, l'équation 3 de Magee, le score IHC4 et les sTILs et d'évaluer, sur pièce opératoire, la valeur pronostique de certains de ces facteurs. Cette étude a porté sur 221 patientes atteinte d'un carcinome mammaire de phénotype luminal HER2- non métastatique traité par CNA.

Les sTILs (HR=5.030, CI95% [2.027-12.479], $P=0.0005$) et le grade (HR=4.291, CI95% [1.783-10.324], $P=0.0011$) étaient des facteurs indépendants associés au RCB0/1. Les facteurs pronostiques indépendants pour la DRFI avant CNA étaient le stade clinique (HR = 3.570, CI95% [1.990-6.404], $P<0.0001$) et le score IHC4 (HR=9.307, CI95% [3.251-26.640], $P<0.0001$). Après la CNA, les facteurs pronostiques indépendants étaient le Ki67 (HR=5.816, CI95% [2.688-12.584], $P<0.0001$), les emboles vasculaires (HR=2.484, CI95% [1.366-4.516], $P= 0.0029$) et le grade (HR=5.395, CI95% [1.164-24.995], $P=0.0312$).

Nous avons mis en évidence la valeur chimio-prédictive du grade et des sTILs. Un taux de sTILs élevé sur biopsie prédit une bonne réponse à la CNA. Ces deux facteurs peuvent donc servir d'outil simple et rapide pour aider le clinicien à sélectionner les patients qui ont besoin d'une CNA. L'équation 3 de Magee est également un facteur prédictif mais dont la valeur prédictive est moins forte que le grade et les sTILs. L'équation 3 de Magee est plus prédictive que le score IHC4.

Sur biopsie, nous avons démontré la valeur pronostique du stade clinique pré-thérapeutique et du score IHC4. Après CNA, sur pièce opératoire, le grade, le Ki67 et les emboles vasculaires étaient pronostiques. Une augmentation des sTILs sur pièce opératoire post-CNA est un facteur de mauvais pronostic pour la DRFI dans les cancers du sein luminal HER2-négatif.

The indications of neoadjuvant chemotherapy (NAC) for patients with estrogen receptor (ER)-positive HER2 negative early breast cancer (BC) remain controversial. We assessed the predictive and prognostic values of clinicopathological factors, stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTIL), Magee equation 3 and IHC4 score in luminal Her2-negative BC treated by NAC.

221 patients with ER+HER2- early BC treated with NAC followed by surgery, were included in the study. Histological grade, sTIL, Magee equation 3, IHC4, Ki67 and Residual Cancer Burden (RCB) were determined on pre-treatment core biopsies and/or on surgical specimens.

sTIL (HR = 5.030, CI95% [2.027-12.479], $P = 0.0005$) and grade (HR = 4.291, CI95% [1.783-10.324], $P = 0.0011$) were independent factors associated with RCB0/1. Independent prognostic factors for DRFI before chemotherapy were clinical stage (HR = 3.570, CI95% [1.990-6.404], $P < 0.0001$) and IHC4 (HR = 9.307, CI95% [3.251-26.640], $P < 0.0001$) and after chemotherapy were Ki67 (HR = 5.816, CI95% [2.688-12.584], $P < 0.0001$), vascular emboli (HR = 2.484, CI95% [1.366-4.516], $P = 0.0029$) and grade (HR = 5.395, CI95% [1.164-24.995], $P = 0.0312$).

These findings enhance the value of sTIL and grade as tools for aiding chemotherapy decision-making and IHC4 and Ki-67 for assessing prognosis in HER2-negative luminal BC.