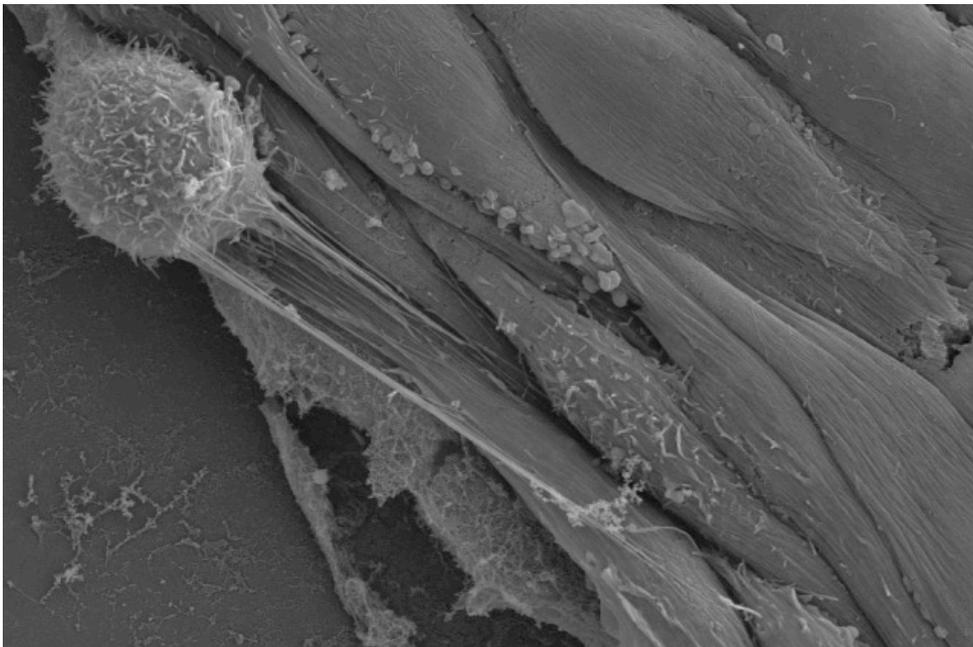


Université de Liège
Faculté de Médecine
Département de Médecine Interne
Service d'Oncologie Médicale
Prof. G. Jérusalem

LES ROLES DES MICRO-ARN CIRCULANTS DANS LE CANCER DU SEIN



Pierre Frères



Illustration : la cellule cancéreuse circulante, via des connections membranaires, transfère des microARN aux cellules endothéliales, afin de les rendre plus hospitalières pour accueillir le processus métastatique (« metastatic hijack ») (Connor Y et al., 2015).

Remerciements

Ce travail a pu aboutir grâce à l'aide de nombreuses personnes.

En premier lieu, une pensée pour toute l'équipe du Laboratoire de Génétique Humaine. J'ai eu le privilège de travailler avec des collègues qui conjuguaient une compétence professionnelle et des qualités humaines dont le souvenir n'est pas prêt de s'effacer de ma mémoire. Meriem est une source d'admiration pour la force de son caractère et de ses convictions. Sonia, je pense que notre croisade envers le laboratoire voisin restera dans les annales du GIGA. Tibério, je n'oublierai jamais que tu m'as accompagné, et encouragé, durant la 1^{ère} sortie jogging de toute mon existence, et je te remercie pour ça. Stéphane, l'homme parfaitement assorti, a été un soutien sans faille dans l'avancement du projet. Il a surtout été là pour ses conversations parfois raffinées, ses potins souvent d'actualité et ses conseils matrimoniaux toujours avisés. Corinne, sans qui cette recherche n'aurait jamais pu démarrer sur de bonnes bases. Merci de ne pas avoir perdu patience quand il a fallu m'expliquer comment régler une pipette ou calculer une dilution, ou pour obtenir une parfaite hybridation *in situ*. Merci aussi à Jérôme, qui m'a aidé à faire mes plaques PCR sans jamais râler, et à Aurélie, pour son enthousiasme sans faille. Je tenais aussi à remercier Marie, dont toutes les histoires rythmaient nos journées et pour ses goûts musicaux Wati Bons. Nadège, tu ne dois surtout pas douter de tes multiples talents. Merci de penser à m'appeler quand il est l'heure de manger et de prendre régulièrement de mes nouvelles !

Je remercie tout spécialement les promoteurs de la présente recherche. Il s'agit des Professeurs Guy JERUSALEM et Vincent BOURS, pour m'avoir proposé un projet aussi pertinent et pour leur suivi régulier. Je remercie également les membres de mon comité de thèse, les Docteurs Ingrid STRUMAN, Philippe MARTINIVE et Philippe DELVENNE. Merci à Claire pour son intérêt débordant pour les sciences et sa motivation pour construire de nouveaux projets. Une pensée pour Nicolas, qui m'a inclus dans son projet et m'a beaucoup conseillé au début de ce travail.

Impossible d'oublier l'équipe d'Oncologie du CHU de Liège. D'abord Hélène, pour la collecte des échantillons, avec l'aide d'Isabelle et Sabrina. Merci aussi à Olivier DENGIS pour sa disponibilité. Le recrutement des patientes aurait été évidemment impossible sans la participation des Docteurs Joëlle COLLIGNON, Andrée RORIVE et Chantal ANDRE. Une pensée particulière pour Christine, Marie, Maryam, Elodie, Laurence, Nathalie, Stéphanie, Maude et Sabine, qui ont régulièrement pris des nouvelles sur l'avancement du projet.

Finalement, la famille et les amis, qui ont été un soutien moral non négligeable. Merci à mes parents pour leur relecture attentive. Tous les potes de médecine, en particulier Raph, qui a parfaitement fait semblant de m'écouter quand je parlais de mes résultats. Aussi les amis qui n'ont rien à voir avec la médecine et la recherche, parce que, de temps en temps, ça fait du bien de penser à autre chose !

Aurélie, je tenais à m'excuser pour toutes ces soirées à discuter des miARN. Merci pour ton oreille attentive, ta patience et tes conseils avisés. Un doctorat est un travail de longue haleine et je n'aurai pas tenu le coup sans toi. Pour finir, Simon et Chloé, cette thèse a été accomplie avec comme objectif de vous offrir le meilleur pour la suite. Je vous aime fort.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers les organismes institutionnels dont l'action vise à dynamiser la lutte contre le cancer, notamment dans les projets de recherche translationnelle. Ce travail aurait été impossible sans le soutien du FNRS, du Centre anti-cancéreux, du CHU de Liège (FIRS), du Télévie et de la Région Wallonne.

Pierre

Abréviations

A

ADN = Acide
DésoxyriboNucléique

ADNc = ADN complémentaire

AI = Aromatase Inhibitors

AJCC = American Joint
Committee on Cancer

ALND = Axillary Lymph Node
Dissection

ARN = Acide RiboNucléique

ARNm = ARN messenger

ASCO = American Society of
Medical Oncology

AUC = Area Under the Curve

B

BMI = Body Mass Index

BRCA = Breast Cancer
susceptibility genes

C

CA15.3 = Carbohydrate Antigen
15.3

CEP17 = Centromeric Probe to
Chromosome 17

CCI = Cancer Canalaire Infiltrant

CDK = Cyclin-Dependent Kinases

cfDNA = cell-free DNA

CHF = Congestive Heart Failure

CI = Confidence Interval

CLI = Cancer Lobulaire Infiltrant

Cq = quantification Cycle

CRCD = Chemotherapy-Related
Cardiac Dysfunction

CT = Computed Tomography

cTnT = cardiac-specific
Troponins T

D

DCIS = Ductal Carcinoma In Situ

ddPCR = droplet digital PCR

E

EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor

ESMO = European Society of Medical Oncology

ER = Estrogen Receptors

EBCTCG = Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group

F

FEVG = Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche

FSH = Follicule-Stimulating Hormone

H

HDL = High Density Lipoprotein

HER2 = Human Epidermal growth factor Receptor-2

HR = Hazard Ratio

HT = HormonoThérapie

HTA = HyperTension Artérielle

I

IHC = ImmunoHistoChimie

IRM = Imagerie par Résonance Magnétique

ITC = Isolated Tumor Cells

L

LABC = Locally Advanced Breast Cancer

LCIS = Lobular Carcinoma In Situ

LHRH = Luteinizing Hormone Releasing Hormone

M

MD = Medical Doctor

miARN = microARN

mTOR = mammalian Target Of Rapamycin

N

NAC = NeoAdjuvant Chemotherapy

NOS = Not Otherwise Specified

NT-proBNP = N-Terminal Brain Natriuretic Peptide

O

OFS = Ovarian Function Suppression

P

pCR = pathological Complete Response

PET-CT = Positron Emission Tomography-Computed Tomography

pPR = pathological Partial Response

PR = Progesteron Receptors

R

Ran = Ras-related nuclear

RISC = RNA-Induced Silencing Complex

RT-PCR = Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR = Reverse Transcriptase quantitative PCR

S

SERD = Selective Estrogen Receptor Degradar

SERM = Selective Estrogen Receptor Modulator

SLNB = Sentinel Lymph Node Biopsy

T

TCGA = The Cancer Genome Atlas

TILs = Tumor Infiltrating Lymphocytes

TNBC = Triple Negative Breast Cancer

TNM = Tumour Nodes Metastasis

TREG = T-REGulatory cells

U

UICC = Union for International Cancer Control

uPA-PAI1 = urokinase Plasminogen Activator-Plasminogen Activator Inhibitor 1

PD-L1 = Programmed cell Death-Ligand 1

W

WBRT = Whole Breast Radiation Therapy

Table des matières

INTRODUCTION..... 1

1. Cancer du sein 1

a. Epidémiologie	1
b. Dépistage.....	2
c. Cancérogénèse et facteurs de risque.....	4
d. Diagnostic	7
i. Signes et symptômes	7
ii. Analyses anatomopathologiques.....	8
e. Bilan post-diagnostic	8
i. Anamnèse, examen clinique et biologie sanguine.....	9
ii. Imagerie	9
iii. Analyses anatomopathologiques.....	10
iv. Classification moléculaire.....	12
v. Stade	14
f. Facteurs pronostiques et prédictifs.....	16
g. Traitements.....	20
i. Chirurgie	20
ii. Radiothérapie	21
iii. Chimiothérapie adjuvante.....	22
iv. Hormonothérapie.....	23
v. Thérapies ciblées.....	24
vi. Traitements systémiques néoadjuvants	25
h. Cardiotoxicité des traitements	27

2. MicroARN 32

a. Généralités.....	32
b. Biogénèse et mécanisme d'action.....	33
c. MicroARN circulants	34
d. Rôles biologiques dans le cancer du sein	36
e. Intérêts diagnostiques dans le cancer du sein	38
f. Intérêts pronostiques et prédictifs dans le cancer du sein	41
g. Perspectives thérapeutiques	42

OBJECTIFS	43
------------------------	-----------

RESULTATS.....	45
-----------------------	-----------

1. Identification d'une signature de microARN circulants pour le dépistage du cancer du sein..... 45

Article 1 : Circulating microRNA-based screening tool for breast cancer

Résumé.....45

Article.....47

2. Induction du miR-34a et du miR-122 par la chimiothérapie néoadjuvante dans le cancer du sein .60

Article 2 : Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces miR-34a and miR-122 expression

Résumé.....60

Article.....62

3. Variations de biomarqueurs cardiaques durant et après la chimiothérapie néoadjuvante pour le cancer du sein 71

Article 3 : Variations of circulating cardiac biomarkers during and after anthracycline-containing chemotherapy in breast cancer patients

Résumé.....71

Article.....73

DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	102
---	------------

1. Les miARN comme biomarqueurs..... 102

2. L'effet de la chimiothérapie sur les miARN	105
3. Rôles biologiques des miARN circulants.....	107
4. Perspectives.....	110
5. Conclusion	111
REFERENCES.....	112
ANNEXES.....	135
Article 4 : Le cancer du sein triple négatif.....	135
Article 5 : Cyclin-dependent protein kinase inhibitors in breast cancer treatment	142
Article 6 : La cardiotoxicité des traitements anti-cancéreux	149
Article 7 : Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer	155

Introduction

1. Cancer du sein

a. Epidémiologie

Le cancer est une véritable épidémie. Selon le *Registre du Cancer*, 65.487 nouveaux cas de cancers invasifs ont été diagnostiqués en Belgique durant l'année 2013, et ce chiffre pourrait augmenter jusqu'à 78.000 nouveaux cas en 2025. Le cancer du sein, quant à lui, représente 35% des cancers diagnostiqués chez la femme, avec 10.695 nouveaux cas en 2013 (Cancer Burden in Belgium 2004-2013, Belgian Cancer Registry, Brussels 2015).

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme dans les pays développés. En Belgique, il touche une femme sur 9. La Belgique est d'ailleurs le pays européen avec la plus haute incidence de cancer du sein, devant les Pays-Bas et le Royaume-Uni. Le 31 décembre 2013, 80.099 femmes - à savoir 1,4% de la population belge - étaient en vie après avoir reçu un diagnostic de cancer du sein (Cancer Burden in Belgium 2004-2013, Belgian Cancer Registry, Brussels 2015).

Dans notre pays, l'incidence du cancer du sein est restée stable entre 2004 et 2013. Elle devrait cependant croître au cours des prochaines années, avec 12.340 cas attendus en 2025, principalement suite au vieillissement et à l'accroissement de la population. On observe, par ailleurs, des différences dans l'évolution de l'incidence en fonction des groupes d'âge. Entre 25 et 69 ans, l'incidence est restée globalement stable. Par contre, les cancers du sein diagnostiqués après 70 ans sont de plus en plus fréquents, avec une augmentation d'incidence de 2% par an depuis 2004. Cette courbe évolutive est davantage prononcée pour les stades débutants par rapport aux stades localement avancés (Cancer Burden in Belgium 2004-2013, Belgian Cancer Registry, Brussels 2015).

De par sa fréquence statistique, le cancer du sein est également la 1^{ère} cause de décès par cancer chez la femme dans les pays européens. Depuis 2004, cette mortalité s'est cependant réduite d'environ 2% par an, probablement suite à un diagnostic plus précoce et un traitement

Introduction

plus efficace (Cancer Burden in Belgium 2004-2013, Belgian Cancer Registry, Brussels 2015).

L'âge moyen au diagnostic de cancer du sein en Belgique est de 62 ans (Cancer Survival in Belgium, Belgian Cancer Registry, Brussels 2012).

b. Dépistage

Le principal objectif du dépistage du cancer du sein est de réduire sa mortalité grâce à une détection à un stade précoce.

Selon les recommandations européennes, le programme organisé de dépistage du cancer du sein doit proposer aux femmes de 50 à 69 ans de réaliser une mammographie (Mammotest®) tous les 2 ans. Cette mammographie doit répondre à certains critères d'exigence en terme de qualité. Notamment, la lecture par deux radiologues indépendants et aguerris (Perry et al., 2008).

Statistiquement parlant, pour 1000 femmes qui bénéficient d'un dépistage de cancer du sein dans le cadre d'un programme organisé, 96 ont une exploration complémentaire et 15 ont une biopsie d'une lésion suspecte. Un cancer du sein est retrouvé chez 4 femmes, sur les 15 biopsies réalisées. Il faut donc faire, en moyenne, 1000 mammographies pour diagnostiquer 4 cancers du sein (Kohn et al., 2014).

La performance diagnostique de la mammographie pour le cancer du sein a été étudiée de manière prospective. Sur la population globale, la mammographie sur film a une performance de 78% (*Area Under The Curve*, $AUC = 0,78 \pm 0,02$) et la mammographie numérique de 74% ($AUC = 0,74 \pm 0,02$). Pour les femmes de moins de 50 ans, avec des seins plus denses, la mammographie sur film a une performance de seulement 69% ($AUC = 0,69 \pm 0,05$), ce qui correspond à une sensibilité de 35% et une spécificité de 98% (Pisano et al., 2005).

L'impact du dépistage par mammographie sur la mortalité liée au cancer du sein est incertain. Aux Etats-Unis, une analyse rétrospective a montré que l'introduction du dépistage par mammographie dans les années 1980 a permis, chaque année, de doubler le nombre de cancers du sein diagnostiqués à un stade débutant. En contre partie, ce dépistage n'a permis de réduire que de 8% le nombre absolu de cancers du sein

Introduction

diagnostiqués à un stade localement avancé, à savoir avec un envahissement ganglionnaire. De plus, la mammographie n'a eu aucun impact sur l'incidence des nouveaux diagnostics de cancers du sein métastatiques. Les auteurs de cette étude ont conclu que le dépistage par mammographie n'avait probablement pas contribué de façon majeure à diminuer la mortalité liée au cancer du sein (Bleyer et al., 2012). Une méta-analyse de la Cochrane a, quant à elle, estimé que le dépistage avait permis de réduire de l'ordre de 15% la mortalité liée au cancer du sein, après un suivi de 13 ans. En contre partie, le dépistage était associé à un risque de sur-diagnostic de l'ordre de 30%. En absolu, cela signifie que, pour 2000 femmes dépistées pendant 10 ans, une femme évitera de mourir d'un cancer du sein mais 10 femmes auront des explorations et des traitements invasifs et inutiles (Gøtzsche et al., 2013 et Marmot et al., 2013).

Outre ses performances, la mammographie présente d'autres inconvénients. L'examen est opérateur-dépendant et sa performance pourrait diminuer de l'ordre de 58% pour un radiologue qui interprète moins de 500 examens par an (Théberge et al., 2014). La mammographie expose aussi les femmes à des radiations ionisantes, potentiellement cancérigènes, surtout dans une population jeune et/ou à haut risque (p.ex. en cas de mutation germinale des gènes BRCA 1 ou 2). Un modèle prédictif a évalué que, pour 100.000 femmes avec une mammographie digitale annuelle entre 40 et 55 ans puis tous les 2 ans jusqu'à l'âge de 74 ans, 86 cancers du sein seront induits par les radiations ionisantes et 11 patientes décéderont de ce cancer (Yaffe et al., 2011).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de biomarqueur sanguin prospectivement validé pour le dépistage du cancer du sein. Le CA15.3 (*Carbohydrate Antigen 15.3*) est la partie soluble d'une glycoprotéine membranaire surexprimée par les cellules cancéreuses mammaires. Les performances du dosage sanguin du CA15.3 au diagnostic initial du cancer du sein sont largement insuffisantes pour qu'il soit utilisé pour le dépistage (AUC de 0,57 pour les stades I, de 0,62 pour les stades II et de 0,80 pour les stades 3) (Gion et al., 2001). En pratique, le CA15.3 est mesuré dans le suivi après un diagnostic de cancer du sein, afin de détecter une rechute métastatique, mais aussi pendant le traitement de la maladie métastatique, afin d'évaluer la réponse thérapeutique. Cependant, aucune étude n'a pu démontrer un bénéfice en survie du monitoring du CA15.3 et l'ESMO (*European Society of Medical Oncology*)

Introduction

ne recommande pas son dosage systématique au cours du suivi des patientes (Senkus et al., 2015).

En conclusion, le dépistage du cancer du sein doit encore s'améliorer en termes de performances, de sécurité et de confort pour les patientes.

c. Cancérogénèse et facteurs de risque

Il existe un modèle histologique pour le développement du cancer du sein, sous la forme d'un continuum. Dans ce modèle, à partir d'un lobule mammaire normal, on assiste successivement à l'apparition de microcalcifications intralobulaires, d'une hyperplasie canalaire ou lobulaire atypique, d'un carcinome canalaire ou lobulaire *in situ*, puis finalement d'un carcinome canalaire ou lobulaire infiltrant (**Figure 1**). Plusieurs progrès ont été réalisés ces dernières années dans la compréhension de cette évolution sur le plan moléculaire et génétique. Il existe cependant de nombreuses inconnues et il ne fait aucun doute que la cancérogénèse mammaire est beaucoup plus complexe (Arpino et al., 2005).

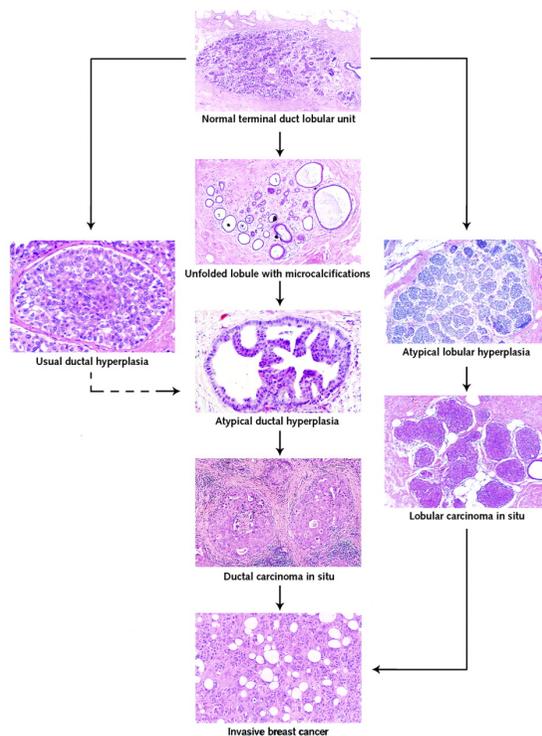


Figure 1. Evolution histologique du cancer du sein (Arpino et al., 2005).

Introduction

Un facteur déterminant dans l'induction de la cancérogénèse mammaire est l'exposition aux œstrogènes. De nombreux facteurs de risque du cancer du sein sont liés à une exposition prolongée aux œstrogènes, comme la ménarche précoce, la ménopause tardive, l'obésité ou le traitement hormonal substitutif chez la femme ménopausée (Yager et al., 2006 et McPherson et al., 2000). Le risque de cancer du sein associé à une exposition exogène aux œstrogènes a été illustré dans une étude prospective (*Women's Health Initiative study*). Cette étude a réparti 1.084.110 femmes ménopausées pour recevoir, pendant 5 ans, soit un placebo, soit un traitement substitutif par oestroprogestatifs ou par œstrogènes seuls (en cas hystérectomie préalable). Le traitement substitutif était associé à un risque relatif de cancer du sein de 1,66 après un suivi de 2,6 ans (Beral et al., 2003).

Au niveau cellulaire, les œstrogènes se lient à leurs récepteurs membranaires (*Estrogen Receptors α et β , ER*) et agissent sur l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), la mitochondrie et sur d'autres voies de signalisation intracellulaires. Par ces mécanismes, les œstrogènes inhibent l'apoptose, activent la progression dans le cycle cellulaire et la prolifération des cellules tumorales (**Figure 2**).

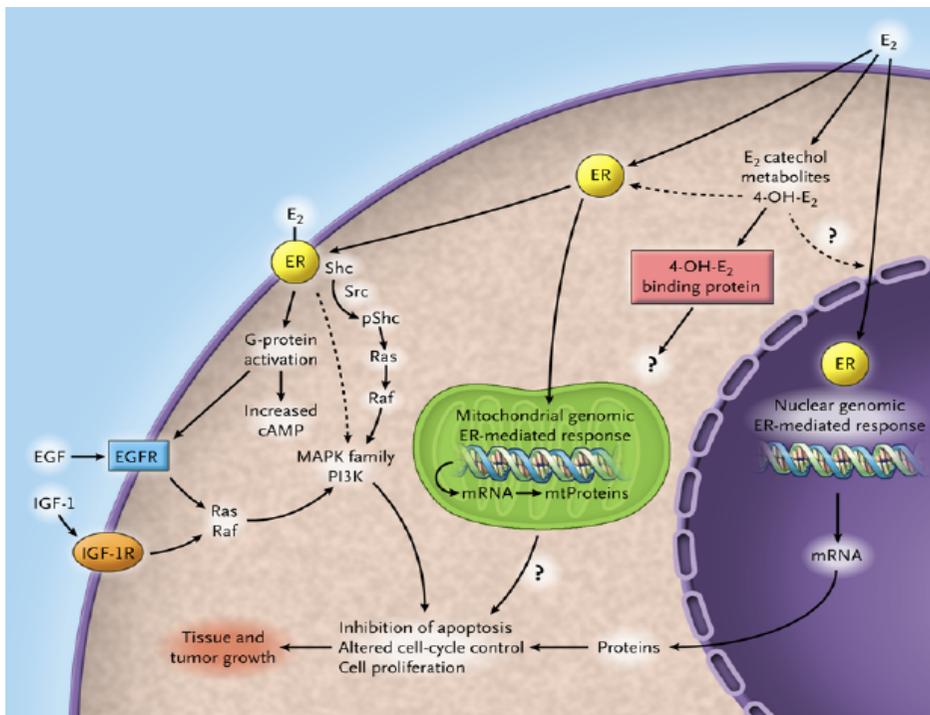


Figure 2. Voies de signalisation du récepteur aux œstrogènes (ER) qui induisent la cancérogénèse mammaire (Yaher et al., 2006).

Introduction

En dehors des œstrogènes, les autres facteurs de risque identifiés dans le cancer du sein sont (McPherson et al., 2000, **Tableau 1**) :

- l'âge. En effet, le risque de cancer du sein double tous les 10 ans jusqu'à la ménopause, même si 15 à 20% des cancers du sein sont diagnostiqués avant l'âge de 50 ans ;
- les antécédents personnels et familiaux ;
- les pathologies mammaires bénignes, en particulier l'hyperplasie mammaire atypique ;
- les facteurs environnementaux, qui ont été mis en évidence sur base d'études portant sur les populations migrantes ;
- la consommation d'alcool ;
- le régime riche en graisse.

Facteurs de risque	Risque relatif
Age	> 10
Pays développés	5
Histoire personnelle	> 4
Histoire familiale	≥ 2
Pathologies mammaires bénignes	4 à 5
Première grossesse tardive (> 40 ans)	3
Ménarche précoce (< 11 ans)	3
Ménopause tardive (> 54 ans)	2
Obésité (BMI > 35 après la ménopause)	2
Traitement hormonal substitutif	1,7
Régime riche en graisse	1,5
Consommation d'alcool	1,3

Tableau 1. Principaux facteurs de risque du cancer du sein et les risques relatifs qui y sont associés (inspiré de McPherson et al., 2000).

Environ 15% des patientes avec un cancer du sein ont une parente du 1^{er} degré (mère, sœur, ou fille) également atteinte (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001). La plupart des cancers du sein associés à un risque génétique élevé sont liés à une mutation germinale dans les gènes BRCA 1 ou 2 (*BRCA1* et *BRCA2* (*Breast Cancer susceptibility genes*)). Le risque lié aux gènes BRCA est de transmission autosomique dominante. Ces gènes interviennent, notamment, dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN via le mécanisme de recombinaison homologue (Powell et al., 2003). En cas de perte de fonction des gènes BRCA 1 ou 2, le risque cumulé de cancer du sein à 70 ans est de l'ordre de 65 et 45%, respectivement. Ces cancers du sein héréditaires apparaissent typiquement avant 50 ans et expriment plus

rarement les récepteurs hormonaux (Antoniou et al., 2003). En dehors de BRCA, il existe de nombreux autres gènes associés à un risque élevé (p.ex. TP53, PTEN, CDH1, ...) ou modéré (p.ex. CHEK2, PALB2, BARD1, RAD51D, ...) de cancer du sein (Couch et al., 2014).

d. Diagnostic

i. Signes et symptômes

Dans les pays où un programme de dépistage est mis en place, la majorité des cancers du sein sont diagnostiqués à partir d'une mammographie. A l'examen sénologique, le cancer du sein se présente classiquement sous la forme d'une masse hyperdense, hypoéchogène, avec des contours spiculés et des calcifications internes (Harris, 2014; **Image 1**).

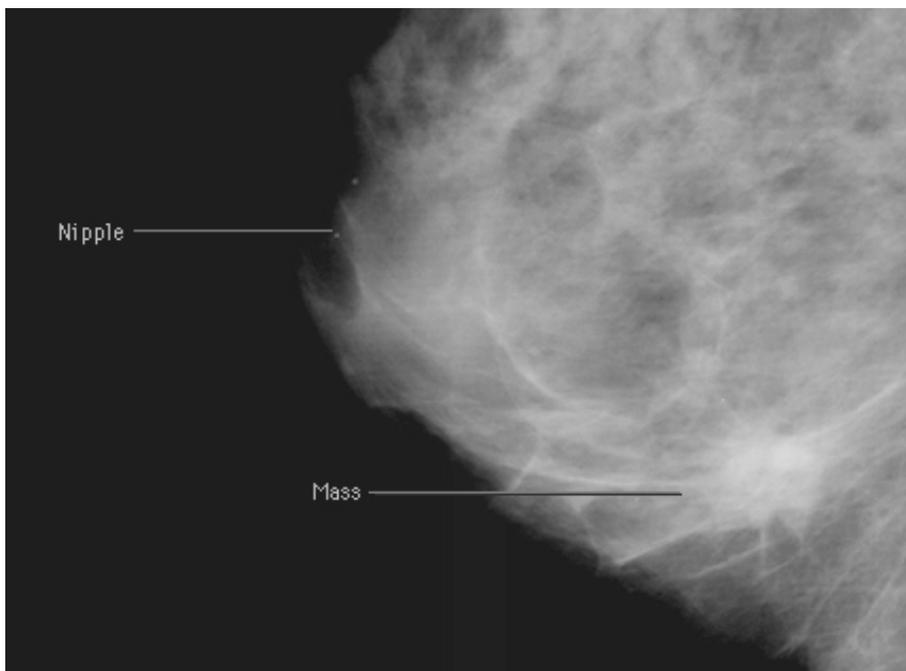


Image 1. Mammographie montrant une lésion mammaire compatible avec un cancer du sein (Yale University, 2006).

Malgré le dépistage, jusqu'à 15% des cancers du sein restent diagnostiqués suite à la palpation d'une lésion mammaire non détectée à la mammographie (cancer « occulte ») et jusqu'à 30% apparaissent entre deux mammographies (cancer « d'intervalle ») (Esserman et al., 2011). A la palpation, il s'agit généralement d'une masse indurée, non mobile et,

Introduction

en cas de stade avancé, des modifications cutanées peuvent apparaître (érythème, ulcères, peau d'orange, ...) (Harris, 2014).

ii. Analyses anatomopathologiques

Toute lésion suspecte au niveau mammaire nécessitera une biopsie à l'aiguille fine (*fine needle aspiration*) ou à l'aiguille creuse (*core needle biopsy*). L'analyse histologique permettra de confirmer le diagnostic de cancer du sein.

Il existe différents types histologiques de cancer du sein qui diffèrent dans leur comportement et leur profil biologique (**Image 2**). Le cancer canalaire infiltrant (CCI) (ou carcinome *Not Otherwise Specified*, NOS) est le plus fréquent (70 à 80% des cas), suivi par le cancer lobulaire infiltrant (CLI, 8% des cas), et les formes mixtes (canalaires et lobulaires, 7% des cas). Dans 5% des cas, on retrouve des formes plus rares de cancers du sein (cancers mucineux, tubulaires, médullaires ou papillaires) (Li et al., 2005).

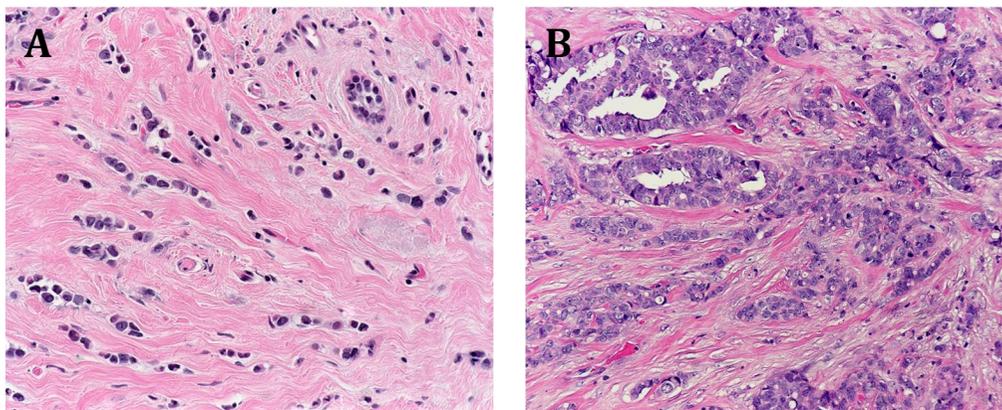


Image 2. Aspect histologique du cancer canalaire infiltrant (A) et du cancer lobulaire infiltrant (B) (Johns Hopkins Medecine).

e. Bilan post-diagnostic

Une fois le diagnostic de cancer du sein posé, le bilan sera poursuivi avec une anamnèse et un examen clinique exhaustifs, des examens d'imagerie et des analyses anatomopathologiques complémentaires, afin de déterminer le stade et la stratégie thérapeutique, propres à chaque patiente (Senkus et al., 2015).

i. Anamnèse, examen clinique et biologie sanguine (Senkus et al., 2015)

En cas de lésion mammaire palpée, il faudra déterminer sa vitesse d'apparition. Des signes en faveur de métastases à distance seront également recherchés, comme des douleurs osseuses ou des céphalées inhabituelles. Le médecin devra systématiquement s'informer de l'état de santé général, du statut ménopausique et des antécédents familiaux sur le plan oncologique, en particulier l'existence d'un cancer du sein et/ou de l'ovaire chez un parent proche.

A l'examen clinique, les dimensions de la masse, la présence d'adénopathies régionales et des signes en faveur de métastases, comme, par exemple, une hépatomégalie, seront recherchés.

Une biologie sanguine générale sera réalisée, comprenant un hémogramme complet, les fonctions rénale et hépatique, les phosphatases alcalines osseuses et la calcémie. En cas de doute sur le statut ménopausique, un dosage des taux sériques d'oestradiol et de FSH (*Follicule-Stimulating Hormone*) sera demandé.

ii. Imagerie

Le bilan local comprendra une mammographie bilatérale, ainsi qu'une échographie des seins et des aires ganglionnaires régionales (Senkus et al., 2015).

Une IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) mammaire n'est pas indiquée en routine mais peut être considérée en cas de (Sardanelli et al., 2010 et Senkus et al., 2015) :

- Dépistage chez une femme porteuse d'une mutation BRCA ;
- Présence d'implants mammaires ;
- Cancer lobulaire infiltrant ;
- Atteinte multifocale et/ou multicentrique ;
- Imagerie conventionnelle non contributive ou en discordance avec l'examen clinique ;
- Avant de débiter - et pour évaluer la réponse à - une chimiothérapie néoadjuvante.

La recherche de métastases à distance n'est recommandée que dans des situations précises, à savoir en présence de signes d'appel

Introduction

évoqueurs d'une localisation métastatique osseuse, pulmonaire ou abdominale, à partir d'un stade IIB ou IIIA (voir section 1.e.v.) ou en cas de cancer du sein inflammatoire. Le bilan consistera alors en un scanner thoraco-abdomino-pelvien avec injection de produit de contraste et une scintigraphie osseuse ou un PET-CT (*Positron Emission Tomography-Computed Tomography*) du corps entier (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Breast Cancer, Version 2.2016).

Lorsqu'un traitement systémique (néo)adjuvant à base d'anthracyclines et/ou de trastuzumab est envisagé, une évaluation de la FEVG (fraction d'éjection ventriculaire gauche) par échographie cardiaque trans-thoracique ou scanner multi-coupes est indispensable (Senkus et al., 2015, cf. section 1.g.vii.).

iii. Analyses anatomopathologiques

Les données anatomopathologies complètes sont indispensables avant l'initiation des traitements. Ces analyses nécessitent une biopsie à l'aiguille creuse de la lésion mammaire et/ou des éventuelles adénopathies suspectes.

Toute nouvelle tumeur mammaire devra être testée pour l'expression des récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (*Progesteron Receptors*, PR). ER et PR seront considérés positifs s'ils sont exprimés sur au moins 1% des cellules tumorales invasives en IHC (immunohistochimie) (Hammond et al., 2010).

Une surexpression du gène HER2 (ou ERBB2, *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*) est définie par une positivité sur plus de 10% des cellules tumorales en immunohistochimie (IHC 3+) ou la présence d'une amplification de HER2 en FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*) avec un ratio HER2/CEP17 (*Centromeric Probe to Chromosome 17*) supérieur ou égal à 2 (Wolff et al., 2013).

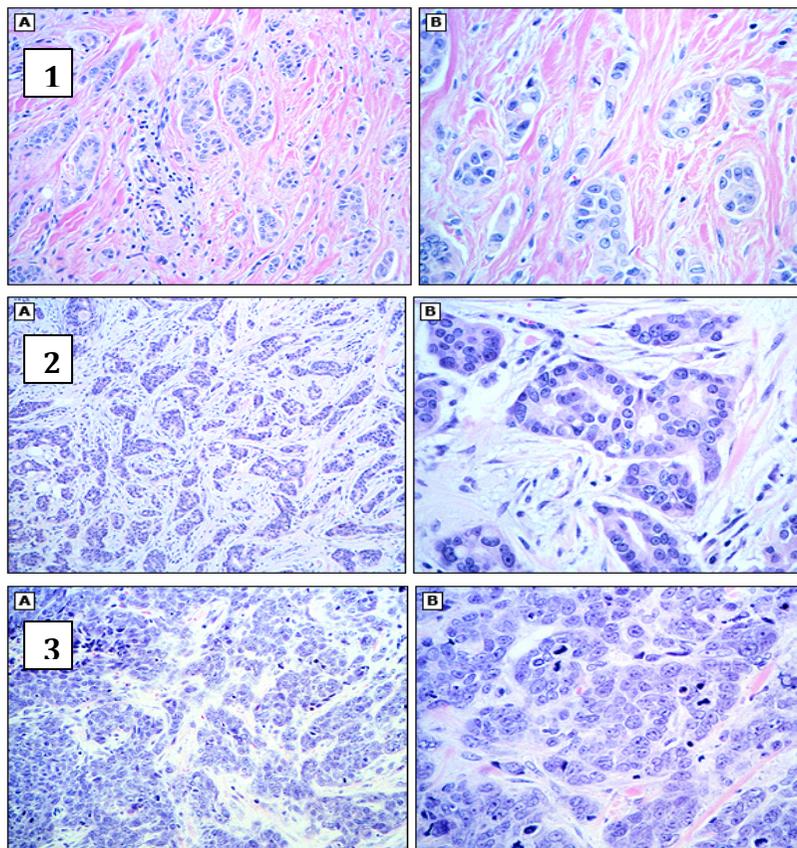
Les cancers du sein peuvent être classés dans différents sous-groupes en fonction de l'expression de ER, PR et HER2. Les cancers du sein exprimant les récepteurs hormonaux (ER et/ou PR) sont les plus fréquents (80% des cas). HER2 est surexprimé dans 23% des cas et, parmi ces tumeurs, 67% expriment également les récepteurs hormonaux. Les tumeurs qui n'expriment ni ER, ni PR, ni HER2, sont dites « triple négatives » (ou *Triple Negative Breast Cancer*, TNBC) et

Introduction

représentent 13% des cancers du sein (Parise et al., 2009). Il est important de noter que la fréquence des sous-groupes peut varier en fonction de l'origine ethnique. Par exemple, les TNBC sont plus fréquents chez les patientes d'origine américano-africaine (O'Brien et al., 2010).

Le grade des cancers du sein est déterminé par le système de classification de Elston-Ellis – lui-même inspiré de la classification de Bloom-Richardson – en fonction du pourcentage de formation tubulaire, du degré de pléomorphisme nucléaire et de l'activité mitotique. Ces différents marqueurs permettent de classer la tumeur du grade 1 à 3 (Elston et Ellis, 1991, **Image 3**).

Image 3. Aspect histologique d'un CCI de grade 1 (1), de grade 2 (2) et de grade 3 (3) à grossissement faible (panel A) et élevé (panel B) (Stuart Schnitt, MD).



Introduction

Une IHC pour l'antigène nucléaire Ki-67 permet d'évaluer le pourcentage de cellules tumorales avec une activité mitotique. La mesure du Ki-67 a tendance à être fortement hétérogène et nécessite de suivre des recommandations établies par un panel d'expert (Dowsett et al., 2011).

iv. Classification moléculaire

Début des années 2000, l'équipe de Perou et Sørлие a identifié 5 sous-types moléculaires de cancer du sein : Luminal A, Luminal B, Normal Breast-like, Basal-like, et HER2/ERBB2+. Pour ce faire, ils ont étudié l'expression génique d'une centaine de carcinomes mammaire avec des microarrays d'ADNc (ADN complémentaires) (**Figure 3**).

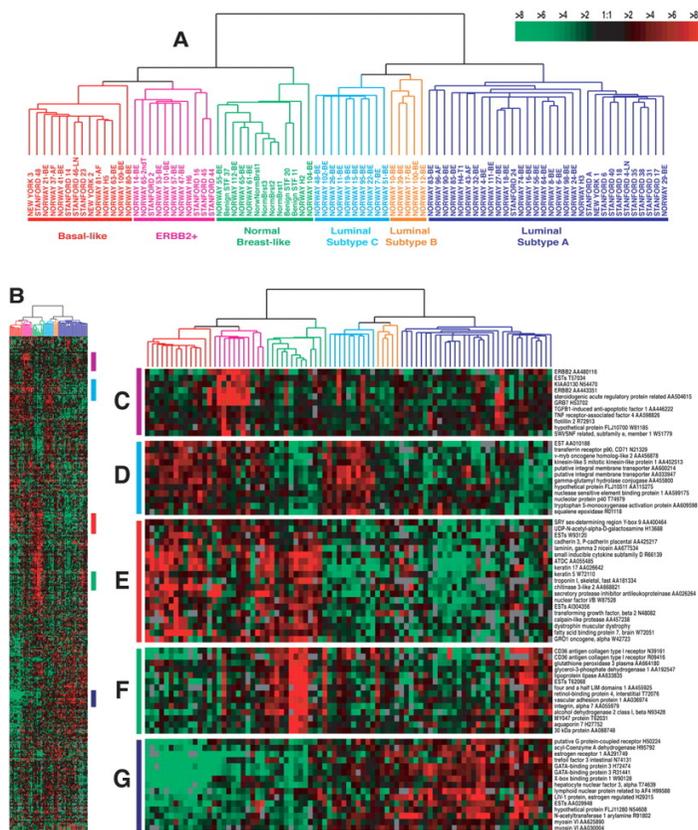


Figure 3. Classification génomique des cancers du sein selon 5 groupes (Luminal A, Luminal B, Normal Breast-like, Basal-like, ERBB2+) en utilisant une classification hiérarchique des résultats de microarrays d'ADNc (Sørлие T et al., 2001).

Introduction

Le sous-groupe Luminal était largement représenté par les tumeurs exprimant les ER et les marqueurs de type Luminal, comme les cytokératines 8 et 18. En comparaison au sous-groupe Luminal A, le sous-groupe Luminal B était caractérisé par une expression plus faible des ER et une expression plus importante des gènes de prolifération et de progression dans le cycle cellulaire. Les trois autres sous-groupes étaient caractérisés par une expression faible ou absente des ER et des marqueurs de type Luminal. En particulier, le sous-groupe Basal-like exprimait les cytokératines 5/6 et 17, le sous-groupe HER2+ exprimait plusieurs gènes de l'amplicon ERBB2 et le sous-groupe Normal Breast-like exprimait des gènes propres aux tissus adipeux et aux cellules non-épithéliales. Ces résultats ont pu mettre en lumière à quel point le cancer du sein était une maladie hétérogène (Perou et al., 2000 et Sørlie T et al., 2001). En 2012, le TCGA (*The Cancer Genome Atlas network*) a réalisé une analyse moléculaire détaillée de 507 cancers du sein. Les cancers Luminal A étaient les plus fréquents (44%), suivis des Luminal B (24%), des Basal-like (19%) et des HER2+ (11%) (*The Cancer Genome Atlas Network*, 2012).

Sous-groupes	Définition clinico-pathologique	Notes
Luminal A	ER+ HER2- Ki-67 bas* PR élevé**	*En fonction du laboratoire local. Par exemple, si le laboratoire a une valeur moyenne de Ki-67 de 20%, 30% est considéré comme élevé et 10% est considéré comme bas **20% est le cut-off généralement utilisé
Luminal B	HER2 négatif ER+ HER2- Ki-67 élevé ou PR bas HER2 positif ER+ HER2+	
HER2/ERBB2+	HER2+ ER et PR-	
Basal-like	ER, PR et HER2-*	*Environ 80% des TNBC sont Basal-like

Tableau 2. Classification moléculaire du cancer du sein sur base des données clinico-pathologiques classiques (*surrogate markers*) (Coates et al., 2015 et Senkus et al., 2015).

Introduction

Ces données sont cependant difficilement applicables à la pratique quotidienne, notamment d'un point de vue financier. L'équipe de Parker a proposé d'utiliser une plateforme de microarray, avec un nombre restreint de 50 gènes prédéfinis (PAM50, Prosigna, USA), pour déterminer le sous-groupe moléculaire du cancer du sein. La fiabilité de cette plateforme a d'ailleurs été prospectivement validée (Parker et al., 2009). La classification de Perou et Sørliie a également été corrélée aux résultats des IHC pour ER, PR, Ki-67 et à la présence ou non d'une surexpression de HER2 (Coates et al., 2015 et Senkus et al., 2015, **Tableau 2**).

v. Stade

Le stade du cancer du sein sera établi selon le système TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis system*) et permettra de mieux évaluer le pronostic et de mieux guider les traitements. Le système TNM distingue le stade clinique pré-thérapeutique, noté « cTNM », et le stade anatomopathologique post-chirurgical, noté « pTNM », et « ypTNM » en cas de traitement néoadjuvant. La 7^{ème} édition de la classification TNM pour le cancer du sein primitif est résumée ci-dessous (*AJCC-UICC TNM Classification of Malignant Tumours, 7th edition, 2009*, publié par Wiley-Blackwell).

Tumeur primaire (T)

Tx : la tumeur primitive ne peut pas être évaluée

T0 : la tumeur primitive n'est pas palpable

Tis : carcinome *in situ*

Tis (DCIS) : carcinome canalaire *in situ*

Tis (CLIS) : carcinome lobulaire *in situ*

Tis (Paget) : maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente

NB : la maladie de Paget associée à une tumeur est classée en fonction de la taille de la tumeur

T1 : tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension

T1mic : micro-invasion ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension

T1a : 1 mm < tumeur ≤ 5 mm dans sa plus grande dimension

T1b : 5 mm < tumeur ≤ 1 cm dans sa plus grande dimension

T1c : 1 cm < tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension

T2 : 2 cm < tumeur ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension

T3 : tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension

Introduction

T4 : tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe à la paroi thoracique ou à la peau

T4a : extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral

T4b : œdème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau du même sein

T4c : T4a + T4b

T4d : cancer inflammatoire

Ganglions lymphatiques régionaux (pN)

pNx : l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué (par exemple, les ganglions ont déjà été enlevés chirurgicalement ou ne sont pas disponibles pour l'analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement)

pN0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées

pN0(i-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, étude immunohistochimique négative

pN0(i+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, IHC positive, avec des amas cellulaires $\leq 0,2$ mm (considéré comme sans métastase ganglionnaire)

pN0(mol-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire négative (RT-PCR)

pN0(mol+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire positive (RT-PCR)

pN1_{mic} : micrométastases $> 0,2$ mm et ≤ 2 mm

pN1 : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et/ou de la chaîne mammaire interne détecté sur le ganglion sentinelle, sans signe clinique

pN1a : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires

pN1b : envahissement des ganglions de la chaîne mammaire interne détecté sur le ganglion sentinelle, sans signe clinique

pN1c : pN1a + pN1b

pN2 : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire

pN2a : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire > 2 mm

pN2b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire

pN3 : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou

Introduction

envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la chaîne mammaire interne détecté sur le ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

pN3a : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires (avec au moins un amas cellulaire > 2 mm) ou envahissement des ganglions sous-claviculaires

pN3b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la chaîne mammaire interne détecté sur le ganglion sentinelle sans signe clinique

pN3c : envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

Métastases à distance (M)

Mx : renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance

M0 : absence de métastases à distance

M1 : présence de métastase(s) à distance

Classification par stade UICC

0 : Tis N0 M0

I : T1 N0 M0

IIA : T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0

IIB : T2 N1 M0 ; T3 N0 M0

IIIA : T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0

IIIB : T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0

IIIC : tous T N3 M0

IV : tous T Tous N M1

Six à dix pourcents des patientes présenteront un cancer du sein métastatique d'emblée au diagnostic (cancer du sein métastatique *de novo*) et, en fonction du stade initial et de la biologie de la tumeur, environ 30% des patientes diagnostiquées avec un cancer du sein non métastatique développeront des lésions secondaires durant leur suivi (Dawood et al., 2010).

f. Facteurs pronostiques et prédictifs

Par définition, un facteur pronostique doit pouvoir fournir des informations sur l'évolution clinique de la maladie au moment du

Introduction

diagnostic, et ce indépendamment des traitements (Gasparini et al., 1993). Par rapport aux facteurs pronostiques, les facteurs prédictifs donnent des informations sur les chances de réponse à un traitement spécifique. Il est primordial, pour le clinicien, d'identifier les différents marqueurs pronostiques et prédictifs au moment du diagnostic initial d'un cancer du sein, afin de mieux individualiser les traitements.

Les différents consensus internationaux, dont le plus récent est le consensus de St. Gallen 2015 (Coates et al., 2015), ont déterminé plusieurs facteurs pronostiques et prédictifs dans le cancer du sein. Bien qu'ils puissent être classés séparément, certains facteurs sont à la fois pronostiques et prédictifs (p.ex., la surexpression de HER2).

Du point de vue de la patiente, l'âge est un élément pronostique important. Deux études ont montré qu'un âge jeune (< 35 ans) ou avancé (> 65 ans), au moment du diagnostic, est associé à un moins bon pronostic, y compris après ajustement en fonction du stade TNM, des caractéristiques tumorales et des traitements (Anders et al., 2008 et Bastiaannet et al., 2010). Par ailleurs, aux Etats-Unis, les patientes caucasiennes avec un cancer du sein non-métastatique ont une meilleure survie par rapport aux femmes d'origine afro-américaine, chez qui un TNBC est d'ailleurs plus souvent diagnostiqué (Siegel et al., 2011 et O'Brien et al., 2010).

Du point de la vue de la tumeur, le stade TNM (taille tumorale, présence d'un envahissement ganglionnaire ou de métastase(s) à distance) est le facteur pronostique le plus important. Le taux de survie globale pour le cancer du sein, tous stades confondus, est de 88% à 5 ans et de 78,9% à 10 ans. Quatre-vingt cinq pourcent des patientes seront diagnostiquées avec un stade localisé (stade I ou II) et auront un taux de survie à 5 ans supérieur à 90% (Cancer Survival in Belgium, Belgian Cancer Registry, Brussels 2012). Plus précisément, la survie globale à 5 ans est de 99% pour un stade I, de 93% pour un stade II, de 72% pour un stade III et de 22% pour un stade IV (Howlader et al., 2016). Pour le cancer du sein non-métastatique, l'envahissement ganglionnaire initial est un facteur pronostique primordial. Une diminution de la survie globale a été observée en cas de macrométastase axillaire (pN1), et une diminution de la survie sans récurrence en cas de micrométastase axillaire (pN1_{mic}). Par contre, la présence de cellules tumorales isolées (pN0_{ITC}) dans les ganglions axillaires ne semble pas influencer le pronostic de façon significative (Andersson et al., 2010).

Introduction

Le grade histologique et les marqueurs de prolifération, comme le Ki-67, ou d'invasion, comme le uPA-PAI1 (*urokinase Plasminogen Activator-Plasminogen Activator Inhibitor 1*), sont également des facteurs pronostiques importants (Senkus et al., 2015). Cependant, leur utilité clinique est controversée en raison de leur hétérogénéité et des difficultés méthodologiques liées à leur évaluation, en particulier pour le Ki-67 (Polley et al., 2013). L'ASCO (*American Society of Medical Oncology*) a d'ailleurs décidé de ne pas utiliser le Ki-67 pour déterminer le pronostic du cancer du sein. De même, la présence d'emboles lympho-vasculaires péri-tumorales semble être associée à un plus haut risque de rechute, mais une étude récente n'a pas pu le valider comme facteur pronostique indépendant (Ejlertsen et al., 2009).

L'expression de ER est généralement associée à un meilleur pronostic. Le taux annuel de rechute durant les 5 premières années après le traitement initial est plus faible en cas de tumeurs ER+ par rapport aux tumeurs ER- (9,9 versus 11,5%). Par contre, après 5 ans, les patientes avec une tumeur ER+ ont un plus haut risque annuel de récurrence (5,4 versus 3,3% entre 5 et 10 ans; 2,9 versus 1,3% entre 10 et 15 ans; 2,8 versus 1,2% entre 15 et 20 ans) (Colleoni et al., 2016). ER est un marqueur prédictif de la réponse au traitement adjuvant par Tamoxifène, comme démontré dans l'étude réalisée par l'EBCTCG (*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*). En cas de tumeurs ER+, le Tamoxifène permettait de réduire le risque de récurrence de 39% et le risque de décès de 30%, après un suivi de 15 ans. Le bénéfice était indépendant de l'expression de PR, de l'âge, de l'envahissement ganglionnaire et de l'utilisation d'une chimiothérapie adjuvante. Le Tamoxifène n'offrait par contre aucun bénéfice en survie pour les tumeurs ER- (Davies et al., 2011).

PR apparaît également comme un facteur pronostique. Dans une étude portant sur 1000 patientes, opérées à titre curatif pour un cancer du sein débutant, les analyses multivariées ont montré que l'expression de PR était indépendamment associée à une meilleure survie sans maladie (Hazard Ratio [HR] 2,72, 95% CI 2,11-3,49, $P < 0,001$) (Purdie et al., 2014). Sur le plan prédictif, comme mentionné ci-dessus, le statut de PR est par contre fortement lié à celui de ER et ne permet pas de prédire de manière indépendante le bénéfice d'une hormonothérapie adjuvante par Tamoxifène (Davies et al., 2011).

Introduction

L'amplification de HER2 est associée à un pronostic plus sombre pour les cancers du sein avec (Tandon et al., 1989 et Gusterson et al., 1992) et sans (Chia et al., 2008) envahissement ganglionnaire. Cependant, depuis l'introduction du Trastuzumab, le statut de HER2 est principalement utilisé comme facteur prédictif. Les études prospectives portant sur les thérapies anti-HER2 (voir section 1.g.v.) ont clairement montré que ces traitements sont associés à un bénéfice clinique chez les patients HER2+, en situation adjuvante et métastatique.

La classification moléculaire du cancer du sein possède indubitablement une valeur pronostique. Les risques de rechute et de décès sont plus importants dans les sous-groupes HER2+ et Basal-like, comparés au sous-groupe Luminal (Voduc et al., 2010 et O'Brien et al., 2010).

Les profils d'expression de gènes spécifiques au sein de la tumeur ont également montré un intérêt pronostique. Plusieurs plateformes sont disponibles (Oncotype-Dx[®], Mammaprint[®], Prosigna[®], Endopredict[®], ...). L'Oncotype-Dx[®] est le premier test validé pour les patientes atteintes d'un cancer du sein ER+, HER2- et sans envahissement ganglionnaire. Ce test a été évalué de manière prospective dans l'étude TAILORx. Il permet d'identifier un sous-groupe de patiente avec un risque de rechute très faible sous hormonothérapie seule (98,7% des patientes sans récurrence à 5 ans, 95% CI 97,9-99,2), et ce faible risque ne justifierait pas le recours à une chimiothérapie (Sparano et al., 2015).

Facteurs	Pronostiques	Prédictifs
Age	Oui	Non
Ethnie	Oui	Non
Stade TNM	Oui	Non
Grade histologique	Oui	Non
ER et/ou PR	Oui	Oui
HER2	Oui	Oui
Profil moléculaire	Oui	Oui

Tableau 3. Résumé des facteurs pronostiques et prédictifs associés au cancer du sein (inspiré de Frères et al., 2010, voir Annexes, **Article 4**).

g. Traitements

i. Chirurgie

La chirurgie fait partie intégrante du traitement locorégional du cancer du sein. Elle devra être conservatrice autant que possible. Il existe 2 types de chirurgie conservatrice : la tumorectomie et la quadrantectomie. La différence entre ces deux chirurgies correspond au volume de glande mammaire enlevé. La tumorectomie consiste à enlever uniquement la tumeur palpable et le tissu environnant. La quadrantectomie (ou mastectomie segmentaire) intéresse une zone plus large de glande mammaire, correspondant à un quadrant du sein, et est donc réservée à des lésions plus étendues (Harris, 2014).

Dans la mastectomie totale, toute la glande mammaire est enlevée, avec l'aréole et le mamelon. Les muscles sous le sein sont conservés (Harris, 2014). Une mastectomie est uniquement indiquée en cas de (Senkus et al., 2015) :

- Souhait de la patiente ;
- Cancers multifocaux et multicentriques ;
- Récurrence après un traitement conservateur ;
- Antécédent de radiothérapie thoracique ou contre-indication médicale à la radiothérapie ;
- Tumeur de taille importante par rapport à la taille du sein ;
- Mastectomie prophylactique en cas de mutation BRCA.

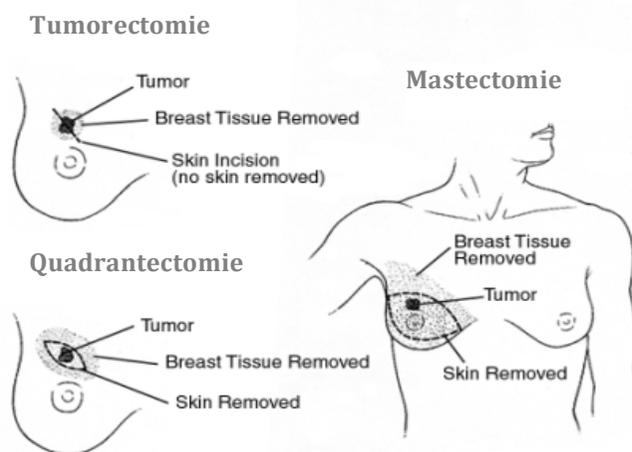


Image 4. Illustrations des différents types de chirurgie mammaire (American Cancer Society, 2016).

Introduction

Le statut des ganglions axillaires est un des facteurs pronostiques les plus importants dans le cancer du sein (cf. section 1.f.) et leur examen histologique est la méthode la plus fiable pour rechercher un envahissement ganglionnaire. Le curage axillaire (*Axillary Lymph Node Dissection*, ALND) consiste à enlever une partie des ganglions situés dans le creux de l'aisselle pour permettre leur examen histologique. Cette intervention est généralement réalisée au cours de la chirurgie mammaire et minimum 10 ganglions doivent être retirés (Harris, 2014). Le risque de lymphoedème du membre supérieur associé à cette technique est de l'ordre de 25% (Donker et al., 2014). Une alternative à l'ALND est la biopsie du ganglion sentinelle (*Sentinel Lymph Node Biopsy*, SLNB). Le ganglion sentinelle est le premier ganglion lymphatique d'une chaîne ou d'un amas ganglionnaire qui reçoit la lymphe provenant de la région tumorale. En cas d'infiltration ganglionnaire, les cellules cancéreuses se propageront le plus vraisemblablement à ce(s) ganglion(s) sentinelle(s) (Harris, 2014). La SLNB est maintenant acceptée comme un standard dans la prise en charge du cancer du sein localisé, en l'absence d'envahissement ganglionnaire suspecté à l'examen clinique ou à l'échographie (Lyman et al., 2005). Dans ces conditions, la SLNB offre la même survie et le même contrôle régional par rapport à l'ALND (Krag et al., 2010).

ii. Radiothérapie

Dans le cadre du cancer du sein, le traitement conservateur (*Breast Conserving Therapy*, BCT) est défini par l'association d'une chirurgie conservatrice suivie d'une radiothérapie complémentaire. Par rapport à la mastectomie, le BCT est associé à une survie à 10 ans au moins équivalente, voire supérieure (van Maaren et al., 2016).

Une radiothérapie externe est indiquée au niveau mammaire (*Whole Breast Radiation Therapy*, WBRT) après une chirurgie conservatrice dans la majorité des cas. La WBRT permet alors de réduire significativement le risque de récurrence à 10 ans et de décès par cancer du sein à 15 ans (Darby et al., 2011). L'extension des champs de radiothérapie aux aires ganglionnaires régionales (aires supra- et infra-claviculaires, chaîne mammaire interne) apporte également un bénéfice en cas d'envahissement axillaire initial ou de maladie à haut risque (Poortmans et al., 2015 et Whelan et al., 2015).

Après mastectomie et ALND, la radiothérapie externe (*Post-Mastectomy Radiation Therapy*, PMRT) permet également de réduire significativement le risque de récurrence à 10 ans et de décès par cancer du sein à 20 ans, mais uniquement chez les patientes avec au moins un ganglion axillaire envahi (McGale et al., 2014).

iii. Chimiothérapie adjuvante

Une chimiothérapie adjuvante, c'est-à-dire après la chirurgie initiale, est utilisée afin de diminuer le risque de récurrence lié au cancer du sein. Selon le consensus de St-Gallen, la décision d'administrer une chimiothérapie adjuvante peut être basée sur la classification moléculaire du cancer du sein, obtenue à partir du statut de ER, PR, Ki-67 et HER2 (**Tableau 2** et Coates et al., 2015).

Pratiquement, une chimiothérapie est indiquée dans la plupart des TNBC et des cancers HER2+. En cas de cancer HER2- de type Luminal, l'indication de chimiothérapie devra être individualisée en fonction des facteurs pronostiques et prédictifs, propres à chaque patiente (cf. section 1.f.). Hormis en cas d'envahissement ganglionnaire massif (4 ganglions envahis ou plus), la majorité des cancers Luminal A ne nécessitera pas de chimiothérapie adjuvante. Pour les cancers Luminal B, les experts recommandent une chimiothérapie en cas de grade 3, de 4 ganglions envahis ou plus, d'une faible expression des récepteurs hormonaux, d'un Ki-67 élevé et de la présence de nombreuses emboles lympho-vasculaires. Dans le cadre des cancers Luminal B, les tests moléculaires, comme par exemple l'Oncotype-Dx®, peuvent aider le clinicien à évaluer le risque de rechute et le besoin d'une chimiothérapie complémentaire (Coates et al., 2015 et Senkus et al., 2015).

Le schéma classique de chimiothérapie adjuvante dans les cancer du sein comprend 4 cycles à base d'anthracyclines (Doxorubicine ou Epirubicine) associées au Cyclophosphamide, suivis d'un traitement à base de taxanes (Paclitaxel ou Docétaxel). La durée totale de la chimiothérapie sera, en moyenne, de 20 semaines. Globalement, l'association d'anthracyclines et de taxanes permet de réduire de 20 à 25% la mortalité liée au cancer du sein (Peto et al., 2012 et Senkus et al., 2015).

iv. Hormonothérapie

Les œstrogènes jouent un rôle clé dans la carcinogénèse mammaire (cf. section 1.c.). La privation en œstrogènes est donc un des traitements fondamentaux du cancer du sein ER+.

Il existe 3 modalités pour empêcher les œstrogènes d'agir au niveau des cellules cancéreuses mammaires :

- la suppression de la fonction ovarienne (*Ovarian Function Suppression*, OFS), par ovariectomie bilatérale, irradiation des ovaires ou administration d'un agoniste LHRH (*Luteinizing Hormone Releasing Hormone*) ;
- les anti-œstrogènes, à savoir le Tamoxifène, un modulateur sélectif des ER (*Selective Estrogen Receptor Modulator*, SERM), et le Fulvestrant, qui provoque une dégradation spécifique des ER (*Selective Estrogen Receptor Degradar*, SERD) ;
- les inhibiteurs de l'aromatase (*Aromatase Inhibitors*, AI), à savoir le Létrozole, l'Anastrozole et l'Exémestane.

Une indication d'hormonothérapie (HT) est retenue à chaque fois que l'expression d'ER est positive sur au moins 1% des cellules cancéreuses en IHC (Hammond et al., 2010). En cas de cancer ER+, l'HT est indiquée peu importe l'utilisation ou non d'une chimiothérapie ou de thérapie(s) ciblée(s). Le choix du type d'HT dépendra principalement du statut ménopausique de la patiente et des effets secondaires attendus (Senkus et al., 2015).

Chez les femmes pré-ménopausées, le Tamoxifène (Nolvadex®) pendant 5 à 10 ans est un standard (Senkus et al., 2015). Au niveau du tissu mammaire, le Tamoxifène se fixe de manière compétitive sur les ER et y exerce un effet antagoniste (Riggs et al., 2003, Image 5). Dans une méta-analyse, comprenant plus de 20.000 patientes avec un cancer ER+, le Tamoxifène pendant 5 ans diminuait significativement le risque de récurrence à 10 ans et de décès par cancer du sein à 15 ans (Davies et al., 2011). Par rapport à une durée de 5 ans, le Tamoxifène pendant 10 ans permettait d'encore réduire le risque de récurrence et de décès par cancer du sein à 15 ans (Davies et al., 2013). L'ajout d'une OFS au Tamoxifène pendant 5 ans n'a, par contre, pas montré de bénéfice significatif en terme de survie sans maladie chez la femme pré-ménopausée (Francis et al., 2015).

Introduction

Chez les patientes post-ménopausées, le Tamoxifène et les AI sont deux options valables (Senkus et al., 2015). Les AI, comme leur nom l'indique, inhibent les aromatasés, des enzymes présentés dans de nombreux tissus périphériques (muscles, foie, tissus adipeux, ...) et qui assurent la conversion de substrats androgéniques en œstrogènes (**Figure 4**). Les aromatasés sont la principale source d'œstrogènes au niveau plasmatique chez la femme ménopausée. Dans cette population, un traitement par AI pendant 5 ans permet de réduire le risque de décès par cancer du sein de 15% supplémentaire par rapport au Tamoxifène pendant 5 ans (Dowsett et al., 2015). Comme pour le Tamoxifène, la prolongation de l'AI jusqu'à 10 ans a permis de significativement améliorer la survie sans maladie (Goss et al., 2016).

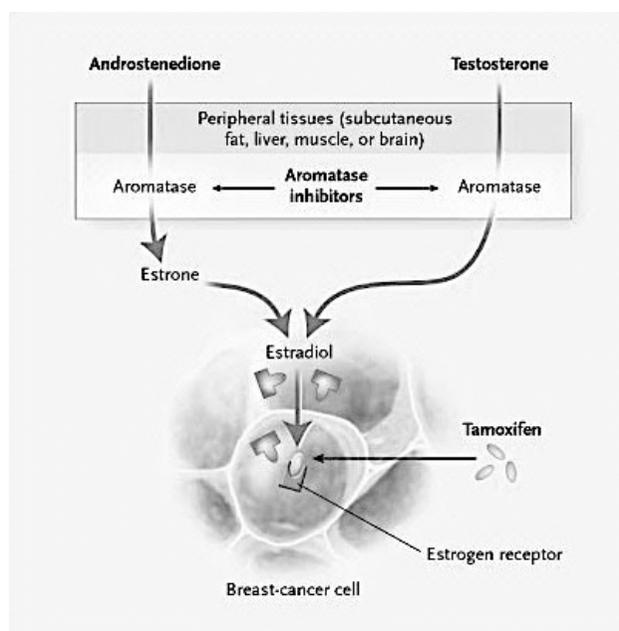


Figure 4. Mécanismes d'action du Tamoxifène et des AI dans le traitement du cancer du sein (Smith et al., 2003).

v. Thérapies ciblées

L'oncogène HER2 code pour une glycoprotéine transmembranaire avec un domaine intracellulaire possédant une activité de type tyrosine kinase. HER2 appartient à la famille des récepteurs EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), qui jouent un rôle critique dans l'activation des

Introduction

voies de signalisation intracellulaire aboutissant à la croissance et la différenciation tumorale. La surexpression de HER2 est détectée dans environ 20% des cancers du sein et est associée à un pronostic défavorable (Arteaga et al., 2012).

Le Trastuzumab (Herceptine®), mis au point fin des années 1990, est un anticorps monoclonal recombinant qui cible spécifiquement les récepteurs HER2. Dans une méta-analyse de la Cochrane, portant sur 12.000 patientes avec un cancer du sein HER2+, le Trastuzumab en association avec une chimiothérapie adjuvante, puis poursuivi seul pour une durée totale de 1 an, améliorait très significativement la survie globale des patientes (HR 0,66, 95% CI 0,57-0,80, $P < 0,00001$) (Moja et al., 2012). La prolongation du traitement adjuvant par Trastuzumab pour une durée de 2 ans n'a, par contre, pas montré de supériorité par rapport à 1 an de traitement (Goldhirsch et al., 2013). Le Pertuzumab (Perjeta®), un anticorps monoclonal qui bloque spécifiquement l'hétérodimérisation de HER2 avec d'autres récepteurs de la famille EGFR, a également permis, en association avec la chimiothérapie adjuvante et le Trastuzumab, de prolonger la survie sans récurrence des patientes avec un cancer HER2+ (von Minckwitz et al., 2017).

De nombreuses thérapies ciblées sont en cours d'étude dans le cancer du sein. Ces nouvelles thérapies ciblées, citées ci-dessous, ont toutes montré un bénéfice au stade métastatique. Cependant, leur impact clinique est encore en cours d'évaluation dans le cadre d'un traitement adjuvant ou néoadjuvant pour le cancer du sein localisé.

Après l'arrivée du Trastuzumab, d'autres molécules ont permis d'augmenter la survie des patientes avec un cancer du sein HER2+ au stade métastatique : le Pertuzumab (Swain et al., 2015), le Trastuzumab Emtansine (T-DM1, Kadcyla®), une combinaison du Trastuzumab avec un inhibiteur des microtubules appelé le DM1 (Krop et al., 2014), et le Lapatinib (Tyverb®), un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de HER2 (Geyer et al., 2006).

Dans les cancers du sein ER+ et HER2-, le Palbociclib (Ibrance®), le Ribociclib (Kisqali®) et l'Abémaciclib, des inhibiteurs des CDK 4/6, ainsi que l'Everolimus (Afinitor®), un inhibiteur de mTOR, ont montré un bénéfice en termes de survie sans progression au stade métastatique (Baselga et al., 2012 et Frères et al., 2016, voir Annexes, **Article 5**).

vi. Traitements systémiques néoadjuvants

Un traitement systémique premier, dit néoadjuvant, peut être recommandé chez les patientes avec un cancer du sein inopérable (\geq stade IIIA ou *Locally Advanced Breast Cancer*, LABC) ou un cancer opérable mais pour lequel une chirurgie conservatrice est impossible. Le choix du timing des traitements systémiques (adjuvant ou néoadjuvant) n'a pas d'impact sur le pronostic à long terme du cancer du sein (Gianni et al., 2009).

La chimiothérapie néoadjuvante (*NeoAdjuvant Chemotherapy*, NAC) a pour principal objectif d'augmenter les chances de chirurgie conservatrice (Mieog et al., 2007). Mais elle offre également d'autres avantages; elle permet notamment d'évaluer la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie. L'oncologue pourra ainsi décider d'interrompre une chimiothérapie inefficace, ce qui est impossible dans le contexte du traitement adjuvant. Du point de vue de la recherche scientifique, la NAC constitue une opportunité pour étudier *in vivo* l'effet des agents cytotoxiques au niveau tumoral et systémique.

La présence d'une réponse pathologique complète (*pathological Complete Response*, pCR), par rapport à une réponse partielle (*pathological Partial Response*, pPR), est un important indice pronostique pour les patientes traitées par NAC. Une pCR est définie par l'absence de maladie invasive résiduelle dans le tissu mammaire et les ganglions après la NAC (ypT0N0 ou ypTisN0 selon le système TNM, cf. section 1.e.v.). Une méta-analyse a montré que, par rapport à une pPR, une pCR est associée à une meilleure survie globale, particulièrement en cas de TNBC (HR 0,19, 95% CI 0,12-0,31) et de cancers ER-/HER2+ traité par Trastuzumab en plus de la NAC (HR 0,08, 95% CI 0,03-0,22) (Cortazar et al., 2014).

Le régime de chimiothérapie utilisé en situation néoadjuvante est sensiblement le même qu'en situation adjuvante (cf. section 1.g.iii.). Le Trastuzumab sera également ajouté aux taxanes chez les patientes avec un cancer HER2+. Le double blocage de HER2, par l'addition de Pertuzumab ou de Lapatinib, en plus du Trastuzumab, a permis une augmentation significative du taux de pCR, sans toxicité surajoutée. A l'heure actuelle, il n'est cependant pas encore établi que le double blocage de HER2 se traduise par un bénéfice en survie sur le long terme (Gianni et al., 2012 et Baselga et al., 2012). De même, chez les patientes

avec un TNBC, l'utilisation de Carboplatine a augmenté les chances d'obtenir une pCR mais son impact sur le long terme n'est pas encore connu (von Minckwitz et al., 2014 et Sikov et al., 2015).

h. Cardiotoxicité des traitements

Plusieurs traitements anti-cancéreux – la chimiothérapie, la radiothérapie et les thérapies ciblées – peuvent être à l'origine d'une toxicité cardiaque. Cette toxicité inclut l'hypertension artérielle (HTA), les arythmies, les altérations de la FEVG et l'insuffisance cardiaque (*Chemotherapy-Related Cardiac Dysfunction*, CRCDD). Elle touche plus spécifiquement les patients présentant des facteurs de risque cardiovasculaires (obésité, diabète, HTA, tabagisme, insuffisance rénale) et la population pédiatrique. Cet effet secondaire, parfois dévastateur, est connu depuis de nombreuses années et ses bases moléculaires sont partiellement élucidées. Cependant, à l'heure actuelle, il est toujours difficile de prédire et prévenir une atteinte cardiaque liée à un traitement cytotoxique (Meinardi et al., 2000 et Frères et al., 2016, voir Annexes, **Article 6**).

Les anthracyclines sont utilisées depuis les années 1960 dans de nombreux types de cancers, et notamment dans le cancer du sein. Les mécanismes de leur cardiotoxicité impliquent des cassures d'ADN par inhibition de la topoisomérase 2, une perturbation de l'homéostasie du calcium, une inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale et la formation de radicaux libres aboutissant à l'apoptose des cardiomyocytes (Sandhu et al., 2014). Sur le plan clinique, les anthracyclines peuvent entraîner une diminution progressive et irréversible de la FEVG (CRCDD de type 1). Cette toxicité peut être précoce, apparaissant dans l'année (2% des cas), ou tardive, jusqu'à 20 ans après l'arrêt des traitements (4 à 5% des cas). Elle constitue un véritable challenge : des études pédiatriques ont montré qu'environ 65% des patients présentent une anomalie cardiaque 6 ans après la fin des anthracyclines (Lipshultz et al., 1995 et Kremer et al., 2000). Le facteur de risque principal est la dose cumulée d'anthracyclines. Les doses totales d'Epirubicine sont ainsi limitées à 900 mg/m². Les autres facteurs de risque sont : le sexe féminin, un antécédent de radiothérapie thoracique, l'âge (sujets jeunes et âgés), l'association avec d'autres agents cardiotoxiques (p.ex. Trastuzumab et taxanes en cas de cancer du sein HER2+), un traitement prolongé avec des doses rapprochées et une

Introduction

pathologie cardio-vasculaire sous-jacente (Curigliano et al., 2010; Floyd et al., 2005 et Sandhu et al., 2014).

Les anti-HER2 possèdent également une toxicité cardiaque. Elle implique le plus souvent une réduction asymptomatique de la FEVG et, rarement, une insuffisance cardiaque congestive (*Congestive Heart Failure*, CHF ou CRCD de type 2). Le risque de cardiotoxicité sous Trastuzumab est compris entre 2 et 13%, particulièrement après 50 ans et lors de l'utilisation concomitante d'anthracyclines. Le mécanisme moléculaire est distinct de celui des anthracyclines : l'anti-HER2 diminue la contractilité des cardiomyocytes sans entraîner leur apoptose. Par conséquent, sa cardiotoxicité est réversible, le plus souvent en 2 à 4 mois (Floyd et al., 2005, **Tableau 4**).

CRCD	Type 1	Type 2
Drogues	Anthracyclines	Anti-HER2
Evolution clinique	Toxicité irréversible	Toxicité réversible
Relation dose – effet	Oui	Non
Mécanismes	Formation de radicaux libres, stress oxydatif	Blocage de la signalisation HER2
Histologie	Vacuoles, désorganisation des myofibrilles, nécrose	Absence d'anomalie ultra-structurale visible
Réintroduction	Haut risque de récurrence	Faible risque de récurrence

Tableau 4. Principales différences entre les 2 types de CRCD (*Chemotherapy-Related Cardiac Dysfunction*) (inspiré d'Ewer et al., 2005).

Concernant l'hormonothérapie, une méta-analyse, regroupant 19.000 patientes, suggère que les AI sont associés à une augmentation du risque relatif d'évènements cardio-vasculaires par rapport au Tamoxifène (risque relatif de 1,31). Le risque absolu reste cependant faible, de l'ordre de 0,5%. Le mécanisme proposé est une perturbation du profil lipidique induite par les AI (Cuppone et al., 2008).

Introduction

L'irradiation au niveau thoracique, par exemple dans le cancer du sein ou la maladie de Hodgkin, peut également endommager le cœur, en particulier les artères coronaires. Dans le cancer du sein, une étude cas-témoins, portant sur plus de 2000 patientes, a montré que la radiothérapie augmentait le risque d'événement coronaire majeur. Le risque était directement lié à la dose reçue. Il apparaissait après moins de 5 ans et persistait jusqu'à 20 ans après la fin du traitement. Le risque absolu était plus important pour les patientes avec des facteurs de risque cardio-vasculaires préexistants (Darby et al., 2013).

Méthodes de détection par imagerie

Afin de dépister précocement une CRCD, une surveillance rapprochée des patientes qui ont reçu des anthracyclines et/ou un anti-HER2 est suggérée. La méthode de surveillance la plus utilisée à l'heure actuelle est l'échographie cardiaque bidimensionnelle (2D). Cependant, il n'existe pas de recommandations claires des sociétés scientifiques concernant les modalités de ce suivi (fréquence, durée, type d'examens).

L'échographie cardiaque 2D est malheureusement peu sensible pour détecter une CRCD. Ceci est principalement dû au fait que la FEVG diminue tardivement dans le décours de l'atteinte cardiaque et que l'examen est opérateur-dépendant (Curigliano et al., 2010). L'échographie avec contraste ou tridimensionnelle (3D) pourrait, dans l'avenir, remédier à ces problèmes mais les données sont actuellement insuffisantes (Armstrong et al., 2012). L'autre difficulté des techniques d'échographie est que le seuil pathologique pour la FEVG n'est pas défini. Ainsi, la sensibilité de l'échographie 2D augmentera d'autant plus que le seuil pathologique est bas.

Pour les patients qui présentent une FEVG comprise entre 50 et 59% en échographie 2D, une exploration complémentaire peut être préconisée. La ventriculographie isotopique (MUGA scan) et l'IRM cardiaque permettent de détecter des modifications de la structure ou de la fonction cardiaque liées aux drogues cytotoxiques lorsque les résultats de l'échographie sont sub-optimaux. Ces examens ont comme inconvénient de ne pas être facilement accessibles (Armstrong et al., 2012).

Il est donc primordial d'évaluer de nouvelles méthodes afin d'identifier et traiter rapidement les patientes concernées.

Méthodes de détection biologiques

Le rôle des biomarqueurs dans la détection précoce de la CRCD doit encore être validé par des études prospectives. Les biomarqueurs représentent cependant un potentiel intéressant car ils sont facilement accessibles.

Les troponines T (*cardiac-specific troponins T*, cTnT) constituent un marqueur sensible et spécifique de la lésion myocardique, comme dans l'infarctus du myocarde et la myocardite. Deux études ont montré que les patients ayant des cTnT élevées durant et après une chimiothérapie à base d'anthracyclines, pour différents types de cancer, présentaient une plus haute incidence d'évènements cardiaques (Cardinale et al., 1999 et 2004). L'inconvénient des cTnT est que leur augmentation implique une nécrose des cellules myocardiques, ce qui n'est pas forcément le cas lors de la chimiothérapie, et que leur demi-vie est relativement courte (2 heures), nécessitant une prise de sang rapidement après la cure (White, 2011).

Le NT-proBNP (*N-Terminal Brain Natriuretic Peptide*) est sécrété par les ventricules cardiaques lorsque ceux-ci sont distendus. Il s'agit d'un marqueur diagnostique et pronostique dans la CHF (Maisel, 2002). Une élévation significative du NT-proBNP après un traitement par anthracyclines a déjà été mise en évidence (Meinardi et al., 2001 et Poutanen et al., 2003). De plus, l'augmentation du NT-pro-BNP sous anthracyclines semble prédictive d'une toxicité cardiaque tardive du traitement (Sandri et al., 2005). Cependant, la valeur seuil de NT-proBNP n'est pas encore déterminée et ce biomarqueur ne peut remplacer l'échographie pour dépister une toxicité cardiaque aiguë (Germanakis et al., 2008 et Vogelsang et al., 2008).

Le sST2 (*soluble ST2*), un membre de la famille des récepteurs de l'interleukine 1, est un biomarqueur plus récent et lié à la fibrose myocardique. L'interleukine 33 est capable de se lier au sST2 et d'inhiber son effet protecteur au niveau cardiaque, contribuant au remodelage et à la fibrose myocardique. Deux études ont montré que le taux sanguin de sST2 permettait de prédire le risque de décès en cas de CHF (Pascual-Figal et al., 2009 et Weinberg et al., 2013). A ce titre, le sST2 s'est montré plus performant que le NT-proBNP chez les patients souffrant d'une CHF (Gruson et al., 2014), mais également dans une population ne présentant aucune maladie cardio-vasculaire (Coglianese et al., 2012). Le rôle du

Introduction

sST2 dans le dépistage de la CRCD n'a pas encore été évalué à l'heure actuelle.

2. MicroARN

a. Généralités

En 1993, l'équipe d'Ambros a découvert un gène, *lin-4*, qui contrôlait le développement d'un nématode, le *Caenorhabditis Elegans* (**Image 5**). De manière surprenante, *lin-4* ne codait pas pour une protéine mais pour une paire de petits ARN (Acide RiboNucléique), qu'ils nommèrent microARN (miARN). La même année, cette équipe a démontré que le miARN *lin-4* réprimait l'expression du gène *lin-14*, et permettait d'accélérer la croissance du *C. Elegans* (Wightman et al., 1993). En 2000, un second miARN, dérivé du gène *let-7*, a été découvert chez le *C. Elegans* (Reinhart et al., 2000), mais également chez l'humain (Lagos-Quintana et al., 2001).



Image 5. Le *Caenorhabditis Elegans* est un vers d'environ un millimètre. Son embryogénèse très courte (16 heures) permet une étude *in vivo* des mécanismes de croissance cellulaire et d'apoptose (Corsi et al., 2005).

Les miARN sont donc des molécules d'ARN simples brins, de 20 à 23 nucléotides, non codantes et exprimées uniquement par les cellules eucaryotes. Leur rôle est de contrôler l'expression des gènes, au niveau post-transcriptionnel, en se liant à leur ARN messager (ARNm) cible et en empêchant sa traduction en protéine. Les miARN jouent un rôle

fondamental dans les processus physiologiques tels que la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. A ce jour, chez l'humain, environ 2000 miARN ont été identifiés et les analyses bioinformatiques estiment qu'ils pourraient réguler l'expression de 60% du génome humain (Eulalio et al., 2008 et Friedman et al., 2009).

b. Biogénèse et mécanisme d'action

La biogénèse et l'action des miARN est un processus divisé en plusieurs étapes (He et al., 2004, **Figure 5**).

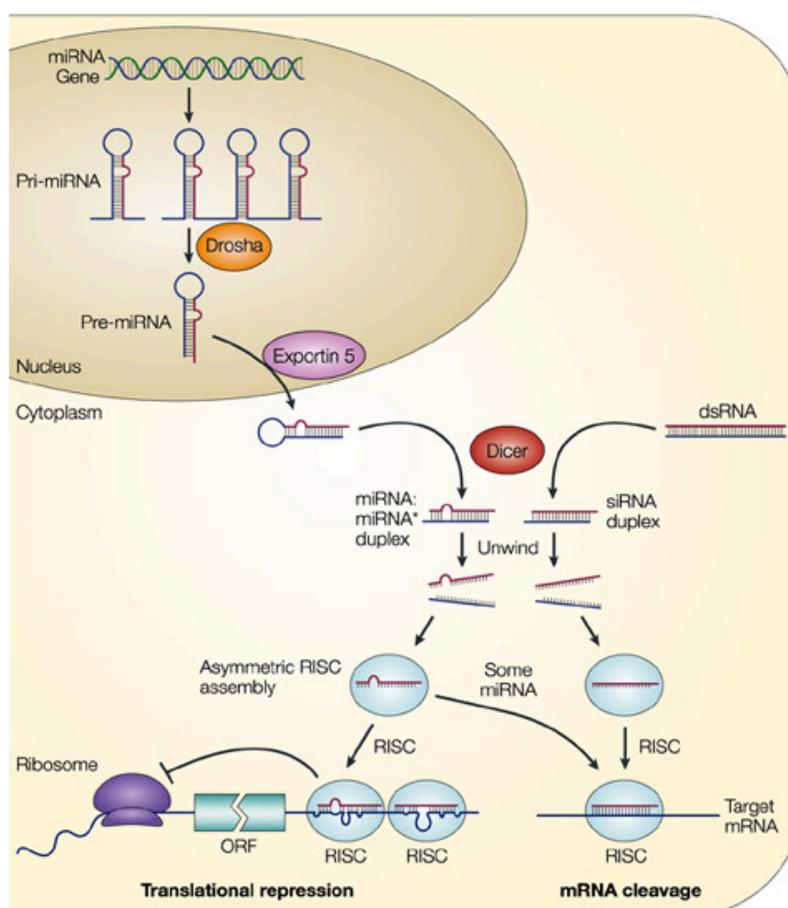


Figure 5. Les principales étapes de la biogénèse des miARN (He et al., 2004).

La transcription du précurseur du miARN primaire, le pri-miARN, est commandée à partir du gène par l'ARN polymérase-II ou -III. Le pri-

Introduction

miARN, long de 100 à 1000 nucléotides, a une structure en épingle à cheveux, avec une boucle terminale et 2 extrémités 3' et 5' simples brins. Le pri-miARN est clivé par une RNase nucléaire de type III, l'enzyme Drosha, en un précurseur d'environ 65 nucléotides, le pré-miARN. Le pré-miARN est activement exporté du noyau vers le cytoplasme par le complexe Exportine 5/Ran-GTP (*Ras-related nuclear*), puis clivé par une autre RNase de type III, l'enzyme Dicer. Sous l'action de Dicer, la boucle de la structure en épingle à cheveux est éliminée, permettant la libération d'un miARN double brin de 18 à 25 nucléotides. Le duplex de miARN forme alors, avec une protéine de la famille Argonaute (Ago), le complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*). Une fois intégrés dans le complexe RISC, les 2 brins du miARN sont séparés afin de libérer le brin guide, complémentaire à la cible, tandis que le brin restant (brin passager ou miARN*) sera dégradé (Bartel, 2004).

Pour agir, le miARN reconnaît sa cible grâce au principe d'appariement des bases : les nucléotides de l'extrémité 5' du miARN s'apparient à ceux de l'ARNm cible. En cas d'appariement parfait, principalement observé chez les plantes, l'ARNm est dégradé par les protéines Ago. Chez les animaux, la complémentarité entre le miARN et l'ARNm est généralement imparfaite, aboutissant plutôt à une inhibition de la traduction et une dégradation indirecte de l'ARNm (Eulalio et al., 2008).

c. MicroARN circulants

En 2008, l'équipe de Chim a confirmé la présence de miARN d'origine placentaire dans le plasma maternel (Chim et al., 2008). Simultanément, Lawrie et ses collègues ont détecté des miARN d'origine tumorale dans le sérum de patients atteints d'un lymphome diffus à grandes cellules B (Lawrie et al., 2008). Ces 2 équipes ont, pour la première fois, évoqué la possibilité d'utiliser les miARN comme des biomarqueurs pour la grossesse ou les cancers.

Par la suite, les miARN ont été retrouvés dans 12 fluides corporels différents, comme le lait maternel, la salive, les urines ou le liquide séminal (Weber et al., 2010). En réalité, la plupart des cellules sont capables de libérer des miARN dans l'espace extracellulaire, que ce soit dans des conditions normales ou pathologiques. Après leur exocytose, ces miARN circulent sous une forme libre ou sont enveloppés dans 3 types de vésicules différentes : les exosomes, les corps apoptotiques ou

Introduction

les vésicules HDL (*High Density Lipoprotein*) (Turchinovich et al., 2012, **Figure 6**).

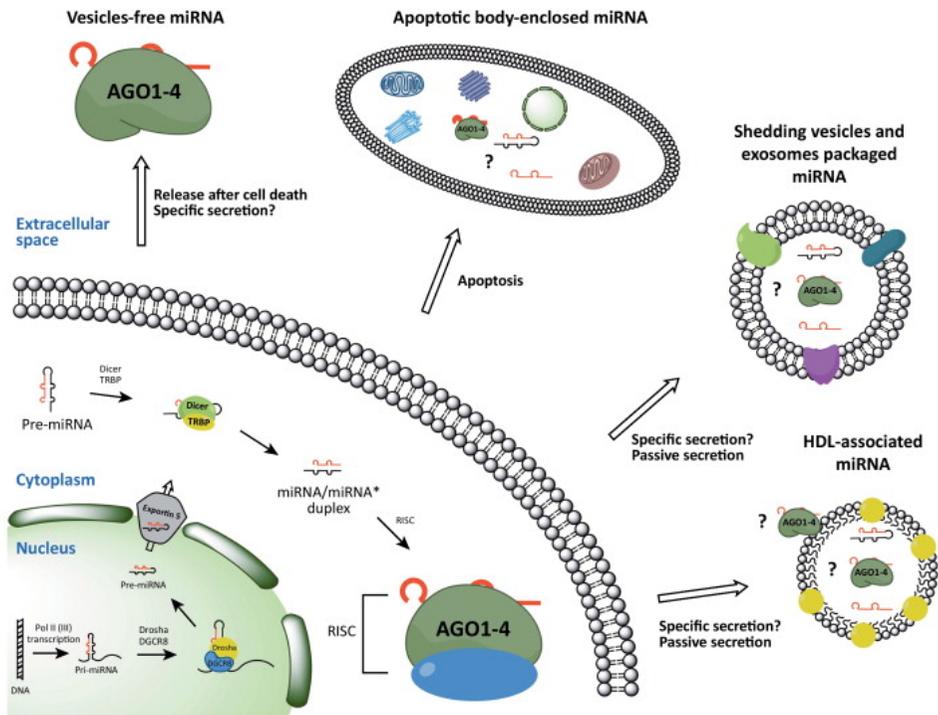


Figure 6. Exocytose des miARN sous forme libre (*Vesicle-free miRNA*) ou au sein de vésicules d'origine membranaire. Les miARN sous forme libre sont uniquement liés à une protéine de la famille Argonaute (Ago). Les 3 types de vésicules qui contiennent les miARN circulants sont : les corps apoptotiques, les exosomes et les vésicules HDL (Turchinovich et al., 2012).

Les exosomes sont des petites vésicules issues de fragments de la membrane cellulaire. Elles mesurent entre 30 et 100 nm de diamètre et sont libérées dans le milieu extracellulaire de manière constitutionnelle ou sous l'effet de stimuli environnementaux (Théry, 2011).

Grâce aux exosomes, les miARN circulants sont parfaitement stables dans les fluides corporels, y compris dans des conditions extrêmes, comme des températures élevées, des changements de pH ou des cycles de congélation et décongélation. Etant donné cette stabilité plasmatique, les miARN circulants constituent de potentiels

biomarqueurs facilement accessibles en pathologie humaine, notamment en cancérologie (Mitchell et al., 2008 et Kosaka et al., 2010).

Puisqu'ils sont présents dans le sang périphérique, les miARNs pourraient également constituer une forme de communication intercellulaire. En 2007, Valadi a montré, *in vitro*, que les miARN issus de mastocytes murins pouvaient, via les exosomes, être transférés et être fonctionnellement actifs dans des mastocytes humains (Valadi et al., 2007). Au fil des ans, plusieurs rapports ont mis en évidence le rôle des miARN circulants dans des processus tumoraux fondamentaux, tel que l'angiogenèse (Kosaka et al., 2013), la formation de métastases (Zhang et al., 2015 et Fong et al., 2015) ou la résistance à la chimiothérapie (Challagundla et al., 2015).

d. Rôles biologiques dans le cancer du sein

Le niveau d'expression des miARN est fortement perturbé au sein du tissu tumoral. En 2005, l'équipe de Lu a réalisé un profil des miARN dans plusieurs types de cancers humains. Ils ont mis en évidence une expression spécifique des miARN dans chaque type de tumeur. De plus, le niveau des miARN pouvait directement être corrélé aux caractéristiques clinico-pathologiques des tumeurs. Ces données ont apporté des arguments pour affirmer que les miARN jouent un rôle fondamental dans la cancérogenèse (Lu et al., 2005).

Globalement, les miARN peuvent soit faciliter des processus tumoraux (les « oncomiR ») ou, au contraire, les inhiber (les « miARN suppresseurs de tumeur ») (Zhang et al., 2007).

La plupart des gènes dont sont issus les oncomiR sont situés au niveau de régions chromosomiques instables dans les cellules cancéreuses. Il en résulte des altérations d'expression qui favorisent la cancérogenèse, l'apparition de métastases et la résistance aux traitements. A titre d'exemple, le miR-21 et le miR-155 sont deux importants oncomiR dans le cancer du sein. Le miR-21 est surexprimé dans la plupart des tumeurs. Il favorise la migration cellulaire et inhibe des gènes suppresseurs de tumeur, comme PTEN. Dans le cancer du sein, sa surexpression est associée à un stade clinique avancé, à l'envahissement ganglionnaire et à un pronostic défavorable (HR 4,1 pour la survie globale, 95% CI 1,8-9,5, $P = 0,001$) (Yan et al., 2008). Le miR-155 favorise la survie de la cellule tumorale et l'angiogenèse,

Introduction

notamment en inhibant l'expression de FOXO3A et VHL. De façon intéressante, BRCA1, qui a un rôle bien connu dans la pathogenèse du cancer du sein et de l'ovaire, joue son rôle suppresseur de tumeur en partie en inhibant le miR-155 (Chang et al., 2011). L'expression du miR-155 dans le cancer du sein est significativement plus élevée par rapport au tissu normal avoisinant et cette élévation est directement associée à un mauvais pronostic en terme de survie globale (HR 2,41, 95% CI 1.49-3.89, $P < 0.001$) (Kong et al., 2014).

Les mécanismes de réparation de l'ADN sont importants pour maintenir la stabilité du génome. Ces mécanismes sont souvent dérégulés dans le cancer, même si la cause initiale de cette dysfonction n'est pas toujours identifiée. Le miR-34a participe à la maintenance du génome en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et/ou une apoptose, jouant ainsi le rôle de « miARN suppresseur de tumeur ». Plusieurs laboratoires ont montré que le miR-34a était induit par TP53 et que son expression était réduite au sein des tumeurs (Hermeking, 2010). Peurala *et al.* ont étudié, par immunohistochimie, l'expression du miR-34a dans 1172 cancers du sein. L'expression du miR-34a était associée à un phénotype agressif avec un grade élevé, la présence d'un envahissement ganglionnaire et l'absence de récepteurs aux estrogènes. Cependant, la surexpression du miR-34a diminuait le risque de récurrence à distance et de décès lié au cancer du sein (HR 0,63, 95% CI 0,41-0,96, $P = 0,03$). Ces résultats tendent à confirmer que le miR-34a est un suppresseur de tumeur, son expression permettant de bloquer l'apparition de métastases à distance (Peurala et al., 2011). Cette hypothèse a été renforcée par le travail de Krzeszinski *et al.* (Krzeszinski et al., 2014). Cette équipe a en effet démontré que le miR-34a, en inhibant Tgif2, inhibait les ostéoclastes et diminuait le risque de formation de métastases osseuses en cas de cancer du sein chez la souris.

La famille *let-7* est une des premières familles de miARN identifiées. *Let-7* joue un rôle « suppresseur de tumeur » dans de nombreux cancers. Une importante étude a clairement montré que la diminution d'expression de *let-7* dans le tissu mammaire favorisait sa cancérogenèse en agissant simultanément sur plusieurs cibles (H-RAS, HMGA2, LIN28) (Volinia et al., 2012).

En 2013, une publication dans le journal *Nature* a décrit le profil des miARN dans 1302 cancers du sein. Des profils de miARN spécifiques ont pu être identifiés pour les différents sous-types moléculaires de

cancer du sein, à l'exception du groupe Luminal B. De plus, ils ont démontré que l'expression des miARN était particulièrement modifiée dans les tumeurs à forte composante immunitaire, laissant suspecter un rôle des miARN dans la réponse lymphocytaire anti-tumorale (Dvinge et al., 2013).

e. Intérêts diagnostiques dans le cancer du sein

A titre diagnostique, les miARN dérégulés à l'intérieur de la tumeur ont un intérêt limité car leur analyse nécessite, de toute façon, une biopsie de la lésion suspecte. Par contre, plusieurs équipes ont mis en évidence des signatures de miARN circulants qui permettent un diagnostic précoce et non invasif du cancer du sein. Les résultats se sont avérés cependant très hétérogènes d'une étude à l'autre, notamment suite à d'importantes variations dans le type d'échantillons et de technologies utilisées, mais aussi dans la méthodologie de l'étude, comme la normalisation et la validation des résultats.

En 2010, Heneghan *et al.* ont été les premiers à mettre en évidence une expression spécifique des miARN circulants dans le cancer du sein. Ils ont quantifié 7 miARN chez des patients atteints de différents types de cancers (sein, prostate, colon, rein et mélanome, $n = 163$) et chez des sujets sains ($n = 63$). Ils ont ainsi découvert une élévation spécifique du miR-195 en cas de cancer du sein. Ce seul miARN permettait de distinguer les cancers du sein des sujets contrôles et porteurs d'un autre type de cancers avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 94% (AUC = 0,94) (Heneghan et al., 2010). La même année, Roth *et al.* ont mesuré 4 miARN circulants (miR-10b, miR-34a, miR-141, et miR-155) dans le sérum de 59 patientes avec un cancer du sein localisé, 30 avec un cancer du sein métastatique, et 29 femmes saines. Le niveau des miR-10b, miR-34a et miR-155 était significativement plus élevé chez les patientes comparé aux femmes saines (Roth et al., 2010).

En 2013, Chan *et al.* ont publié les résultats d'une large étude sur le rôle diagnostique des miARN circulants dans le cancer du sein. Ils ont mesuré, au sein d'une première cohorte contenant 32 patientes et 22 femmes saines, plus de 1300 miARN circulants. Ils ont ensuite sélectionné 4 miARN fortement modifiés en cas de cancer du sein (miR-1, miR-92a, miR-133a, et miR-133b) et les ont mesuré dans une seconde cohorte, comprenant 132 patientes et 101 contrôles. L'association de ces 4 miARN permettait le diagnostic exacte du cancer du sein avec une

Introduction

excellente performance dans la cohorte de validation (AUC = 0,90 à 0,91) (Chan et al., 2013). Plus tard, Kodahl *et al.* ont identifié une signature de 9 miARN circulants (miR-15a, miR-18a, miR-107, miR-133a, miR-139-5p, miR-143, miR-145, miR-365, et miR-425) pour le diagnostic du cancer du sein ER+. Cette signature était moins performante (AUC dans la cohorte de validation = 0,66) mais a été validée de manière indépendante dans la cohorte de Chan (Kodahl et al., 2014). Récemment, la signature miARN de Kodahl a été testée sur 116 femmes qui se présentaient pour une mammographie de dépistage. 36 femmes présentaient effectivement un cancer du sein, et les miARN circulants permettaient de distinguer ces 36 patientes des femmes saines avec une AUC de 0,61. Une femme de la cohorte, dont la signature de miARN prédisait un risque de 73% de présenter un cancer du sein, a effectivement développé un cancer du sein au cours de l'année suivante, malgré une mammographie initiale normale (Lyng et al., 2016).

Le **Tableau 5** résume les principales études sur le rôle diagnostique des miARN circulants dans le cancer du sein, en présentant le nombre de patientes et de contrôles inclus, le type d'échantillon, la méthode de quantification et le type de référence (« normalisateurs ») utilisés.

Introduction

Références	Cancers du sein vs contrôles	Echantillons	Méthode de mesure	Normalisateur(s)
Heneghan et al., 2010	74 vs 63	Sang total	RT-qPCR	miR-16
Roth et al., 2010	89 vs 29	Sérum	RT-qPCR	miR-16
Wang et al., 2010	68 vs 40	Sérum	RT-qPCR	miR-16
Zhao et al., 2010	20 vs 20	Plasma	RT-qPCR	miR-16
Hu et al., 2012	124 vs 124	Sérum	RT-qPCR	miR-191 + miR-484
Guo et al., 2013	20 vs 30	Sérum	Séquençage	Néant
Wu et al., 2012	63 vs 60	Sérum	RT-qPCR	U6
Chang et al., 2013	164 vs 123	Sérum	RT-qPCR	miR-103 + miR-191
Ng et al., 2013	240 vs 150	Plasma	RT-qPCR	U6
Cuk et al., 2013	137 vs 90	Plasma	RT-qPCR	Cel-miR-39
Leidner et al., 2013	20 vs 20	Plasma	Microarray	Néant
Kodahl et al., 2014	108 vs 75	Sérum	RT-qPCR	miR-10a
Zhu et al., 2014	8 vs 8	Sérum	Séquençage	Néant
Zearo et al., 2014	127 vs 35	Sérum	RT-qPCR	miR-16
Shen et al., 2014	97 vs 77	Plasma	RT-qPCR	miR-93
Zhang et al., 2015	101 vs 72	Sérum	RT-qPCR	miR-103a + miR-132
Matamala et al., 2015	142 vs 197	Plasma	RT-qPCR	miR-103a-3p

Tableau 5. Résumé des caractéristiques des principales études ayant identifié un ou plusieurs miARN avec un intérêt diagnostique dans le cancer du sein.

f. Intérêts pronostiques et prédictifs dans le cancer du sein

Nous avons déjà décrit le rôle pronostique de la surexpression tumorale du miR-21 et miR-155 (cf. section 2.d.). Il existe, dans la littérature, d'autres exemples de miARN qui aident à prédire la rechute ou la réponse aux traitements.

Les miARN exprimés dans le tissu tumoral peuvent avoir un intérêt pronostique. Par exemple, Volinia a défini, à partir de l'expression de 30 ARNm et 7 miARN, une signature permettant de prédire la rechute métastatique dans le cancer du sein, surtout pour les stades I et II (AUC = 0,77 à 60 mois de survie globale). Par comparaison, la performance du Mammaprint®, un test basé sur l'expression de 70 gènes, était inférieure dans la même cohorte (AUC = 0,66, $P = 0,026$) (Volinia et Croce, 2013).

Les miARN circulants ont également montré une valeur pronostique et/ou prédictive dans le cancer du sein.

Le miR-375 et le miR-122 ont été étudiés dans des échantillons sanguins de 42 patientes avec un cancer du sein de stade II ou III, et bénéficiant d'une NAC. Ces miARN sont connus pour inhiber la migration et l'invasion cellulaire, notamment via l'inhibition de JAK2. Le niveau de miR-375 et miR-122 permettait non seulement de prédire la réponse pathologique à la chimiothérapie, mais était également corrélé au risque de rechute métastatique (Wu et al., 2012).

La quantification du miR-210 dans le plasma de 39 patientes avec un cancer du sein HER2+ a montré des niveaux significativement plus élevés chez les patientes avec un résidu tumoral après une NAC contenant du Trastuzumab. *In vitro*, le miR-210 était d'ailleurs significativement plus exprimé dans les cellules tumorales résistantes au Trastuzumab (Jung et al., 2012).

Dans le TNBC, la combinaison de 4 miARN circulants (miR-18b, miR-103, miR-107, et miR-652) a permis, chez 110 patientes, de définir un groupe à haut risque associé à une survie sans récurrence et une survie globale nettement plus faible (Kleivi Sahlberg et al., 2015). La mesure du miR-548c intra-tumoral, associée à la taille tumorale, à l'envahissement ganglionnaire et à l'expression des cytokératines 5/6, a

également permis de prédire, avec une AUC de 0,96, le risque de rechute et de décès lié au TNBC à 5 ans (Boukerroucha et al., 2015).

g. Perspectives thérapeutiques

Les miARN constituent un domaine de recherche très vaste et hétérogène en cancérologie. Ces petites molécules tiennent cependant des promesses en terme de biomarqueurs diagnostiques et pronostiques. Plus encore, les miARN pourraient constituer des armes thérapeutiques pour mieux lutter contre le cancer dans le futur.

En 2012, une équipe chinoise a traité un modèle murin de cancer du sein avec le miR-34a, injecté par voie intraveineuse sous forme de nanoparticules. Ce traitement a induit une réponse tumorale significative et a prolongé la survie des souris, sans toxicité systémique majeure (Li et al., 2012). Les mêmes résultats ont pu être obtenus chez des souris porteuses d'un cancer de prostate ou d'un cancer pulmonaire non à petites cellules (Liu et al., 2011; Kasinski et al., 2015). Les mécanismes d'action évoqués sont une réduction des cellules souches pluripotentes CD44+ au sein de la tumeur, mais également un effet sur les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral. Dans un modèle murin de cancer pulmonaire, le miR-34a a en effet permis de promouvoir les TILs (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*) et d'inhiber l'axe PD-L1 (*Programmed cell Death-Ligand 1*), les macrophages et les TREG (*T REGulatory cells*), aboutissant à une réponse immunitaire anti-tumorale (Cortez et al., 2015).

La recherche préclinique sur le miR-34a s'est poursuivie jusqu'à mettre au point un traitement pour l'homme (MRX34®, miRNA therapeutics, USA). Cette forme de traitement innovant est entrée en phase clinique en 2013. Une centaine de patients, avec différentes tumeurs solides (hépatocarcinome, mélanome, cancers du rein, ...) ou une hémopathie (lymphomes, myélomes multiples), ont été traités avec le MRX34. Une réponse tumorale partielle a été notée chez quelques patients. Malheureusement, en septembre 2016, la firme a interrompu l'étude car 5 patients ont présenté un syndrome de relargage de cytokines, dont un cas sévère (grade 4).

L'avenir thérapeutique des miARN est donc incertain et nécessite encore de nombreuses années de développement avant de pouvoir, éventuellement, atteindre le lit de nos patients.

Objectifs

La prise en charge adéquate d'une patiente atteinte d'un cancer du sein nécessite de respecter un équilibre délicat. En effet, une méthode de diagnostic efficace permet d'identifier un cancer à un stade précoce et, éventuellement, de diminuer le risque de décès lié au cancer. Ce diagnostic précoce va cependant avoir un impact considérable sur la patiente. Notamment, il l'expose à une chimiothérapie potentiellement toxique et dont l'utilité est incertaine dans le cadre d'une maladie débutante. Dans ce contexte, l'identification d'outils prédictifs de l'efficacité et de la toxicité de la chimiothérapie est primordiale.

L'objectif de ce projet de recherche était d'explorer le potentiel des miARN circulants en tant que biomarqueurs dans le diagnostic et le traitement du cancer du sein. Pour ce faire, nous avons décidé d'étudier les miARN circulants au moment du diagnostic initial, mais également de manière longitudinale durant la NAC. L'hypothèse était que, si la NAC modifiait significativement les miARN circulants, l'amplitude de ces variations permettrait de prédire son effet sur la tumeur, mais également la toxicité de cette dernière sur d'autres organes, comme le coeur.

Le modèle de la NAC a été retenu car il permet d'étudier *in vivo* l'effet direct de la chimiothérapie sur la tumeur. De plus, les patientes qui débutent une NAC sont encore naïves de tout traitement, comme la chirurgie ou la radiothérapie, et nous évitons ainsi l'interférence de ces traitements dans le niveau d'expression des miARN circulants.

Les résultats obtenus durant cette thèse sont présentés au travers de 3 publications, chacune précédée d'un résumé regroupant les principales données qui en ressortent.

Le premier article retrace l'identification d'une signature de 8 miARN circulants pour le diagnostic du cancer du sein, y compris à un stade débutant. Cette signature a également été validée chez des patientes en rémission de leur cancer du sein ou, au contraire, souffrant d'une rechute métastatique, offrant donc une possibilité pour la surveillance des patientes. Les 8 miARN se sont par contre montrés

Objectifs

inefficaces dans le diagnostic de différents cancers gynécologiques, confirmant leur spécificité pour le cancer du sein (**Article 1**).

Dans la seconde partie du projet, nous avons démontré que la NAC augmentait temporairement le niveau d'expression de plusieurs miARN au niveau circulant, mais également à l'intérieur même du tissu tumoral. Les variations du miR-34a circulant ont notamment permis de prédire la réponse tumorale à la NAC pour les cancers HER2+ et les TNBC (**Article 2**). La cinétique des miARN circulants durant la NAC a, quant à elle, révélé que les anthracyclines étaient des puissants inducteurs de plusieurs miARN, dont le miR-34a, le miR-126-3p, miR-199a-3p, et le miR-423-5p, tous liés d'une manière ou d'une autre à l'insuffisance cardiaque. La mise à disposition des échantillons plasmatiques nous a également permis d'étudier un nouveau marqueur de l'insuffisance cardiaque, le sST2, et de confirmer sa forte élévation sous l'effet de la NAC. L'ensemble de ces biomarqueurs pourrait donc permettre de créer une signature pour prédire ou dépister précocement une CRCO (**Articles 2 et 3**).

Le manuscrit se termine par une discussion des différents résultats dans le contexte actuel du dépistage et du traitement du cancer du sein. Particulièrement, les nombreuses perspectives ouvertes par ce projet sont évoquées.

Résultats

1. Identification d'une signature de microARN circulants pour le dépistage du cancer du sein

Notre recherche a débuté avec la mesure, par RT-qPCR, de 742 miARN circulants sur un petit nombre de patientes atteintes d'un cancer du sein localisé et naïves de traitements ($n = 18$). Sur base du niveau moyen d'expression des miARN (Cq moyen < 36), nous en avons sélectionné 188 pour poursuivre nos analyses.

Le profil des 188 miARN circulants a ensuite été étudié auprès de 378 femmes. Nous avons recruté 149 patientes avec un cancer du sein localisé, 31 patientes avec un cancer du sein métastatique et 30 patientes avec un cancer de la sphère gynécologique. Lors de l'inclusion, toutes les patientes étaient naïves de chimiothérapie, de radiothérapie et de chirurgie à visée oncologique. Cent trente trois femmes avec une mammographie normale, ou évoquant une pathologie mammaire bénigne (mastopathie fibro-kystique ou calcifications bénignes), ont également été enrôlées. Ces femmes n'avaient aucun antécédent oncologique notable dans les 5 années précédant le recrutement. Finalement, 35 femmes avec un cancer du sein en rémission depuis au moins 6 mois ont été sélectionnées. Les différentes cohortes étaient comparables en termes d'âge (**Tableau 1**).

Avant d'entamer les analyses statistiques, nous avons vérifié que nos échantillons n'étaient pas contaminés par une hémolyse et nous avons procédé à une étape de normalisation des données. Le niveau d'expression moyen des 50 miARN les plus exprimés dans l'ensemble de la cohorte a été choisi comme référence pour la normalisation.

Le profil des miARN circulants a été comparé entre les femmes avec une mammographie normale et celles avec une pathologie mammaire bénigne. Aucun miARN n'était significativement modifié entre les 2 groupes. Ces femmes sont donc devenues notre groupe contrôle. Par rapport aux contrôles, 107 miARN étaient significativement modifiés en cas de cancer du sein localisé et 53 miARN en cas de cancer du sein métastatique.

Un modèle diagnostique, basé sur l'expression de 8 miARN dans une cohorte de *profiling* (41 cancers du sein primitifs, 26 femmes saines, 19 lésions mammaires bénignes), a été dessiné à l'aide d'une méthode statistique appelée *Random Forest* (**Figures 1 et 2**). Ce modèle diagnostique a ensuite été validé dans une seconde cohorte, dite de validation (108 cancers du sein primitifs, 46 femmes saines, 42 lésions mammaires bénignes, 35 cancers du sein en rémission, 31 cancers du sein métastatiques et 30 cancers gynécologiques). Notre test diagnostique s'est avéré performant avec une AUC de 0,85 et 0,81 sur les cohortes de *profiling* et de validation, respectivement. Notre modèle de miARN était également capable de classer les femmes avec un cancer du sein en rémission ou avec un cancer gynécologique dans le groupe contrôle, et il identifiait correctement les patientes avec un cancer du sein métastatique (**Figure 3**).

Contrairement au CA15.3, le modèle diagnostique restait performant pour les stades précoces de la maladie (stades I et II) et, contrairement à la mammographie, la performance du test n'était pas modifiée chez les patientes de moins de 50 ans, avec des seins plus denses (**Figure 4**).

Nous avons recherché une corrélation entre nos 8 miARN et les facteurs histo-pronostiques obtenus sur la biopsie des cancers du sein localisés. Aucune corrélation n'a cependant été identifiée. L'étude ayant débuté en 2011, nous n'avons pas encore le recul suffisant pour explorer une éventuelle corrélation avec la survie sans progression des patientes.

En résumé, à l'aide de 8 miARN circulants, nous avons dessiné un test performant et peu invasif pour le diagnostic précoce du cancer du sein. Contrairement à la mammographie, la performance du test ne semble pas influencée par l'âge. L'intérêt pronostique de notre test n'est pas encore déterminé car la durée du suivi des patientes est insuffisante.

Article : Circulating microRNA-based screening tool for breast cancer.

Pierre Frères*, Stéphane Wenric*, Meriem Boukerroucha, Corinne Fasquelle, Jérôme Thiry, Nicolas Bovy, Ingrid Struman, Pierre Geurts, Joëlle Collignon, Hélène Schroeder, Frédéric Kridelka, Eric Lifrange, Véronique Josa, Vincent Bours*, Claire Josse* et Guy Jerusalem*.

Oncotarget. 2016;7:5416-28.

Circulating microRNA-based screening tool for breast cancer

Pierre Frères^{1,2,*}, Stéphane Wenric^{2,*}, Meriem Boukerroucha², Corinne Fasquelle², Jérôme Thiry², Nicolas Bovy³, Ingrid Struman³, Pierre Geurts⁴, Joëlle Collignon¹, Hélène Schroeder¹, Frédéric Kridelka⁵, Eric Lifrange⁵, Véronique Jossa⁷, Vincent Bours^{2,*}, Claire Josse^{2,*}, Guy Jerusalem^{1,*}

¹University Hospital (CHU), Department of Medical Oncology, Liège, Belgium

²University of Liège, GIGA-Research, Laboratory of Human Genetics, Liège, Belgium

³University of Liège, GIGA-Research, Laboratory of Molecular Angiogenesis, Liège, Belgium

⁴University of Liège, GIGA-Research, Department of EE and CS, Liège, Belgium

⁵University Hospital (CHU), Department of Gynecology, Liège, Belgium

⁶University Hospital (CHU), Department of Senology, Liège, Belgium

⁷Clinique Saint-Vincent (CHC), Department of Pathology, Liège, Belgium

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Guy Jerusalem, e-mail: g.jerusalem@chu.ulg.ac.be

Keywords: breast cancer, circulating microRNAs, biomarkers, minimally invasive screening

Received: June 24, 2015

Accepted: December 05, 2015

Published: December 29, 2015

ABSTRACT

Circulating microRNAs (miRNAs) are increasingly recognized as powerful biomarkers in several pathologies, including breast cancer. Here, their plasmatic levels were measured to be used as an alternative screening procedure to mammography for breast cancer diagnosis.

A plasma miRNA profile was determined by RT-qPCR in a cohort of 378 women. A diagnostic model was designed based on the expression of 8 miRNAs measured first in a profiling cohort composed of 41 primary breast cancers and 45 controls, and further validated in diverse cohorts composed of 108 primary breast cancers, 88 controls, 35 breast cancers in remission, 31 metastatic breast cancers and 30 gynecologic tumors.

A receiver operating characteristic curve derived from the 8-miRNA random forest based diagnostic tool exhibited an area under the curve of 0.81. The accuracy of the diagnostic tool remained unchanged considering age and tumor stage. The miRNA signature correctly identified patients with metastatic breast cancer. The use of the classification model on cohorts of patients with breast cancers in remission and with gynecologic cancers yielded prediction distributions similar to that of the control group.

Using a multivariate supervised learning method and a set of 8 circulating miRNAs, we designed an accurate, minimally invasive screening tool for breast cancer.

INTRODUCTION

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in females worldwide; its rate in Western countries has increased since the 1990s [1]. During the same period, mortality from breast cancer has decreased due to early detection and improved treatments [2].

Currently, mammographic screening, followed by invasive core needle biopsies in cases of suspected malignancy, allows early breast cancer diagnosis.

Mammographic screening is an accessible but unpleasant and inaccurate test; in 1000 screened women, 15 of these women are estimated to have a biopsy because of a suspicious abnormality, and the biopsy is estimated to diagnose breast cancer in 4 of these 15 women [3].

MicroRNAs (miRNAs) are approximately 22-nucleotide long RNAs that inhibit gene expression by binding to target messenger RNAs (mRNAs) [4]. Currently, more than 2000 mature human miRNAs have been identified, and these miRNAs may regulate up to

60% of human protein-coding genes [5]. miRNAs are involved in multiple biological processes including cell proliferation, differentiation and apoptosis [6, 7]. Their expression is modified in various cancer subtypes, where these miRNAs act as tumor suppressors or oncogenes and play a key role in tumorigenesis [8].

All cell types release miRNAs in peripheral blood under both normal and pathological conditions. These circulating miRNAs are wrapped in 40- to 100-nm lipoprotein vesicles called exosomes, which are membrane-enclosed cell fragments [9]. These miRNAs appear to be protected from endogenous RNase activity by exosomes and are therefore particularly stable in plasma [10]. Therefore, circulating miRNAs are promising biomarkers for the early and minimally invasive diagnosis of breast cancer [11]. Several studies have already explored miRNAs from that perspective, leading to mixed results in terms of performances [12–29]. Very different diagnostic signatures have been obtained, most likely due to the choice of the sample preparation, the technology used and the study design, such as choice of proper normalization and careful validation.

In the present study, to propose new tools for breast cancer screening, we constructed a diagnostic test based on 8 circulating miRNAs and confirmed its performance in a large cohort of primary breast cancer patients and controls. The diagnostic test was also validated in patients with breast cancer in remission, patients with metastatic breast cancer and patients with gynecologic cancer to test for breast cancer specificity and follow-up. Moreover, particular attention was given to normalization and bioinformatic analysis procedures.

RESULTS

Patients and controls

Patients with treatment-naive primary breast cancer ($n = 149$, median age = 55 yr, range = 26–87 yr), breast cancer in remission ($n = 35$, median age = 49 yr, range = 28–79 yr, median time follow-up since remission = 33 months), metastatic breast cancer ($n = 31$, median age = 59 yr, range = 35–79 yr) and gynecologic cancer ($n = 30$, median age = 62 yr, range = 38–83 yr) were recruited prospectively at CHU of Liège and Clinic Saint-Vincent (Liège, Belgium) from 7/2011 to 9/2014. Gynecologic tumors consisted of non-metastatic endometrial ($n = 16$), ovarian ($n = 10$) and cervical ($n = 4$) cancers. Controls were obtained from 133 cancer-free females of similar age (median age = 51 yr, range = 40–74 yr) with normal mammograms ($n = 72$), benign calcifications ($n = 30$) or simple cysts ($n = 31$). Controls had no history of cancer in the last 5 years.

In total, 378 patients were included in this study.

All breast cancer patients and tumor characteristics are summarized in Table 1.

Pilot study

A pilot study that consisted of measuring the expression of 742 plasma miRNAs in 18 primary breast cancer patients was first conducted. In total, 188 miRNAs were chosen based on their expression levels (mean quantification cycle (Cq) value < 36) in the pilot experiment. Clinicopathological data for these patients and the list of the 188 selected miRNAs are summarized in Table 1 and Supplementary Table 1, respectively.

Evaluation of hemolysis

We first evaluated the quality of our sample collection and preparation. Hemolysis leads to the contamination of plasma with RNA from red blood cells. Absorbance at 414 nm (ABS_{414}), the maximum absorbance of hemoglobin, correlates with the degree of hemolysis. ABS_{414} was measured for all samples using a NanoDrop. The median ABS_{414} level was 0.19 ± 0.1 , with a hemolysis cut-off value fixed at 0.2. Furthermore, the level of a miRNA highly expressed in red blood cells (miR-451) was compared with the level of a miRNA unaffected by hemolysis (miR-23a), with a ΔCq (miR-23a - miR-451) of more than 5 indicating possible erythrocyte miRNA contamination. The median ΔCq (miR-23a - miR-451) was 2.6 ± 1.5 in our cohort (primary breast cancer group = 3 ± 1.5 , control group = 2.1 ± 1.2 , breast cancer in remission group = 2.5 ± 1.5 , metastatic breast cancer group = 2.8 ± 1.2 , gynecologic cancer group = 2.3 ± 1.8). Based on these results, no patients were discarded.

miRNA deregulation is observed in primary as well as metastatic breast cancer patients

When comparing the miRNA profiles of newly diagnosed primary breast cancers to control miRNA profiles, 112 miRNAs were found to be significantly deregulated, with a final set of 107 miRNAs after adjusting the P -value for multiple testing. miR-16 and let-7d were the most up- and downregulated miRNAs, respectively. Global upregulation of miRNA expression was observed in primary breast cancer patients compared to controls (1.35-fold change).

In a second analysis, miRNA profiles from the plasma of patients with metastatic breast cancer were compared to those of the controls. Eighty-four miRNAs were found to be significantly deregulated, with a final set of 53 miRNAs after adjusting the P -value for multiple testing. The most significantly upregulated miRNA was miR-148a, and the most significantly downregulated miRNA was miR-15b. As observed in primary breast cancer samples, global upregulation of miRNA expression was observed in metastatic breast cancer patients when compared to healthy subjects (1.1-fold change).

Résultats

Table 1: Clinicopathological data and tumor characteristics

Characteristics	Primary breast cancers – pilot study (<i>n</i> = 18)	Primary breast cancers – principal study (<i>n</i> = 149)	Metastatic breast cancers (<i>n</i> = 31)	Breast cancers in remission (<i>n</i> = 35)
Median age (range) (y)	58 (29–70)	55 (26–87)	59 (35–79)	49 (28–79)
Estrogen receptor [<i>n</i> (%)]	12 (67)	117 (79)	28 (90)	22 (63)
Progesterone receptor [<i>n</i> (%)]	11 (61)	109 (73)	22 (71)	18 (51)
HER2 [<i>n</i> (%)]	6 (33)	30 (20)	6 (19)	18 (51)
Ki67 (median ± SD) (%)	21 ± 20	20 ± 24	27 ± 23	37 ± 23
Initial T staging [<i>n</i> (%)]				
NA	0 (0)	1 (< 1)	2 (6)	0 (0)
1	3 (17)	62 (42)	9 (30)	3 (9)
2	10 (55)	58 (39)	12 (19)	19 (54)
3	2 (11)	15 (10)	6 (19)	5 (14)
4	3 (17)	13 (9)	2 (6)	8 (23)
Lymph node involvement [<i>n</i> (%)]	11 (61)	70 (47)	17 (55)	24 (69)
Tumor node metastasis (TNM) stage [<i>n</i> (%)]				
NA	0 (0)	1 (< 1)	0 (0)	0 (0)
1	2 (11)	45 (30)	0 (0)	0 (0)
2	9 (50)	73 (49)	0 (0)	20 (57)
3	7 (39)	31 (21)	0 (0)	15 (43)
4	0 (0)	0 (0)	31 (100)	0 (0)
Scarff-Bloom-Richardson grade [<i>n</i> (%)]				
NA	0 (0)	1 (< 1)	4 (13)	0 (0)
1	0 (0)	7 (5)	4 (13)	0 (0)
2	7 (39)	84 (57)	12 (39)	15 (43)
3	11 (61)	57 (38)	11 (35)	20 (57)
Histologic subtype [<i>n</i> (%)]				
NA	0 (0)	0 (0)	2 (6)	0 (0)
IDC	16 (88)	125 (84)	22 (71)	33 (94)
ILC	1 (6)	19 (13)	7 (23)	2 (6)
Others	1 (6)	5 (3)	0 (0)	0 (0)
Lymphovascular invasion [<i>n</i> (%)]	6 (33)	27 (21)	12 (39)	9 (26)

NA = not assessed; ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor; HER2 = human epidermal growth factor 2; IDC = invasive ductal carcinoma; ILC = invasive lobular carcinoma.

Statistical analyses were also performed to compare both primary and metastatic breast cancer patient plasma

miRNA profiles to controls using the Kruskal-Wallis test. Fifty-six miRNAs were significantly modified in

the same manner among primary and metastatic breast cancer patient profiles. miR-16 and let-7d were the most co-deregulated miRNAs.

The results of the statistical analysis are available in Supplementary Table 1.

Design and validation of a diagnostic miRNA signature-based model

The analysis and computational methods relied on several steps, which made use of the random forest algorithm. The random forest algorithm is a supervised learning method that operates by building a large ensemble of decision trees, where each tree is trained on a bootstrap sample from the training data by randomizing the features that are selected at each tree node [30].

A methodology somewhat similar to the algorithmic solution proposed by Geurts *et al.* [31] was used as shown in Figure 1.

1. Model construction and miRNA signature identification

An initial random forests model was built on the profiling cohort (86 samples = 30% of the whole cohort: 41 individuals with primary breast cancer and 45 controls) with the normalized expression values of all 188 miRNAs as features to determine the 25 more discriminant miRNAs. To identify the best miRNA signature, all combinations of miRNAs that can be defined from these 25 miRNAs (33554431 in total) were then evaluated using ten-fold cross-validation on the same profiling cohort (see Materials and methods).

The best miRNA combination is composed of the following 8 miRNAs: miR-16, let-7d, miR-103, miR-107, miR-148a, let-7i, miR-19b, and miR-22*. Figure 2 summarizes the Mann-Whitney U *P*-values (Figure 2A) and relative expression changes (Figure 2B) for these 8 miRNAs.

An area under the curve (AUC) of 0.85 ± 0.02 was obtained when performing the ten-fold cross-validation in the profiling cohort.

A threshold value of 0.68 was chosen to derive a diagnostic rule from the random forest model. The value of 0.68 corresponded to an acceptable trade-off between high sensitivity (> 0.9) and satisfactory specificity (± 0.5).

2. Model validation

The validation of our model in a larger cohort (196 samples = 70% of the whole cohort: 108 individuals with primary breast cancers and 88 controls) yielded an AUC of 0.81 ± 0.01 . Figure 3A represents the receiver operating characteristic (ROC) curve obtained by testing the model in the validation cohort.

With a threshold value of 0.68, a sensitivity value of 0.91 ± 0.01 and a specificity value of 0.49 ± 0.03 were obtained.

The validation of the classification model in the other cancer groups yielded slightly lower values for sensitivity (0.80 ± 0.05 for metastatic breast cancer patients) and specificity (0.40 ± 0.08 for breast cancer patients in remission and 0.41 ± 0.06 for gynecologic cancer patients) (Figure 3B). As shown in Figure 3B, the patients with breast cancer in remission and gynecologic cancer were classified as the control group.

A comparison between the miRNA signature and the established diagnostic methods

Next, we sought to compare the performance of the miRNA signature to mammographic screenings and CA15.3 assays.

The accuracy of mammographic screening is greatly affected by age. Indeed, young women have dense breasts, making the interpretation of mammography more difficult (AUC = 0.69 ± 0.05 for women under the age of 50 yr) [32]. As shown in Figure 4A, the diagnostic accuracy of the miRNA signature does not appear to be affected by age because the AUC remains stable at 0.81 in patients younger than 50 yr.

CA15.3 is the only biomarker of breast cancer, and its accuracy is directly influenced by tumor stage, with an AUC ranging from 0.56 in stage I to 0.80 in stage III breast cancers [33]. Therefore, CA15.3 is only useful for the diagnosis of late stage and metastatic breast cancers. Interestingly, tumor stage does not seem to affect the signature miRNA performance, remaining stable at 0.81 from stages I to III (Figure 4B).

miRNA signature does not correlate with breast cancer clinicopathological features

The correlations between the expression of the 8 miRNAs and the following breast cancer clinicopathological markers were computed: estrogen and progesterone receptor expression, HER2 overexpression, tumor size, initial lymph node status, Ki67 index, Scarff-Bloom-Richardson grade and lymphovascular invasion. No significant correlation was obtained using Spearman's test for continuous variables, and no significant difference was found using the Mann-Whitney *U* test for binary variables (Supplementary Table 2).

DISCUSSION

Early breast cancer diagnosis is currently possible using mammographic screenings. However, mammographic screening has the following weaknesses: (i) the risk of false positives, with an overdiagnosis rate of up to 19%, exposing women to harmful anti-cancer therapies and affecting their quality of life; (ii) the risk of false negatives, with mammograms missing breast

cancer in 17% of cases and in more than 30% of cases for women with dense breasts and for women under hormone replacement therapy; (iii) X-ray radiation from mammograms may be one of the factors that can actually trigger breast cancer in high-risk women, e.g., young women carrying a mutation in the BRCA genes, who require early follow up beginning at 30 years, an age where mammography is less effective, and (iv) mammography performance is operator dependent (34–36).

Thus, a diagnostic test using a blood sample could add useful information. CA15.3, which is the only available biomarker for breast cancer, lacks sensitivity in the case of primary breast tumors [33].

Based on 8 circulating miRNAs, we designed a classification model using a decision tree-based ensemble method, which allows primary breast cancers to be screened with greater accuracy than mammography. Consequently, our 8 circulating miRNA signature may be

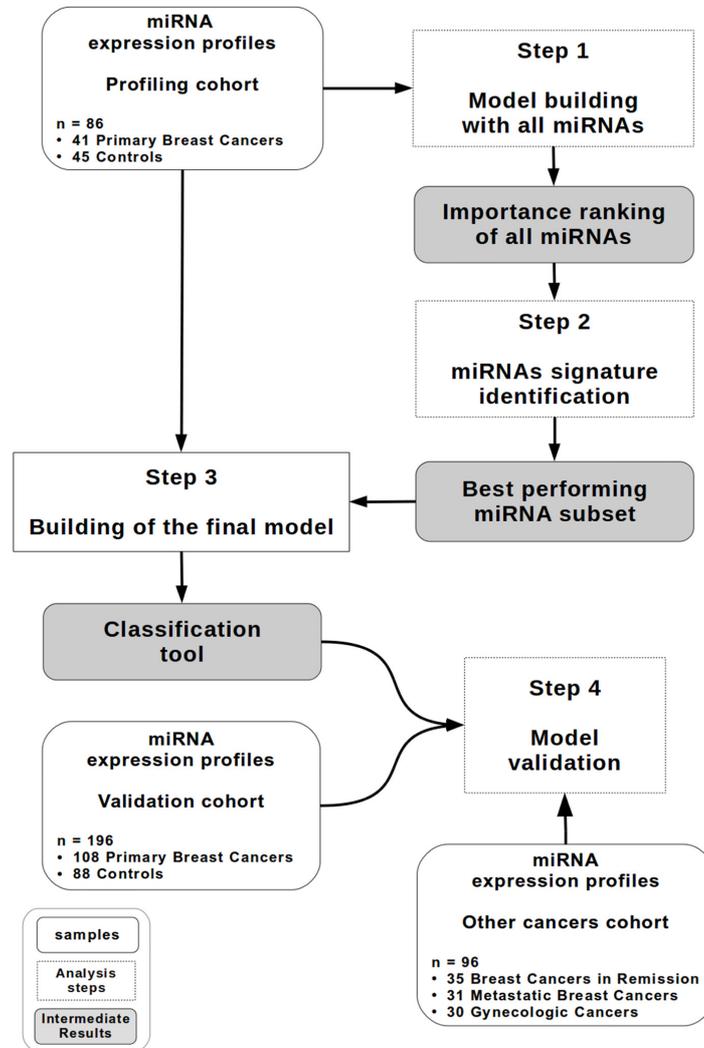


Figure 1: Study design. A diagram describing the random forest-based methodology. The profiling cohort ($n = 86$) contains 41 patients with primary breast cancer and 45 controls. The validation cohort ($n = 196$) contains 108 patients with primary breast cancer and 88 controls. The other cancer cohort ($n = 96$) contains 35 patients with breast cancer in remission, 31 patients with metastatic breast cancer and 30 patients with gynecologic cancer.

Résultats

extremely useful to help clinicians to identify patients with a high probability of breast cancer without using invasive procedures.

The 8 miRNA-based diagnostic model shows the following interesting characteristics for clinical application: (i) this diagnostic test is not affected by age and may be useful for monitoring young women at high risk for breast cancer, in which mammography is not only less effective but also harmful because of irradiation; (ii) unlike CA15.3, this diagnostic model is effective regardless of tumor stage, which allows for detection at an early stage; (iii) this model can detect metastatic breast cancers and shows approximately the same class

prediction distribution for breast cancers in remission and for controls (see Figure 3), offering a potential utility for monitoring patients; (iv) this study is the first to validate the robustness of such a classifier tool with respect to gynecologic cancers. Plasma from patients suffering of other prevalent cancers in women (cervix, endometrial and ovary cancers) [1] were used to check if the diagnostic tool could avoid the detection of other types of cancers. Indeed, the test specificity on gynecologic cancers is similar to the specificity of the control group (see Figure 3).

These aspects were overlooked in previous studies that have shown the potential of circulating miRNAs as diagnostic tools for breast cancer detection [12–29].

A

miRNAs	Controls vs Primary Breast Cancers		Controls vs Metastatic Breast Cancers		Controls vs Gynecological Cancers		Controls vs Breast Cancers in Remission	
	P	Fold change	P	Fold change	P	Fold change	P	Fold change
miR-16	<.0001	1.7	<.05	1.2	>.05	1.5	<.05	1.4
let-7d	<.0001	0.7	<.01	0.8	>.05	0.9	<.001	1.2
miR-103	<.0001	0.8	>.05	1	>.05	1	>.05	1
miR-107	<.0001	0.8	<.001	0.8	>.05	0.9	>.05	1
miR-148a	<.0001	1.4	<.0001	1.6	<.0001	1.9	<.0001	0.5
let-7f	<.001	0.9	<.05	1.1	>.05	1.1	>.05	0.9
miR-19b	<.0001	1.2	>.05	0.9	>.05	1.1	<.0001	0.8
miR-22*	>.05	1	>.05	1.1	<.01	1.5	<.01	1.4

B

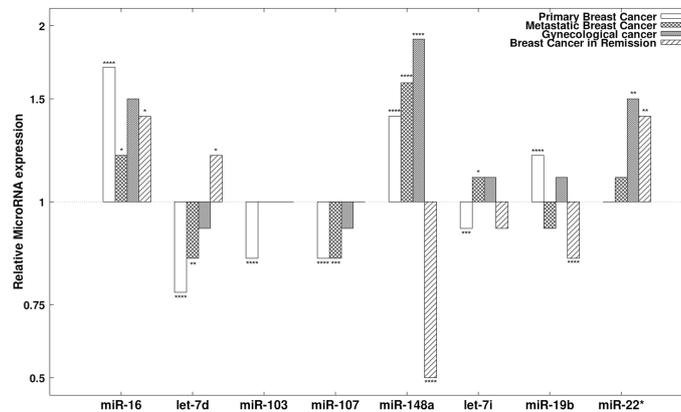


Figure 2: The 8 miRNAs present in the diagnostic signature. (A) The results of statistical analyses comparing the expression of the 8 miRNAs present in the diagnostic signature between different groups. The 8 diagnostic miRNAs were compared between primary breast cancer patients, breast cancer patients in remission, metastatic breast cancer patients, gynecologic cancer patients and the controls. *P*-values and Benjamini-Hochberg adjusted *P*-values were obtained using the Mann-Whitney *U* test. **(B)** The relative expression (mean fold change) of the 8 diagnostic miRNAs in patients with primary breast cancer, patients with breast cancer in remission, patients with metastatic breast cancer and patients with gynecologic cancer compared to controls.

Résultats

The signatures that these studies have defined differed greatly from one study to another. These discrepancies can be explained by the use of different analysis methods, sample processing and normalization procedures. In the present paper, we show that the appropriate use of a subset of miRNAs combined with a specific normalization method and classification algorithm yields satisfactory results in multiple cohorts. Although decision tree ensemble methods have been proven to be efficient for the classification of biological samples based on various biomarkers [31], to our knowledge, few studies, and never in the field of breast cancer, have used random forest models with miRNA expression values as input features.

Two similar studies have nevertheless shown that random forest perform better than other supervised learning methods using miRNA expression values [37, 38].

A second important concern is the normalization choice because the results of the relative quantification obtained by qPCR are entirely dependent on this process. Most of these studies used miR-16 expression alone as a reference gene [20, 25, 28, 29]. However, miR-16, which is predominantly derived from erythrocytes, has been shown to be prone to artificial elevation by hemolysis [18]. The use of blood cell-derived miRNAs as housekeeping RNA for normalization may be more problematic in cases of anemia, a condition often occurring in breast cancer

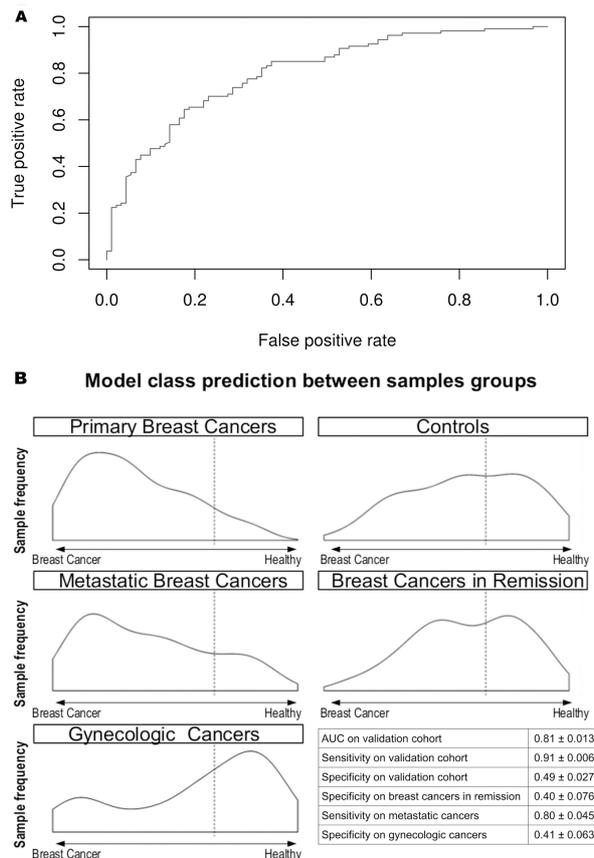


Figure 3: Circulating miRNA-based diagnostic tool performance in the validating cohort. (A) The ROC curve of the diagnostic miRNA model applied to the validating cohort. The AUC obtained is 0.81. **(B)** Model outcome distributions for the primary breast cancers, controls, metastatic breast cancers, breast cancers in remission, and gynecologic cancers. The x-axis corresponds to the model predictions. The dashed line represents the chosen threshold used to compute the sensitivity and specificity values for each cohort. The table reports the AUC, sensitivity and specificity in the validation cohort and the sensitivity and specificity in the other cancer cohort. The true positive count for the metastatic breast cancers is 25. The true negative count for breast cancers in remission and gynecologic cancers is 14.

patients. Meanwhile, global normalization methods have been described to best fit with qPCR analysis [39] but to lead to poor performances in discriminating healthy and cancer patients [17]. In this study, we compared different normalization methods, revealing that the mean of the 50 most expressed plasma miRNAs is more stable than many other normalization methods and allows for good discriminating performances. Interestingly, using this method, our analyses revealed that miR-16 and miR-103, which have been used in other studies as endogenous control genes, are differentially expressed in the plasma from healthy samples and cancer patients [12, 21].

Most of the 8 miRNAs that are part of the diagnostic signature are related to well-described cancer deregulation and were demonstrated to be differentially expressed

in breast cancer tumoral tissues [40–44]. However, circulating miRNAs rarely show correlated levels with their tumoral expression [26]. In consequence, the miRNA composition of the diagnostic signature does not allow any conclusion on their biological functions.

Aside from the 8 miRNAs selected for our signature, several other combinations, most of which were composed of more than 8 miRNAs, yielded comparable performances. This finding can be explained by the fact that several miRNAs are often deregulated in the same manner under certain conditions, thus allowing one miRNA to be replaced by another miRNA in a specific signature. Regarding independent validation, it can be noted that, among these alternative combinations, one in particular was made of 11 miRNAs, which were measured

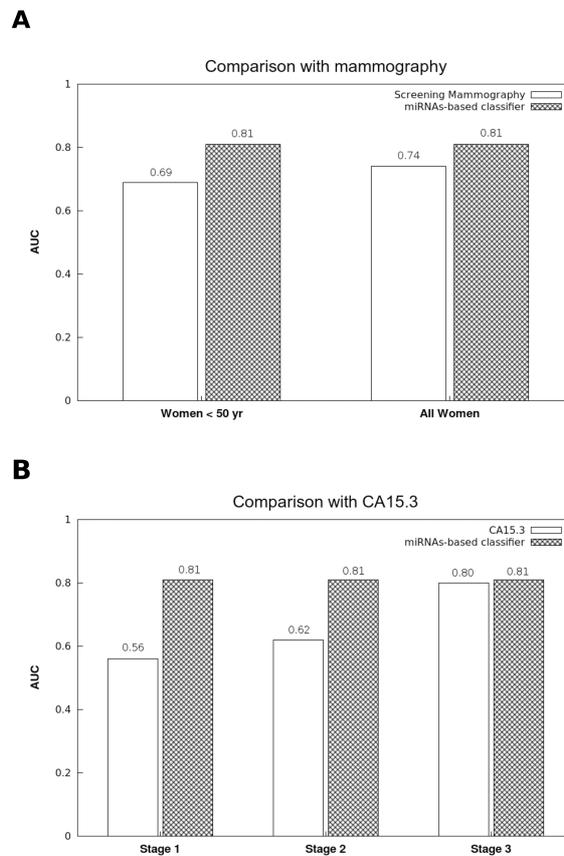


Figure 4: Comparison of the accuracy between the diagnostic miRNA signature, mammographic screenings and CA15.3 assays. (A) While the diagnostic performance of mammographic screenings is weaker in women under 50 yr (32), the AUC of the 8 miRNA-based diagnostic model was stable for women both under and over 50 yr. **(B)** The CA15.3 assay is not useful for the early diagnosis of breast cancer. While the CA15.3 AUC increases proportionally to the tumor stage (33), our model performance was stable regardless of the tumor stage.

in the serum of 54 individuals in another independent study [12]. The performance of a diagnostic model built using this alternative combination has been assessed using both our data (plasma) and the dataset GSE42128 from Chan *et al.* (serum), yielding close results (respective AUCs of 0.80 ± 0.02 and 0.77 ± 0.07 , see Supplementary Table 3). Unfortunately, one of the miRNAs present in our original signature is absent from the data from Chan *et al.*, preventing us from testing the original signature.

Regarding the potential prognostic value of the 8-miRNA signature, the available follow-up of the cohorts is insufficient to determine whether the expression of the miRNAs can be correlated with progression-free or overall survival. Since there is no correlation between the expression of the 8 diagnostic miRNAs and the currently used clinicopathological factors of breast cancer, the prognostic role of the miRNA signature cannot be established on that base.

In conclusion, we established an accurate miRNA-based model for the non-invasive screening of primary breast cancer. This model also allows the identification of metastatic breast cancer and the classification of breast cancer patients in remission in the healthy group and therefore may be useful for monitoring patients. Moreover, the performance of this test is not affected by the age of the patient or by the tumor stage.

MATERIALS AND METHODS

Ethical concerns

Ethical approval was obtained from the Institutional Review Board (Ethical Committee of the Faculty of Medicine of the University of Liège) in compliance with the Declaration of Helsinki. All patients signed a written informed consent form. This work consisted of a prospective study and did not lead to any changes in the treatments of enrolled patients.

Plasma samples

Blood samples were withdrawn in 9 ml EDTA tubes. Plasma was prepared within 1 h by retaining the supernatant after double centrifugation at 4°C (10 min at $815 \times g$ and 10 min at $2500 \times g$) and was stored at -80°C . The absorbance at 414 nm (ABS_{414}) was measured for all samples using a NanoDrop to evaluate the degree of hemolysis.

RNA extraction and miRNA qRT-PCR

The essential MIQE guidelines were followed during specimen preparation [45].

Circulating miRNAs were purified from 100 μl of whole-plasma using a miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions.

The standard protocol was modified based on Kroh's recommendations [46]. MS2 (Roche, Belgium) was added to the samples as a carrier, and cel-miR-39 and cel-miR-238 were added as spike-ins. RNA was eluted in 50 μl of RNase-free water at the end of the procedure.

Reverse transcription was performed using a miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Polyadenylation and cDNA Synthesis Kit (Exiqon, Denmark). Quantitative PCR was performed according to the manufacturer's instructions on custom panels of 188 selected miRNAs (Pick-&-Mix microRNA PCR Panels, Exiqon). Controls included the reference genes described in the text, inter-plate calibrators in triplicate (Sp3) and negative controls.

All PCR reactions were performed using an Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). miRNAs with Cq values < 36 were considered for analysis.

Data analysis

Analyses were conducted using the $2^{-\Delta\text{Cq}}$ method ($\Delta\text{Cq} = \text{Cq}_{\text{sample}} - \text{Cq}_{\text{reference gene}}$) for each sample to obtain a normalized expression value [47].

The data were normalized using the ΔCq method as recommended by Mestdagh *et al.* [39]. The mean Cq of the 50 miRNAs with the highest mean expression as determined in all the patients from all the cohorts was used for normalization because it was the most stable reference gene according to the GeNorm software. The list of the 50 miRNAs and the results of the GeNorm analysis are available in Supplementary Table 4. The whole processes of miRNA signature identification and decision tree building were also conducted on datasets normalized by 12 alternative methods. The best performances were obtained with the normalization by the mean Cq of the 50 most expressed miRNAs. The alternative normalization were: raw data, mean Cq of the 10, 20, 30 or 40 miRNAs with the highest mean expression, the mean Cq of the 50 miRNAs with the highest mean expression minus the four miRNAs that are present in the signature; the mean Cq of the spike-cel-miR-39 and the U6 small RNA; the mean Cq of miR-15b* and miR-125b (the most stable combination according to NormFinder); the global mean Cq; miR-16; the mean Cq of miR-103 and miR-191; and miR-93.

Furthermore, the delta Cq (miR-23a - miR-451) was determined for each sample to evaluate the risk of hemolysis as recommended by Blondal *et al.* [48].

Finally, data homogeneity was tested to detect outliers. Patients presenting extreme values (mean ± 3 sigma) were discarded. This operation led to the elimination of one patient from the analysis.

Statistical analyses were performed with *R version 3.0.1* (R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0,

URL: <http://www.R-project.org/>). To compare miRNA expression levels, two-sided Mann-Whitney *U* tests and Kruskal-Wallis one-way tests were used. To correlate the expression of the 8 diagnostic miRNAs and the clinicopathological markers in primary breast cancer patients, Spearman's tests were used for continuous variables. Statistical significance was established as $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ or $****P < 0.0001$. All represented values were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure [49]. The results of the statistical analyses for selected miRNAs are summarized in Supplementary Tables 1 and 2.

Study design

For all steps of the method, an *R* implementation of Breiman's original random forest algorithm, which was provided in the *R* package *randomForest*, was used [50]. A methodology somewhat similar to the algorithmic solution proposed by Geurts *et al.* was used [31] as shown in Figure 1. The different steps are described in detail below.

1. Model building with all miRNAs

An initial random forests model was built on the profiling cohort (86 samples: 41 individuals with primary breast cancer and 45 controls) with the normalized expression values of all 188 miRNAs as features. A conservative value of 3000 for n_{tree} (number of trees in the random forest) was chosen for all steps of the construction of random forest models using our methodology. Because no significant performance change was observed for incremental values of m_{try} (number of variables randomly sampled as candidates at each split), a default value of $m_{try} = \sqrt{\text{number of miRNAs}}$ was chosen for all steps of the construction of random forest models using our methodology. A combined ranking for all 188 miRNAs based on the model importance metrics MDA (Mean Decrease in Accuracy) and MDG (Mean Decrease in Gini) was obtained through the construction of this first model.

2. miRNA signature identification

Variable selection in classification or regression methods constitutes a classical problem related to 2 distinct objectives: (i) Finding relevant variables linked to the classifier output, for interpretation purposes (in this case, finding an ensemble of miRNAs related to breast cancer), (ii) Finding a sufficiently small number of variables as to avoid over-fitting, improve model performance, and provide more cost-effective models (both in terms of computation and implementation) [51, 52]. These 2 objectives may often be contradictory, since the first one will be directed to highlighting all important variables, even if these variables are redundant, while the second one aims to limit the number of variables in the final model. We are aiming for the second objective. One variable selection method for random forests, specifically

targeting the second objective, is iterative variable elimination [38, 53], where variables with the smallest importance metric are iteratively discarded until reaching a minimum out-of-bag (OOB) error. Based on the definition of MDA provided earlier and the *R* implementation of the random forests algorithm, this feature selection method is roughly equivalent to the iterative elimination of variables with the lowest MDA metric. Another variable selection methodology works the other way round, by iteratively adding variables in candidate models, based on their importance metric, computed on a previous complete model, and stopping the addition of variables when the model accuracy reaches a maximum [31, 54]. Here, we use a more exhaustive wrapper approach, where a large subset of *m* variables is first selected based on the two variable importance metrics (the OOB-related importance metric MDA, but also the Gini coefficient related importance metric MDG) provided by the *R* implementation of the random forests algorithm, and secondly all *c* possible combinations of 1 to *m* variables from this subset are considered as possible features of a potential classifier, where $c = 2^m - 1$ combinations. This approach thus differs in the fact that it constitutes an exhaustive method, which will test a very large number of combinations. Each of these potential classifiers is cross-validated (with ten folds) to determine the variables combination (also called "signature") yielding the best performing model (where model performance is measured by the AUC). Since the goal of this study is the design of a usable and affordable diagnostic tool, a limited value of $m = 25$ has been chosen (leading to $c = 33554431$). This number corresponds to threshold values of 0.001 and 1 respectively for variable importance metrics MDA and MDG. This limited value of $m = 25$ constitutes a trade-off between an exhaustive testing of the solution space and the time and computational limitations related to a diagnostic test.

3. Building the final model

A random forest model was built on the profiling cohort using the best performing miRNA subset. This classification tool constituted the final diagnostic model. The number of trees chosen to build each model was determined as in step 1, and a default value of $m_{try} = \sqrt{\text{number of miRNAs in the combination}}$ was chosen (i.e. $m_{try} = 3$).

The prediction of the random forest algorithm for a sample is a numerical value representing the probability for this sample to be part of a specific class (case or control). To derive a binary diagnostic rule from this numerical score, a specific threshold was picked to separate the 2 classes, and the specificity and sensitivity values of the corresponding rule were computed.

4. Model validation

Then, the classification tool was validated in a larger cohort with similar cases – controls ratio as in the profiling

cohort. The total number of samples was 2.3 times greater than profiling cohort (196 samples: 108 individuals with primary breast cancers and 88 controls).

An AUC was obtained through this validation. Sensitivity and specificity values were computed using the threshold defined using the profiling cohort.

The classification tool was also validated in a separate cohort consisting of 35 individuals with breast cancer in remission, 31 patients with metastatic breast cancer and 30 patients with gynecologic cancers.

List of abbreviations

3'-UTR = 3'-untranslated region
 ABS₄₁₄ = absorbance at 414 nm
 AUC = area under the curve
 Cq = quantification cycle
 DNA = deoxyribonucleic acid
 gDNA = genomic DNA
 HER2 = human epidermal growth factor 2
 LNA = locked nucleic acid
 MDA = mean decrease accuracy
 MDG = mean decrease Gini
 miRNAs = microRNAs
 mRNAs = messenger RNAs
 NA = not assessed
 Ns = non-significant
 OOB = out-of-bag
 RNA = ribonucleic acid
 ROC = receiver operating characteristic

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Olivier Dengis, Tiberio Sticca, Sonia El Guendi, Bouchra Boujemla, the GIGA-imagery-platform, the GIGA-immunohistology-platform, the team of medical oncologists and the Biothèque of CHU Liège.

GRANT SUPPORT

PF is a F.R.S.-FNRS PhD fellow. SW is a P.D.R.-FNRS PhD fellow. This work was supported by the French Community of Belgium, the Belgian Funds for Scientific Research (F.R.S.-FNRS), the F.R.S.-FNRS-Televie, CHU Liège (F.I.R.S) and the Region Wallone (Secance, BRAMIR).

CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Jemal A, Bray F, Center, Melissa M., Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61:69–90.
- Bleyer A, Welch HG. Effect of Three Decades of Screening Mammography on Breast-Cancer Incidence. *N Engl J Med.* 2012; 367:1998–2005.
- Kohn L, Mambourg F, Robays J, Albertijn M, Janssens J, Hoefnagels K, Ronsmans M, Jonckheer P. Informed choice on breast cancer screening: messages to support informed decision. *Good Clinical Practice (GCP) Brussels: Belgian Health Care Knowledge Centre (KCE).* 2014. KCE Reports 216. D/2014/10.273/03.
- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell.* 2008; 132:9–14.
- Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009; 19:92–105.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116:281–97.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004; 431:350–5.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005; 435:834–838.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics.* 2010; 73:1907–20.
- Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Science.* 2010; 101:2087–92.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:10513–8.
- Chan M, Liaw CS, Ji SM, Tan HH, Wong CY, Thihe AA, Tan PH, Ho GH, Lee AS-G. Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:4477–87.
- Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A, Arlt D, Rath M, Sohn C, Benner A, Junkermann H, Schneeweiss A, Burwinkel B. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer.* 2013; 132:1602–12.
- Guo L, Zhao Y, Yang S, Cai M, Wu Q, Chen F. Genome-wide screen for aberrantly expressed miRNAs reveals miRNA profile signature in breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2013; 40:2175–86.
- Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 Differentiates Breast Cancer from Other Malignancies and Is a Potential Biomarker for Detecting Noninvasive and Early Stage Disease. *The Oncologist.* 2010; 15:673–82.

16. Hu Z, Dong J, Wang L-E, Ma H, Liu J, Zhao Y, Tang J, Chen X, Dai J, Wei Q, Zhang C, Shen H. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*. 2012; 33:828–34.
17. Kodahl AR, Lyng MB, Binder H, Cold S, Gravgard K, Knoop AS, Ditzel HJ. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER- positive early-stage breast cancer: A case control study. *Mol Oncol*. 2014; 8:874–83.
18. Leidner RS, Li L, Thompson CL. Dampening enthusiasm for circulating microRNA in breast cancer. *PLoS One*. 2013; 8:e57841.
19. Ng EKO, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CPH, Ma ESK, Pang R, Chua D, Chu KM, Law WL, Law SYK, Poon RTP, Kwang A. Circulating microRNAs as Specific Biomarkers for Breast Cancer Detection. *PLoS One*. 2013; 8:e53141.
20. Roth C, Rack B, Müller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010; 12:R90.
21. Shen J, Hu Q, Schrauder M, Yan L, Wang D, Medico L, Guo Y, Yao S, Zhu Q, Liu B, Qin M, Beckmann MW, Fasching PA, et al. Circulating miR-148b and miR-133a as biomarkers for breast cancer detection. *Oncotarget*. 2014; 5:5284. doi:10.18632/oncotarget.2014.
22. Wang F, Zheng Z, Guo J, Ding X. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecologic Oncology*. 2010; 119:586–93.
23. Wu Q, Wang C, Lu Z, Guo L, Ge Q. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection. *Clinica Chimica Acta*. 2012; 413:1058–65.
24. Zearo S, Kim E, Zhu Y, Zhao JT, Sidhu SB, Robinson BG, Soon PSH. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer*. 2014; 14:200.
25. Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS One*. 2010; 5:e13735.
26. Zhu J, Zheng Z, Wang J, Sun J, Wang P, Cheng X, Fu L, Zhang L, Wang Z, Li Z. Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum. *Front Genet*. 2014; 5:149.
27. Stückrath I, Rack B, Janni W, Jäger B, Pantel K, Schwarzenbach H. Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. *Oncotarget*. 2015; 6:13387. doi:10.18632/oncotarget.3874.
28. Schrauder MG, Strick R, Schulz-Wendtland R. Circulating micro-RNAs as potential blood-based markers for early stage breast cancer detection. *PLoS One*. 2012; 7:e29770.
29. Cookson VJ, Bentley MA, Hogan BV, Horgan K, Hayward BE, Hazelwood LD, Hughes TA. Circulating microRNA profiles reflect the presence of breast tumours but not the profiles of microRNAs within the tumours. *Cell Oncol*. 2012; 35:301–8.
30. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning*. 2001; 45: 5–32.
31. Geurts P, Fillet M, de Seny D, Meuwis M-A, Malaise M, Merville M-P, Wehenkel L. Proteomic mass spectra classification using decision tree based ensemble methods. *Bioinformatics*. 2005; 21:3138–45.
32. Pisano ED, Gatsonis C, Ph D, Hendrick E, Yaffe M, Baum JK, Acharyya S, Conant EF, Fajardo LL, Bassett L, Orsi CD, Jong R, Rebner M. Diagnostic Performance of Digital versus Film Mammography for Breast-Cancer Screening. *N Engl J Med*. 2005; 353:1773–83.
33. Gion M, Mione R, Leon AE, Lüftner D, Molina R, Possinger K, Robertson JF. CA27.29: a valuable marker for breast cancer management. A confirmatory multicentric study on 603 cases. *Eur J Cancer*. 2001; 37:355–363.
34. Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, Dewar JA, Thompson SG, Wilcox M. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. *British Journal of Cancer*. 2013; 108:2205–40.
35. Yankaskas BC, Taplin SH, Ichikawa L, Geller BM, Rosenberg RD, Carney PA, Kerlikowske K, Ballard-Barbash R, Cutter GR, Barlow WE. Association between mammography timing and measures of screening performance in the United States. *Radiology*. 2005; 234:363–73.
36. Théberge I, Chang S-L, Vandal N, Daigle J-M, Guertin M-H, Pelletier E, Brisson J. Radiologist interpretive volume and breast cancer screening accuracy in a Canadian organized screening program. *J Natl Cancer Inst*. 2014; 106:djt461.
37. Cheng L, Doecke JD, Sharples RA, Villemagne VL, Fowler CJ, Rembacha, Martins RN, Rowe CC, Macaulay SL, Masters CL, Hill AF. Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. *Mol Psychiatry*. 2014:1–9.
38. Hemphill E, Lindsay J, Lee C, Mândoiu II. Feature selection and classifier performance on diverse bio-logical datasets. *BMC Bioinformatics*. 2014; 15:S4.
39. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*. 2009; 10:R64.
40. Janaki Ramaiah M, Lavanya A, Honarpisheh M, Zarea M, Bhadra U, Bhadra MP. MiR-15/16 complex targets p70S6 kinase 1 and controls cell proliferation in MDA- MB-231 breast cancer cells. *Gene*. 2014; 552:255–64.
41. Büssing I, Slack FJ, Großhans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 2008; 14:400–9.

42. Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, Enzo E, Guzzardo V, Rondina M, Spruce T, Parenti AR, Daidone MG, Bicciato S, et al. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*. 2010; 141: 1195–207.
43. Olive V, Sabio E, Bennett MJ, De Jong CS, Biton A, McGann JC, Greaney SK, Sodik NM, Zhou AY, Balakrishnan A, Foth M, Luftig MA, Goga A, et al. A component of the mir-17–92 polycistronic oncomir promotes oncogene-dependent apoptosis. *Elife*. 2013; 2:e00822.
44. Tao S, He H, Chen Q, Yue W. GPER mediated estradiol reduces miR-148a to promote HLA-G expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 451:74–8.
45. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55:611–22.
46. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. 2010; 50:298–301.
47. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 2008; 3: 1101–8.
48. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Wrang Teilm M, Dahlsveen IK. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*. 2013; 59:S1–6.
49. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B*. 1995; 57:289–300.
50. Liaw A, Wiener M. Classification and regression by randomForest. *R news*. 2002; 2:18–22.
51. Genuer R, Poggi J-M, Tuleau-Malot C. Variable selection using random forests. *Pattern Recognition Letters*. 2010; 31:2225–36.
52. Saeys Y, Inza I, Larrañaga P. A review of feature selection techniques in bioinformatics. *Bioinformatics*. 2007; 23:2507–17.
53. Diaz-Uriarte R, de Andrés SA. Gene selection and classification of microarray data using random forest. *BMC Bioinformatics*. 2006; 7:3.
54. Ghattas B, Ben Ishak A. Sélection de variables pour la classification binaire en grande dimension: comparaisons et application aux données de biopuces. *Journal de la société française de statistiques*. 2008; 149:43–66.

2. Induction du miR-34a et du miR-122 par la chimiothérapie néoadjuvante dans le cancer du sein

Parmi nos patientes avec un cancer du sein localisé, nous en avons retenu 25 qui ont bénéficié d'une NAC. Pour toutes les patientes, la NAC débutait par une combinaison à base d'anthracyclines, suivie d'une chimiothérapie à base de taxanes.

Les 188 miARN circulants, sélectionnés dans la première partie du projet, ont été étudiés avant et à la fin de la NAC. Une modification significative de 25 miARN a été mise en évidence au terme de la NAC. Parmi ces 25 miARN, le miR-34a et le miR-122 présentaient l'élévation la plus importante (**Figure 1**).

Le miR-34a et le miR-122 ont ensuite été mesurés sur le tissu tumoral de 7 patientes avec une pPR à la NAC, avant et après la chimiothérapie. Une augmentation significative du miR-34a tumoral a été confirmée après la NAC, sauf chez une patiente, avec une mauvaise réponse à la chimiothérapie (ypT2N2), et qui a ensuite présenté une rechute métastatique précoce. Le miR-122 était faiblement exprimé dans le tissu tumoral et aucune variation significative n'a pu être confirmée après la NAC. Aucune corrélation entre les niveaux plasmatiques et tumoraux des 2 miARN n'a été retrouvée (**Figure 2**).

L'élévation du miR-34a était nettement plus importante chez les patientes avec un cancer du sein agressif (HER2+ ou TNBC) avec une pPR après le traitement néoadjuvant. Dans ce groupe de cancers du sein, l'élévation du miR-34a permettait d'ailleurs de distinguer les pCR des pPR avec une excellente performance (AUC = 0,97) (**Figure 3**).

Un suivi longitudinal du miR-34a et du miR-122 circulants a été réalisé chez les 25 patientes. Les 2 miARN ont été mesurés à 4 moments : avant la NAC, après 1 ou 2 cycles d'anthracyclines, à la fin de la NAC et 3 mois après la chirurgie mammaire. Une importante augmentation des 2 miARN a été retrouvée directement après les anthracyclines, particulièrement pour le miR-34a. Par rapport à la valeur initiale chez les patientes, le niveau du miR-34a et du miR-122 restait élevé après la chirurgie. Cependant, par rapport à 20 femmes saines d'âge similaire, les 2 miARN étaient diminués avant la NAC et étaient normalisés à la fin des traitements (**Figure 4**).

Résultats

Le miR-34a est connu pour participer à l'altération de la fonction cardiaque liée au vieillissement ou à un infarctus du myocarde (Boon et al., 2013). Les troponines, des marqueurs de nécrose cardiaque, ont été mesurées dans nos échantillons, avant et après la NAC. Une corrélation positive a pu être établie entre l'élévation du miR-34a et des troponines, suggérant une implication de ce miARN dans la toxicité cardiaque induite par les anthracyclines (**Figure 5**).

Finalement, nous avons montré que le miR-34a augmentait dans des proportions moins importantes après une chimiothérapie adjuvante plutôt que néoadjuvante, et que la chirurgie seule ne modifiait pas son niveau d'expression. Le miR-122 n'était modifié ni par la chimiothérapie adjuvante, ni par la chirurgie. Ces résultats ont confirmé que l'importance de l'élévation des 2 miARN sous l'effet de la chimiothérapie était dépendante de la présence de la tumeur (**Figure 6**).

En conclusion, cette recherche a montré que la NAC modifiait fortement l'expression du miR-34a plasmatique et tumoral. L'amplitude de l'élévation du miR-34a circulant pourrait ainsi nous aider à identifier les mauvais répondeurs à la chimiothérapie. De plus, les variations du miR-34a pourraient aussi être liées à un effet toxique de la chimiothérapie sur le cœur.

Article : Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients induce miR-34a and miR-122 expression.

Pierre Frères, Claire Josse, Nicolas Bovy, Meriem Boukerroucha, Ingrid Struman, Vincent Bours et Guy Jerusalem.

Journal of Cellular Physiology. 2014;230:573-81.

Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Induces miR-34a and miR-122 Expression

PIERRE FRÈRES,¹ CLAIRE JOSSE,¹ NICOLAS BOVY,² MERIEM BOUKERROUCHA,³
INGRID STRUMAN,² VINCENT BOURS,³ AND GUY JERUSALEM^{1*}

¹University of Liège, Laboratory of Medical Oncology, Liège, Belgium

²University of Liège, GIGA-Research, Molecular Angiogenesis Laboratory, Liège, Belgium

³University of Liège, GIGA-Research, Human Genetics, Liège, Belgium

Circulating microRNAs (miRNAs) have been extensively studied in cancer as biomarkers but little is known regarding the influence of anti-cancer drugs on their expression levels. In this article, we describe the modifications of circulating miRNAs profile after neoadjuvant chemotherapy (NAC) for breast cancer. The expression of 188 circulating miRNAs was assessed in the plasma of 25 patients before and after NAC by RT-qPCR. Two miRNAs, miR-34a and miR-122, that were significantly increased after NAC, were measured in tumor tissue before and after chemotherapy in 7 patients with pathological partial response (pPR) to NAC. These two chemotherapy-induced miRNAs were further studied in the plasma of 22 patients with adjuvant chemotherapy (AC) as well as in 12 patients who did not receive any chemotherapy. Twenty-five plasma miRNAs were modified by NAC. Among these miRNAs, miR-34a and miR-122 were highly upregulated, notably in pPR patients with aggressive breast cancer. Furthermore, miR-34a level was elevated in the remaining tumor tissue after NAC treatment. Studying the kinetics of circulating miR-34a and miR-122 expression during NAC revealed that their levels were especially increased after anthracycline-based chemotherapy. Comparisons of the plasma miRNA profiles after NAC and AC suggested that chemotherapy-induced miRNAs originated from both tumoral and non-tumoral compartments. This study is the first to demonstrate that NAC specifically induces miRNA expression in plasma and tumor tissue, which might be involved in the anti-tumor effects of chemotherapy in breast cancer patients.

J. Cell. Physiol. 230: 473–481, 2015. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer worldwide, with 1.38 million new cases recorded in 2008, and it is the leading cause of cancer death in females (Jemal et al., 2011). However, breast cancer death rates have decreased in the past 25 years due to early detection and improved treatments (Bleyer and Welch, 2012).

MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs that act as negative regulators of gene expression by binding to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of target messenger RNAs (mRNAs) (Bartel, 2004; Du, 2005; Eulalio et al., 2008). miRNAs play important roles in cellular processes such as differentiation, proliferation, stress-response and cell death (Ambros, 2004; Bartel, 2004). To date, thousands of human miRNAs have been identified (Kozomara and Griffiths-Jones, 2010), and bioinformatics analyses have estimated that miRNAs may regulate as many as 60% of the human protein-coding genes (Friedman et al., 2009).

Several studies have revealed that miRNAs are deregulated inside tumor tissues, including breast cancer (Lu et al., 2005; Blenkiron et al., 2007). Notably, Lu et al. (2005) analyzed miRNA expression from multiple human cancers and observed differential expression of nearly all miRNAs across tumor types. Moreover, miRNA expression reflects the developmental lineage and differentiation of a specific tumor and is associated with its clinico-pathological features. These findings have strongly suggested that miRNAs play an important role in tumorigenesis.

In the past decade, miRNAs have been demonstrated to be present in the peripheral bloodstream. These circulating miRNAs are protected from degradation by lipoprotein vesicles, called exosomes, and their presence remains highly stable compared with other RNA molecules (Chen et al., 2008; Mathivanan et al., 2010). Tumor cells are assumed to actively secrete specific circulating miRNAs (Pigati et al., 2010) that are

Abbreviations: 3'-UTR, 3'-untranslated region; AC, adjuvant chemotherapy; AJCC-UICC, American Joint Committee on Cancer and the International Union for Cancer Control; AUC, area under the curve; Ct, cycle threshold; DNA, deoxyribonucleic acid; FDR, false discovery rate; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; gDNA, genomic DNA; HER2, human epidermal growth factor 2; miRNAs, microRNAs; mRNAs, messenger RNAs; NA, not accessed; NAC, neoadjuvant chemotherapy; Ns, nonsignificant; pCR, pathological complete response; pPR, pathological partial response; RNA, ribonucleic acid; ROC, receiver operating curve; SEM, standard error of the mean; TNBC, triple-negative breast cancer.

Conflict of interest: None.

PF performed the molecular genetic studies, participated in the design of the study and statistical analyses, and drafted the manuscript. CJ participated in the design of the study and the writing of the manuscript. MB and NB performed certain molecular studies. IS, VB and GJ conceived the study, participated in its design

and coordination and helped draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

PF, MB and NB are Research Fellows from the FNRS. This work was supported by FIRS-CHU, FRS-FNRS, FRS-FNRS-Televie, Centre anti-cancéreux près l'Université de Liège ASBL, Fondation belge contre le cancer, Région wallonne, Leon Fredericq Foundation and the Fonds spéciaux pour la recherche from University of Liège.

*Corresponding to: Guy Jerusalem, University of Liège, Department of Medical Oncology, Domaine Universitaire du Sart Tilman B35, 4000 Liège. E-mail: g.jerusalem@chu.ulg.ac.be

Manuscript Received: 3 April 2014

Manuscript Accepted: 25 July 2014

Accepted manuscript online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com): 30 July 2014.

DOI: 10.1002/jcp.24730

therefore easily accessible and can be used as diagnostic markers for multiple cancers (Mitchell et al., 2008; Kosaka et al., 2010). miRNAs appear to also be passively released by dying cells (Brase et al., 2010), and as a result, circulating miRNA profiling may potentially reflect response to anti-cancer treatments.

Adjuvant chemotherapy (AC) for breast cancer is administered after definitive breast surgery to reduce the risk of cancer recurrence. On the other hand, preoperative or neoadjuvant chemotherapy (NAC) is planned for patients with locally advanced breast cancer or with tumors primarily not suitable for breast-conserving surgery. One of the aims of NAC is to reduce disease burden and render cancers operable. Typically, NAC consists of anthracycline-based chemotherapy followed by tubulin-binding agents. The tumor is then removed, and the response to NAC is assessed by the amount of tumor cells in the surgical specimen. A pathological complete response (pCR) is crucial because it is associated with a better outcome than residual disease (Mieog et al., 2006).

Two studies have already implicated circulating miRNAs as predictive markers of the pathological response to NAC in breast cancer patients (Zhao et al., 2009; Wu et al., 2011). The aim of this work was to examine circulating miRNA profiles during NAC because this condition is the only opportunity to observe the *in vivo* exposition of treatment-naïve tumor cells to the chemotherapy.

In the present study, we demonstrated for the first time that NAC increased circulating miR-34a and miR-122 levels. Comparisons of the plasma miRNA content after different chemotherapies and in the presence/absence of a tumor suggested that miR-34a originated from both tumoral and non-tumoral compartments, but miR-122 only originated from non-tumoral tissues. We also showed that increased miR-34a and miR-122 expression was greater after anthracycline treatments. Whether these miRNAs are markers and/or players in NAC remains to be elucidated.

Materials and Methods

Patients, controls, plasma and tissues collection

Ethics approval was obtained from the Institutional Review Board (Ethical Committee of the Faculty of Medicine of the University of Liège) in compliance with the Declaration of Helsinki. Patients with newly diagnosed primary breast cancer were recruited prospectively at CHU of Liège (Liège, Belgium) from 7/2011 to 7/2013. All patients signed a written informed consent form. This work consisted of a prospective study and did not lead to any changes in the treatment of enrolled patients; 59 patients were included in this study. Control plasma samples were obtained from 20 healthy female volunteers of a similar mean age (51 ± 10 years) and without a history of cancer. Blood samples were collected into 9-ml EDTA tubes. Plasma was prepared within 1 h by retaining the supernatant after double centrifugation at 4 °C (10 min at 815 g and 10 min at 2500 g) and stored undefined at -80°C .

Twenty-five patients with primary locally advanced breast cancer received NAC with 3 or 4 courses of alkylating agents (cyclophosphamide or fluorouracil) and anthracycline-based chemotherapy (epirubicin) followed by 3 or 12 courses of tubulin-binding agents (docetaxel or paclitaxel). Only patients achieving a pCR (ypT0N0 following the AJCC-UICC classification) were considered responders. Blood samples were drawn from NAC-treated patients according to the time course described in Figure 4A.

For 7 NAC-treated patients, 4- μm tumor slices from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues samples were obtained from diagnostic core-needle biopsies (2 to 3 passes in the primary tumor) and from the corresponding tumorectomy. The histological status of all tissues samples was established by a pathologist using hematoxylin and eosin staining from the FFPE sections.

Approximately 15 days after the initial surgery, 22 primary breast cancer patients were treated with AC containing 3 or 4 courses of alkylating agents (cyclophosphamide or fluorouracil) and anthracycline-based chemotherapy (epirubicin) followed by 3 or 12 courses of tubulin-binding agents (docetaxel or paclitaxel). For these patients, blood samples were collected as shown in Figure 6A.

Twelve primary breast cancer patients did not receive any chemotherapy, and their plasma was collected 8 days before (D-8) and 3 months after (3M) surgery.

Patients who would benefit from breast preservation received post-operative radiotherapy. Endocrine therapy (tamoxifen, goserelin, anastrozole, or letrozole) was administered to hormone receptor-positive patients, and anti-HER2 therapy (trastuzumab, lapatinib, or pertuzumab) was administered to patients with HER2 overexpression.

All patients and tumor characteristics are summarized in Table 1.

Study design

Figures 4A and 6A summarize the plasma withdrawal time points in each patient group.

A pilot study was first conducted and consisted of measuring the expression of 742 plasma miRNAs in 18 patients before and after treatment (12 with NAC, 3 with AC, and 3 without chemotherapy). On the basis of their high expression levels in the pilot experiment, 188 miRNAs were chosen (data not shown).

The first study (*study 1*) consisted of measuring 188 miRNA levels in plasma in 13 additional patients with NAC at NA1 and D-8. Altogether, 188 miRNA profiles were obtained for 25 NAC-treated patients before and after treatment. The mean cycle threshold (Ct) of the 50 most highly expressed miRNAs was used for normalization. The lists of miRNAs and sequences used in *study 1* are provided in the supplementary data (Additional file 1).

In a second study (*study 2*), the levels of 2 miRNAs were measured in the blood of 25 patients with NAC at NA1, NA2, D-8 and 3M, 22 patients with AC at D-8 and 3M, 12 patients without chemotherapy at D-8 and 3M. miR-34a and miR-122 were selected because of their significant deregulation by NAC, as established in *study 1*. The mean Ct of the two most stable miRNAs across NAC-treated patients (miR-484 and miR-652) was used as reference gene in addition to the cel-miR-39 spike-in.

The levels of tumor miR-34a and miR-122 were measured in the initial core-needle biopsies and corresponding tumorectomy for 7 patients with a pathological partial response (pPR) to NAC. The relative expression levels of tumor miR-34a and miR-122 were obtained by normalizing to the mean Ct of cel-miR-39 spike-in, cel-miR-238 spike-in, RNU44 snoRNA, and RNU48 snoRNA.

Confirmation of plasma miR-34a variations was assessed by a second RT-qPCR technique on the same plasma from 17 NAC-treated patients at NA1 and D-8. The relative expression levels of plasma miR-34a were normalized to the mean Ct of cel-miR-39 spike-in and cel-miR-238 spike-in.

RNA extraction and qRT-PCR of miRNAs

Circulating miRNAs were purified from 100 μl of plasma with the miRNeasy mini kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. The standard protocol was adapted on the basis of Kroh's recommendations (Kroh et al., 2010). MS2 (Roche, Belgium) was added to the samples as a carrier, cel-miR-39 and cel-miR-238 were added as spike-ins. RNA was eluted in 50 μl of RNase-free water at the end of the procedure.

Reverse transcription was performed using the miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR, polyadenylation and cDNA synthesis kit (Exiqon, Denmark). Quantitative PCR was performed according to the manufacturer's instructions on custom panels of 188 selected miRNAs in *study 1* and on two selected miRNAs in *study 2* (Pick-&-Mix microRNA PCR Panels, Exiqon). Controls

TABLE I. Patients and tumors characteristics.

Characteristics	Primary breast cancer patients with NAC (n = 25)	Primary breast cancer patients with AC (n = 22)	Primary breast cancer patients without chemotherapy (n = 12)
Age (mean ± SD) (y)	47 ± 14	52 ± 11	67 ± 9
Estrogen receptor [n (%)]	14 (56)	19 (86)	12 (100)
Progesterone receptor [n (%)]	12 (48)	14 (64)	11 (92)
HER2 [n (%)]	9 (36)	7 (32)	1 (8)
KI-67 (mean ± SD) (%)	36 ± 19	28 ± 19	9 ± 8
Molecular subtype [n (%)]			
NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Luminal A	1 (4)	3 (14)	9 (75)
Luminal B	14 (56)	16 (72)	3 (25)
HER2-enriched	3 (12)	0 (0)	0 (0)
ER-negative	8 (32)	3 (14)	0 (0)
Initial T staging [n (%)]			
NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1	1 (4)	12 (55)	11 (92)
2	14 (56)	8 (36)	1 (8)
3	2 (8)	2 (9)	0 (0)
4	8 (32)	0 (0)	0 (0)
Size (mean ± SD) (mm)	48 ± 27	23 ± 15	13 ± 6
Posttreatment ypT staging [n (%)]			
NA	0 (0)	22 (100)	12 (100)
0	9 (36)	0 (0)	0 (0)
1	7 (28)	0 (0)	0 (0)
2	8 (32)	0 (0)	0 (0)
3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4	1 (4)	0 (0)	0 (0)
Initial N staging [n (%)]			
NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0	9 (36)	11 (50)	9 (75)
1	14 (56)	7 (32)	3 (25)
2	0 (0)	3 (14)	0 (0)
3	2 (8)	1 (4)	0 (0)
Posttreatment ypN staging [n (%)]			
NA	0 (0)	22 (100)	12 (100)
0	15 (60)	0 (0)	0 (0)
1	5 (20)	0 (0)	0 (0)
2	4 (16)	0 (0)	0 (0)
3	1 (4)	0 (0)	0 (0)
Scarff-Bloom-Richardson grading system [n (%)]			
NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2	11 (44)	8 (36)	12 (100)
3	14 (56)	12 (54)	0 (0)
Histologic subtype [n (%)]			
NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IDC	24 (96)	18 (82)	6 (50)
ILC	1 (4)	3 (14)	4 (33)
Others	0 (0)	1 (4)	2 (17)
Lymphovascular invasion [n (%)]	6 (24)	7 (32)	2 (17)
Trastuzumab [n (%)]	10 (40)	7 (32)	0 (0)
Radiotherapy [n (%)]	25 (100)	19 (86)	10 (83)
Hormonotherapy [n (%)]			
SERM	10 (40)	8 (36)	9 (75)
AI	4 (16)	11 (50)	3 (25)

included the reference genes described in the text, inter-plate calibrators in triplicate (Sp3) and negative controls.

Confirmation of plasma miR-34a expression variations was determined using TaqMan assays (Applied Biosystems, USA) with predesigned probes according to the manufacturer's instructions. Total RNA extracted from plasma was reverse transcribed using the TaqMan miRNA RT Kit and stem-loop RT primers (Applied Biosystems).

Tumor miRNAs were extracted from 5 macrodissected sections of 4-µm FFPE tissues scrubbed from glass slides after tumor status confirmation by a pathologist. Genomic DNA (gDNA) and DNase-treated RNA were isolated using the Allprep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The concentration of the isolated RNA was measured with the Quant-iTTM RiboGreen[®] RNA Assay Kit as recommended (Invitrogen, UK). Reverse transcription was performed on 5 ng of RNA using the TaqMan miRNA RT Kit, and quantitative PCR used stem-loop RT primers (Applied Biosystems).

All PCR reactions were performed on an Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). miRNAs were considered for analysis with a Ct value <36.

Data analyses

Analyses were conducted using the 2^{-ΔCt} method (ΔCt = Ct_{sample} - Ct_{reference gene}) for each sample to obtain a normalized expression value (Schmittgen and Livak, 2007).

The reference genes were chosen as follows:

(i) Circulating miRNAs in the Pick-&-Mix microRNA PCR Panels (Exiqon)

Data were normalized using the ΔCt method as recommended by Mestdagh et al. (2009). In study 1, the mean Ct of the 50 most highly expressed miRNAs was used for normalization, as it was the most stable reference gene according to the GeNorm software (results of GeNorm analysis are available in Additional file 2). For study 2, the mean Ct of the two most stable miRNAs across NAC-treated patients (miR-484 and miR-652) was used as reference genes in addition to the cel-miR-39 spike-in.

(ii) Circulating and tumoral miRNAs with the TaqMan miRNA RT-PCR Kit (Applied Biosystems)

The relative expression levels of miR-34a were obtained by normalizing to the mean Ct of cel-miR-39/cel-miR-238 spike-ins (for plasma and tumor miRNAs) and RNU44/RNU48 snoRNAs (for tumor miRNAs only).

Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism software, version 6.00 (GraphPad Software, USA) (www.graphpad.com/scientific-software/prism/). The normal distribution of values was evaluated with the D'Agostino-Pearson omnibus and Shapiro-Wilk tests. To compare miRNAs levels, Student's t-test (paired or unpaired, two-tailed) and non-parametric tests (Wilcoxon or Mann-Whitney tests, two-sided) were used. Correlations between plasma and tumor miRNA levels, and between circulating miR-34a and troponin T levels were assessed with the Spearman test. Statistical significance was established as $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) or $P < 0.0001$ (****).

Results

NAC induces high plasma expression levels of miR-34a and miR-122

Twenty-five patients with locally advanced primary breast cancer treated with NAC were selected, and 188 miRNA profiles were assessed in plasma drawn before and after NAC.

Twenty-five miRNAs were significantly modified by NAC (Fig. 1). The two most significantly upregulated miRNAs were miR-34a and miR-122 (Figs. 1B and C), which were elevated by 2.5 and 1.9-fold, respectively, after NAC (Fig. 1B and Fig. 2A and B).

miR-34a upregulation was confirmed by a second RT-qPCR technique using TaqMan assays on the same plasma samples for 17 patients, and the results remained significant ($P < 0.001$, 3.2-fold change, Additional file 3).

Interestingly, we observed that 7 patients had a particularly high fold change for chemotherapy-induced miR-34a and/or miR-122 expression (Fig. 2, blue points). Moreover, 6 out of these 7 patients had a pPR to NAC. The deregulation of circulating miRNAs in patients who achieved a pCR ($n = 8$) after NAC was so compared with that of patients who did not achieve a pCR ($n = 17$). pPR patients tended to have a greater fold change for miR-34a and miR-122 compared with pCR patients (Fig. 3A and B). Patients who attained a pCR after NAC, which is defined as no residual tumor tissue in the breast

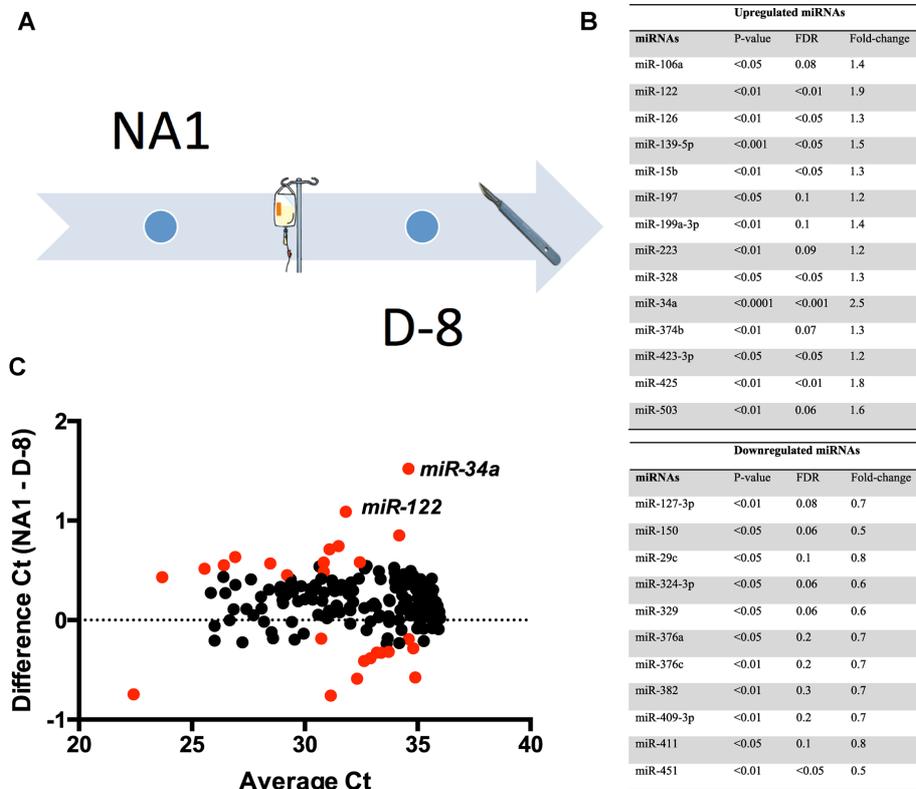


Fig. 1. Variations in circulating miRNAs after neoadjuvant chemotherapy (NAC). Expression of 188 circulating miRNAs was determined at two time points by RT-qPCR in 25 NAC-treated patients. Expression was normalized to the mean Ct of the 50 most highly expressed miRNAs. The Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to compare miRNA profiling before and after NAC. The results were adjusted for multiple testing by controlling for the false discovery rate (FDR) according to the Benjamini-Hochberg method. (A) Blood samples were collected from patients before (NA1) and after (D-8; ~1 week before surgery) NAC. (B) Twenty-five circulating miRNAs were significantly modified after NAC. (C) Bland-Altman plot of 188 circulating miRNAs before (NA1) and after (D-8) NAC. In red, 25 circulating miRNAs significantly modified after NAC. miR-34a and miR-122 were the most upregulated miRNAs at the end of NAC.

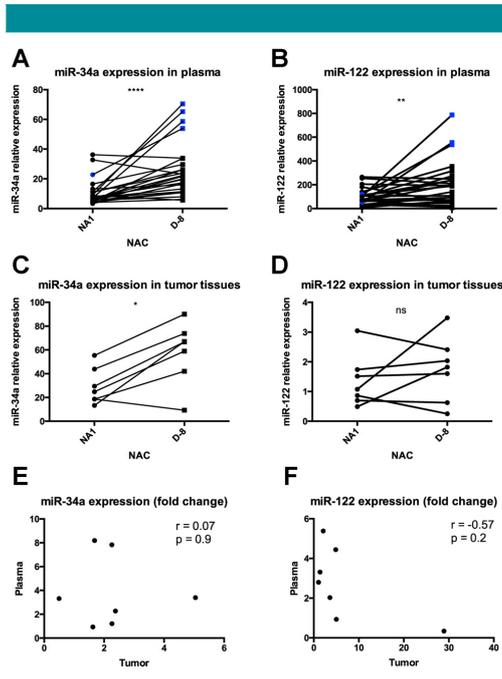


Fig. 2. Upregulation of miR-34a and miR-122 in plasma and tumor tissue at the end of neoadjuvant chemotherapy (NAC). Expression of miR-34a and miR-122 was determined by RT-qPCR in the plasma of 25 NAC-treated patients and in the tumor tissue of 7 patients with partial pathological response (pPR) to NAC. Expression was normalized to the mean Ct of the 50 most highly expressed miRNAs in A and B and to the mean Ct of RNU 44, RNU 48, cel-miR-39, and cel-miR-238 in C-F. Comparisons between the initial and subsequent time points were calculated using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Plasma miR-34a (A) and miR-122 (B) were upregulated after NAC ($P < 0.0001$ and $P < 0.01$, respectively). (C) Upregulation of miR-34a was observed in tumor tissues from patients with pPR after NAC ($P < 0.05$). (D) miR-122 was not significantly upregulated in tumor tissues after NAC. (E and F) Pearson and Spearman correlations did not show any association in the fold change (NA1 vs. D-8) of plasma and tumor miRNAs.

and lymph nodes, have improved survival. Two meta-analyses have confirmed that pCR is a greatest surrogate marker for predicting long-term clinical outcome in aggressive tumor subtypes, namely HER2-positive/hormone receptor-negative and triple-negative breast cancers (TNBC, i.e., breast tumors negative for hormone receptors and for HER2 gene amplification), compared with hormone receptor-positive tumors (Minckwitz et al., 2012; Cortazar et al., 2014). Analyses were thus conducted only on the HER2-enriched and TNBC subgroups and revealed that the fold change of circulating miR-34a after treatment was significantly greater in pPR patients compared with pCR patients (3.4 vs. 1.8, $P < 0.01$, Fig. 3C). For miR-122, the difference between pPR and pCR patients showed a considerable trend toward significance (Fig. 3D, $P = 0.06$). Interestingly, the initial miR-34a expression levels (NA1) were similar in the pCR and pPR subgroups (Fig. 3E). The fold change of miR-34a effectively distinguished patients with pCR and pPR, as shown in Fig. 3F. To predict the pathological response to NAC, the ROC of the miR-34a upregulation was calculated, and it showed a high performance with a sensitivity of 100% and a specificity of 80% (AUC = 0.97).

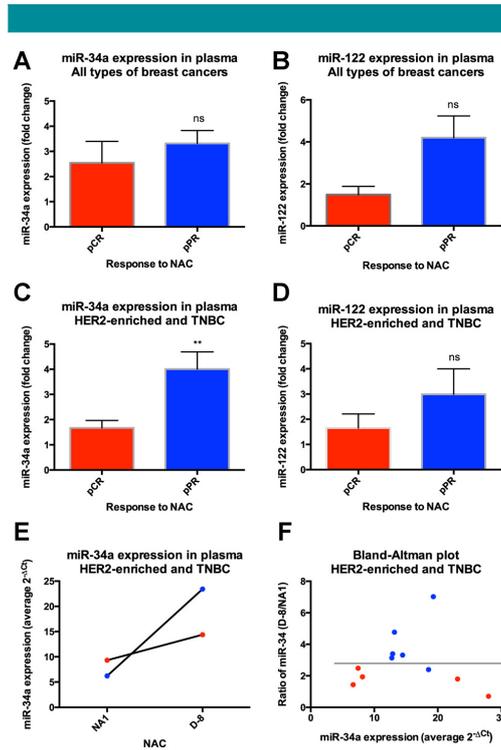


Fig. 3. Comparisons of circulating miR-34a and miR-122 in NAC-treated patients with pathological complete response (pCR, in red) and pathological partial response (pPR, in blue). Expression of miR-34a and miR-122 was determined by RT-qPCR in 25 breast cancer patients before (NA1) and after (D-8) NAC. Expression was normalized to the mean Ct of the 50 most highly expressed miRNAs. Comparisons between pCR and pPR patients were calculated using the Mann-Whitney test. The fold change of circulating miR-34a (A) and miR-122 (B) was elevated in pPR patients ($n = 17$) compared with pCR patients ($n = 8$). The data are expressed as the mean \pm SEM. (C and D) miR-34a expression was significantly increased after NAC in pPR patients ($n = 6$) compared with pCR patients ($n = 5$) with HER2-enriched and triple negative breast cancers (TNBC). The data are expressed as the mean \pm SEM. (E) The initial level of miR-34a expression (NA1) was similar in the pCR and pPR subgroups. (F) Bland-Altman plot of NAC-induced miR-34a upregulation in patients with pCR and pPR.

NAC induces miR-34a expression in tumor tissue

The 2 NAC-induced miRNAs (miR-34a and miR-122) have been described as tumor suppressors in several cancer studies, including studies on breast cancer (Hermeking, 2009; Wang et al., 2011). To determine whether the upregulation of these circulating miRNAs correlated with increased expression in tumor tissue, we collected initial core-needle biopsies and corresponding tumorectomy for 7 patients with a pPR to NAC and studied miRNA expression by RT-qPCR. A significant increase in miR-34a expression was present in residual tumoral tissue after NAC compared with the initial biopsy ($P < 0.05$, 1.9-fold change, Fig. 2C). Interestingly, decreased miR-34a expression (0.5-fold change) was evident for the one patient who had a poor response to NAC (ypT2N2Mx) and an early

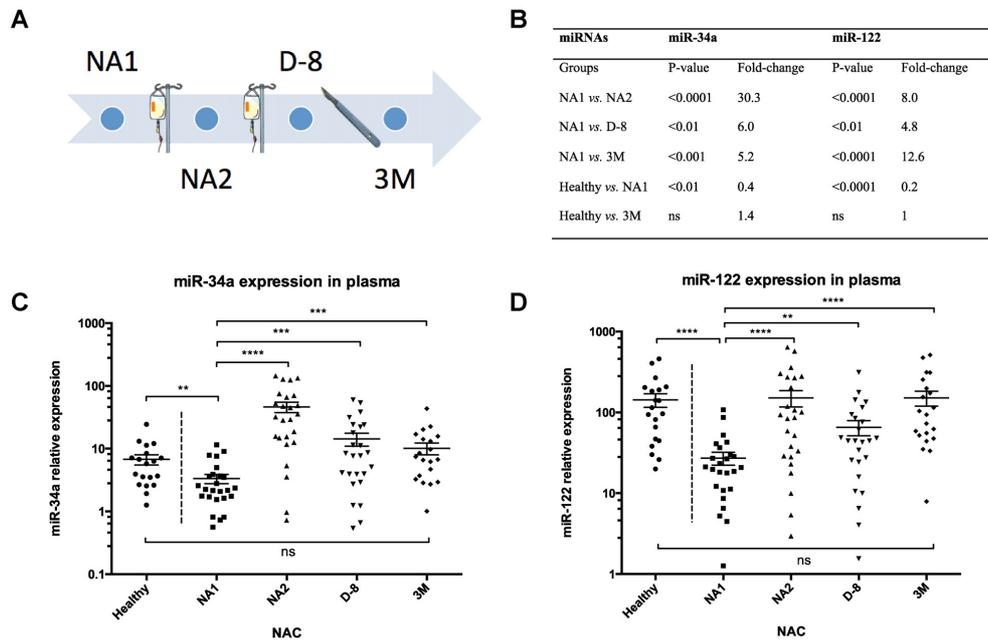


Fig. 4. Kinetics of circulating miR-34a and miR-122 variations during neoadjuvant chemotherapy (NAC). Expression of miR-34a and miR-122 was determined by RT-qPCR in 25 NAC-treated patients at 4 time points and in 20 women without a history of cancer. Expression was normalized to the mean Ct of miR-484, miR-652, and cel-miR-39. Comparisons between the initial and subsequent time points were calculated using the Wilcoxon matched-pairs signed rank and Mann-Whitney tests. (A) Blood samples were drawn from NAC-treated patients as follows: before therapy (NA1); after 1 or 2 cycles of anthracycline-based chemotherapy (NA2); ~1 week before surgery (D-8) and ~3 months after surgery (3M). (B) Results of the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Circulating miR-34a and miR-122 upregulation after anthracycline-based NAC was greater than at the end of NAC. Plasma miR-34a, (C) and miR-122 (D) levels were highly upregulated after anthracycline-based NAC and remained at elevated levels 3 months after surgery. Circulating miR-34a (C) and miR-122 (D) levels were downregulated in breast cancer patients compared with healthy women ($P < 0.01$ and $P < 0.0001$, respectively), and their expression levels were similar between NAC-treated breast cancer patients and healthy women. The data are expressed as the mean \pm SEM.

metastatic relapse. Surprisingly, this patient presented with upregulated circulating miR-34a levels after NAC, with a 3-fold increase. miR-122 was weakly expressed in tumor tissues, nearly 100-fold lower than miR-34a, and any significant upregulation of tumoral miR-122 occurred after NAC (Fig. 2D). No correlation could be established between the fold change of circulating miRNAs and tumor miRNAs (Figs. 2E and F). These data suggest a non-tumoral source of NAC-induced miR-34a and miR-122. As miR-122 is highly expressed in the liver, and as we did not observe increased expression in the tumor after NAC, its plasma levels might reflect chemotherapy-induced liver release.

Circulating miR-34a and miR-122 levels significantly increase after anthracycline-based chemotherapy and up to 3 months post-surgery

Circulating miR-34a and miR-122 expression levels were then assessed at different time points during NAC. The mean expression of miR-484, miR-652, and the spike-in cel-miR-39 was used to normalize expression levels, as this combination was determined to be the most stable by GeNorm analysis (Additional file 2).

The plasma levels of the two selected miRNAs were measured in 25 patients with NAC before therapy (NA1), after 1 or 2 cycles of anthracycline-based chemotherapy (NA2), at the end of NAC (D-8) and 3 months after surgery (3M). The study sequence is shown in Figure 4A, and the results are provided in Figure 4B and D.

The upregulation of selected miRNAs after anthracycline-based chemotherapy was greater than at the end of NAC, particularly for miR-34a, which had a fold change of 30. Three months after surgery, the miRNA expression levels remain elevated compared with the initial levels.

Circulating miR-34a and miR-122 levels are downregulated in breast cancer patients and normalized after treatments

miR-34a and miR-122 levels were measured in 20 age-matched healthy women and were compared with their expression levels in NAC-treated breast cancer patients.

Both circulating miR-34a (Fig. 4C) and miR-122 (Fig. 4D) were initially downregulated in breast cancer patients compared with controls ($P < 0.01$ for miR-34a and $P < 0.0001$ for miR-122). miRNA expression levels in patients returned to

Correlation between upregulation of plasma miR-34a and troponin T

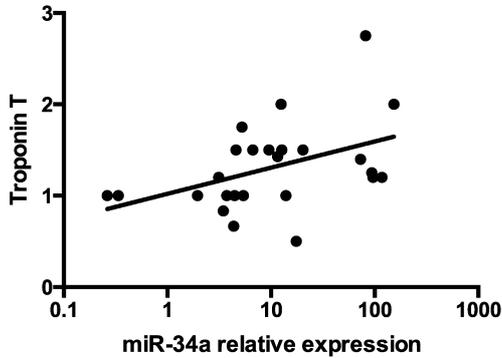


Fig. 5. Correlation between miR-34a and troponin T upregulation during neoadjuvant chemotherapy (NAC). Pearson and Spearman correlations showed a positive association between the fold change (NA1 vs. NA2) of miR-34a and troponin T ($P < 0.05$, $r = 0.4673$, $n = 25$) in the plasma of NAC-treated patients.

levels similar to controls 3 months after chemotherapy and surgery.

Correlation between circulating miR-34a upregulation and anthracycline cardiotoxicity

Recently, Boon et al. (2013) demonstrated that miR-34a plays a role in cardiomyopathy associated with aging and stroke. Because anthracyclines are known to be cardiotoxic drugs (Floyd et al., 2005), we measured plasma troponin T levels in the same patients ($n = 25$, NA1 and NA2) to determine whether there was a correlation between increased miR-34a expression and this cardiotoxicity. No patients had a history of heart or renal failure or myocardial infarction. The Pearson and Spearman correlation test showed a positive association between the fold change of miR-34a expression and troponin T levels ($P < 0.05$, $r = 0.4673$), suggesting that miR-34a may play a role in anthracycline cardiotoxicity (Fig. 5).

Tumor presence is primordial for the increase in circulating miR-34a and miR-122 expression during chemotherapy

The two selected miRNAs were also studied in 22 patients with AC to determine the influence of the tumor presence on miRNA upregulation during chemotherapy.

miRNA expression was determined D-8 before surgery and 3M after surgery, which corresponds to the end of

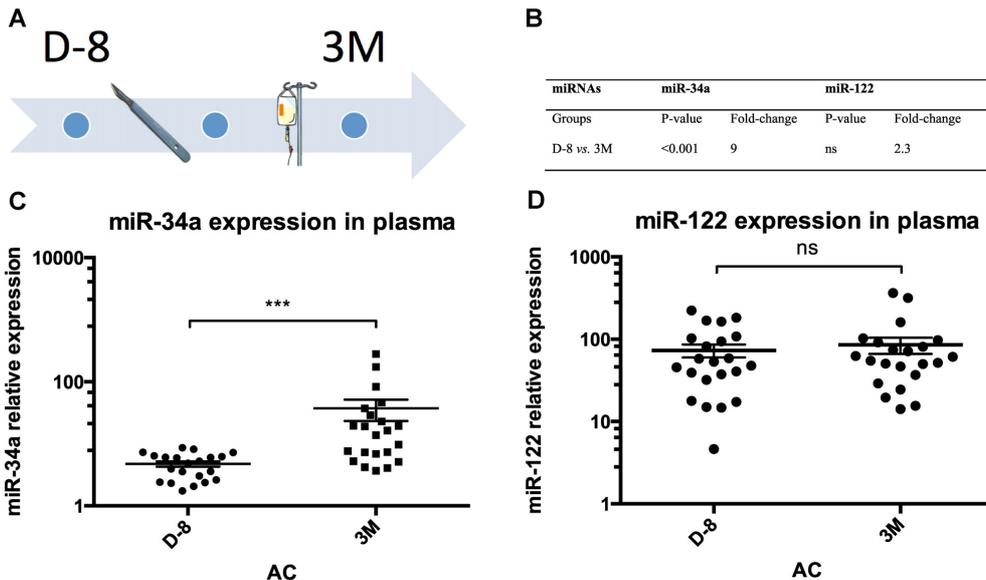


Fig. 6. Kinetics of circulating miR-34a and miR-122 variations during adjuvant chemotherapy (AC). The expression of miR-34a and miR-122 was determined at two time points by RT-qPCR in 22 AC-treated patients. Expression was normalized to the mean Ct of miR-484, miR-652, and cel-miR-39. Comparisons between the initial and subsequent time points were calculated using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (A) Blood samples were collected from AC-treated patients as follows: ~1 week before surgery (D-8) and ~3 months after surgery (3M), which corresponded to the end of anthracycline-based chemotherapy. (B) Results of the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (C) Plasma miR-34a levels increased after anthracycline-based AC but lesser than with NAC ($P < 0.001$). The data are expressed as the mean \pm SEM. (D) Nonsignificant upregulation of miR-122 expression was found after AC. The data are expressed as the mean \pm SEM.

anthracycline-based treatment. The study sequence is shown in Fig. 6A, and the results are summarized in Figs. 6B–D.

miR-34a expression significantly increased by 9 fold after anthracycline-based AC, which corresponded to approximately one-third of the increase after NAC. miR-122 was not significantly modulated after AC.

These results suggest that the presence of the tumor is important for increasing these two miRNAs during chemotherapy and that miR-34a expression is highly sensitive to the effects of anthracycline-like agents.

The expression of the two selected miRNAs was also measured in the plasma of 12 patients with primary breast cancer treated only by surgery without chemotherapy to determine whether the increased miR-34a levels in patients with AC related to tumor removal. miRNA expression was measured before D-8 and 3M after surgery. No significant variations were evident (Additional file 4).

Discussion

This study is the first reported investigation that describes alterations in circulating miRNA expression after NAC in breast cancer patients. Twenty-five circulating miRNAs were significantly deregulated after NAC. Our results reveal that two miRNAs with anti-oncogenic functions, miR-34a and miR-122, were highly increased in response to NAC.

The source of these chemotherapy-induced miRNAs is not known, and in our experimental settings, they appeared to arise from multiple origins. The tumor itself is a known source of circulating miRNAs. In vitro experiments have notably demonstrated that several tumor cell lines exposed to cytotoxic agents or ionizing radiation re-expressed miR-34a (Tazawa et al., 2007; Ghawanmeh et al., 2010; Chiyomaru et al., 2012; John-Aryankalayil et al., 2012; Stankevicius et al., 2013; Wang et al., 2013). Our team also observed miR-34a overexpression in breast tumor tissues after the NAC. However, the tumor cannot be the only source of chemotherapy-induced miRNA expression for the following reasons: (i) miR-122 was not significantly elevated in breast tumor after NAC; (ii) no correlation between plasma and tumor miRNA upregulation was evident; and (iii) circulating miR-34a was upregulated after tumor removal under the effect of AC. The two miRNAs we studied are also broadly expressed in normal tissues (Hsu et al., 2007), which could contribute to the release of miRNAs in response to chemotherapy. The most abundant liver-specific miRNA (Hu et al., 2012a), miR-122, might be induced by NAC because of the hepatotoxicity of chemotherapy; however, we failed to show any correlation between its expression and detectable hepatic damage (data not shown).

The tumor suppressor p53 is known to promote either growth arrest and apoptosis, depending on DNA damage (Boominathan, 2010). A number of miRNAs are involved in the p53 pathway, particularly miR-34a and miR-122, which are directly induced by p53 to exert anti-tumor functions (He et al., 2007; Manfè et al., 2012). This feature might explain the significant upregulation observed after anthracyclines, which cause DNA breaks and p53 activation (Lowe et al., 1994). Indeed, cancer cell lines treated with anthracyclines showed a p53-dependent increase in miR-34a expression (Tazawa et al., 2007; Wang et al., 2013). However, no correlation was observed between miR-34a downregulation in breast cancer and the presence of p53 mutations (Javeri et al., 2013). Moreover, miR-34a is also induced by chemotherapy in a p53-independent manner, e.g., platinum-based chemotherapy induced epigenetic activation of miR-34a by demethylating its promoter in bladder cancer cells (Li et al., 2013).

miR-34a and miR-122 are predominantly tumor suppressors. To slow tumor progression, they target many oncogenes, such as Bcl-2, N-Myc, and E2F3 for miR-34a

(Hermeking, 2009) and the PI3K/Akt pathway for miR-122 (Manfè et al., 2012). These miRNAs are downregulated in tumors compared with normal adjacent tissues (Peurala et al., 2011; Wang et al., 2011; Javeri et al., 2013) and in the plasma of breast cancer patients compared with healthy women. miR-34a downregulation was observed only in the tumor of a patient with a poor response to NAC, and early metastatic relapse correlated with its tumor suppressive role. Moreover, we suggest that the NAC-induced circulating miRNAs might be involved in the anti-tumor effects of chemotherapy. In fact, some studies have proposed a biological function for circulating miRNAs, illustrating their intercellular communication properties (Mathivanan et al., 2010; Turchinovich et al., 2013). Li et al. (2012) have perfused liposomal nanoparticles containing miR-34a in a mouse model of breast cancer and showed significantly decreased tumor growth and prolonged survival, proving the systemic anti-tumor activity of miR-34a. In this context, high levels of circulating tumor suppressor miRNAs might help prevent metastatic relapse.

Boon et al. (2013) demonstrated that miR-34a is involved in fibrosis and cell death following aging and acute myocardial infarction by inhibiting PNUTS (PPP1R10), which normally inhibits telomere shortening and apoptosis in cardiomyocytes. Anthracyclines, which induce high miR-34a expression in neoadjuvant and adjuvant settings, are known to produce short- and long-term cardiotoxicity; however, the exact mechanism of this toxicity has not been elucidated (Floyd et al., 2005). These preliminary results may implicate miR-34a in the cardiotoxicity of anthracyclines. Furthermore, clinical studies are required to determine whether circulating miRNAs could be biomarkers of drug-induced cardiotoxicity.

Finally, the importance of selecting appropriate endogenous controls to obtain reproducible results is of great interest. The GeNorm analysis performed to select the best circulating miRNAs for normalization revealed miR-484 as the most stable miRNA in NAC-treated patients. This result confirms that miR-484 is a candidate endogenous control for plasma miRNA detection in breast cancer, as previously proposed by two different groups (Hu et al., 2012b; Dvinge et al., 2013).

Conclusions

In conclusion, this study is the first to highlight the effects of NAC on circulating miRNAs. NAC significantly increased miR-34a expression, which might play a key role in its anti-tumor effects, as well as the expression of the tumor suppressor miR-122. Our results also revealed a heterogeneous biological response to NAC. In this context, chemotherapy-induced miR-34a and miR-122 may serve useful purposes. First, they may aid in understanding the molecular mechanisms underlying the pathological response to NAC. Secondly, miRNAs could potentially be predictive biomarkers of the response to NAC, which would allow patients to benefit from personalized medicine. Further research is nevertheless required to confirm that circulating miRNAs are diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in breast cancer patients.

Acknowledgments

We thank Dr N Bletard, C Fasquelle, S El Guendi, T Sticca, B Boujemla, J Thiry, H Schroeder, O Dengis, the GIGA-imagery-platform, the GIGA-immunohistology-platform, the team of medical oncologists, and the Biothèque of CHU de Liege.

Literature Cited

- Ambros V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350–355.
 Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297.
 Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavaré S, Caldas C, Miska EA. 2007. MicroRNA

expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* 8:1–16.

Bleyer A, Welch HG. 2012. Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *N Engl J Med* 367:1998–2005.

Boominathan L. 2010. The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. *PLoS ONE* 5:1–13.

Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Steeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluzs D, Tréguer K, Carmona G, Bonauer A, Horrevorts AJS, Didier N, Girmatsion Z, Biliczki P, Ehrlich JR, Katus HA, Müller OJ, Potente M, Zeller AM, Hermeking H, Dimmeler S. 2013. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* 495:107–110.

Brase JC, Wüttig D, Kuner R, Sultmann H. 2010. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 9:1–9.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997–1006.

Chiyomaru T, Yamamura S, Fukuhara S, Yoshino H, Kinoshita T, Majid S, Saini S, Chang I, Tanaka Y, Enokida H, Seki N, Nakagawa M, Dahiya R. 2012. Genistein Inhibits Prostate Cancer Cell Growth by Targeting miR-34a and Oncogenic HOTAIR. *PLoS ONE* 8:1–10.

Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa P, Swain SM, Prowell T, Loibl S, Wickerham DL, Bogaerts J, Baselga J, Perou C, Blumenthal G, Blohmer J, Mamounas EP, Bergh J, Semiglazov V, Justice R, Eidmann H, Paik S, Piccart M, Sridhara R, Fasching PA, Slaets L, Tang S, Gerber B, Geyer CE, Pazdur R, Ditsch N, Rastogi P, Eiermann W, Minckwitz von G. 2014. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* doi: 10.1016/S0140-6736(13) 62422-8.

Du T. 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132:4645–4652.

Dwinge H, Git A, Graf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, Zhao Y, Hirst M, Armitage J, Miska EA, Chin SF, Provenzano E, Turashvili G, Green A, Ellis I, Aparicio S, Caldas C. 2013. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature* 497:378–382.

Eulalia A, Hünzinger E, Izaurralde E. 2008. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell* 132:9–14.

Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC, Perry MC. 2005. Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol* 23:7685–7696.

Friedman RC, Farh K, Burge CB. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92–105.

Ghawanmeh T, Thunberg U, Castro J, Murray F, Laytagoon-Lewin N. 2010. miR-34a expression, cell cycle arrest and cell death of malignant mesothelioma cells upon treatment with radiation, docetaxel or combination treatment. *Oncology* 81:330–335.

He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. 2007. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447:1130–1134.

Hermeking H. 2009. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 17:193–199.

Hsu SD, Chu CH, Tsou AP, Chen SJ, Chen HC, Hsu PWC, Wong YH, Chen YH, Chen GH, Huang HD. 2007. miRNAMap 2.0: Genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Res* 36:D165–D169.

Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S. 2012a. miR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell* 3:364–371.

Hu Z, Dong J, Wang LE, Ma H, Liu J, Zhao Y, Tang J, Chen X, Dai J, Wei Q, Zhang C, Shen H. 2012b. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis* 33:828–834.

Javeri A, Ghaffarpour M, Taha MF, Houshmand M. 2013. Downregulation of miR-34a in breast tumors is not associated with either p53 mutations or promoter hypermethylation while it correlates with metastasis. *Med Oncol* 30:1–10.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA: Cancer J Clin* 61:69–90.

John-Aryankalayil M, Palayoor ST, Makinde AY, Cerna D, Simone CB, Falduto MT, Magnuson SR, Coleman CN. 2012. Fractionated radiation alters oncomir and tumor suppressor miRNAs in human prostate cancer cells. *Radiat Res* 178:105–117.

Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. 2010. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 101:2087–2092.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. 2010. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39:D152–D157.

Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. 2010. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 50:298–301.

Li H, Yu G, Shi R, Bin LangChen X, Xia D, Xiao H, Guo X, Guan W, Ye Z, Xiao W, Xu H. 2013. Cisplatin-induced epigenetic activation of miR-34a sensitizes bladder cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer* 13:1–13.

Li L, Xie X, Luo J, Liu M, Xi S, Guo J, Kong Y, Wu M, Gao J, Xie Z, Tang J, Wang X, Wei W, Yang M, Hung MC, Xie X. 2012. Targeted Expression of miR-34a Using the T-VISA System Suppresses Breast Cancer Cell Growth and Invasion. *Mol Ther* 20:2326–2334.

Lowe SW, Bodis S, McCatchey A, Remington L, Rulley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T. 1994. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 266:807–810.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Eberth BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834–838.

Manfè V, Biskup E, Rosbjerg A, Kamstrup M, Skov AG, Lerche CM, Lauenborg BT, Odum N, Gniadecki R. 2012. miR-122 regulates p53/Akt signalling and the chemotherapy-induced apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma. *PLoS ONE* 7:1–11.

Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. 2010. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73:1907–1920.

Mestdagh P, Van Vlierbergh P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 10:1–10.

Mieog JSD, van der Hage JA, van de Velde CJH. 2006. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* CD005002–CD005002 doi: 10.1002/14651858.CD005002.pub2.

Minckwitz von G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidmann H, Fasching PA, Gerber B, Eiermann W, Hilfrich J, Huober J, Jackisch C, Kaufmann M, Konecny GE, Denkert C, Nekjudova V, Mehta K, Loibl S. 2012. Definition and Impact of Pathologic Complete Response on Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy in Various Intrinsic Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol* 30:1796–1804.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10513–10518.

Peurala H, Greco D, Heikkinen T, Kaur S, Bartkova J, Jamsheed M, Aittomäki K, Heikkilä P, Bartek J, Blomqvist C, Bützow R, Nevanlinna H. 2011. miR-34a Expression Has an Effect for Lower Risk of Metastasis and Associates with Expression Patterns Predicting Clinical Outcome in Breast Cancer. *PLoS ONE* 6:1–10.

Pigati L, Yaddanapudi SCS, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM. 2010. Selective Release of MicroRNA Species from Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *PLoS ONE* 5:1–13.

Schmittgen TD, Livak KJ. 2007. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101–1108.

Stankevicius L, Almeida da Silva AP, Ventura Dos Passos F, Santos Ferreira Dos E, Menks Ribeiro MC, G David M, J Pires E, Ferreira-Machado SC, Vassetzky Y, de Almeida CE, de Moura Gallo CV. 2013. miR-34a is up-regulated in response to low dose, low energy X-ray induced DNA damage in breast cells. *Radiat Oncol* 8:1–8.

Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagawa H. 2007. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15472–15477.

Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. 2013. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet* 4:1–10.

Wang B, Wang H, Yang Z. 2011. miR-122 inhibits cell proliferation and tumorigenesis of breast cancer by targeting IGF1R. *PLoS ONE* 7:1–9.

Wang X, Dong K, Gao P, Long M, Lin F, Weng Y, Ouyang Y, Ren J, Zhang H. 2013. microRNA-34a sensitizes lung cancer cell lines to DDP treatment independent of p53 status. *Cancer Biother Radiopharm* 28:45–50.

Wu X, Somik G, Yu Y, Palomares MR, Li A, Zhou W, Chow A, Yen Y, Rossi JJ, Gao H, Wang J, Yuan YC, Frankel P, Li S, Ashing-Giwa K, Sun G, Wang Y, Smith R, Robinson K, Ren X, Wang S. 2011. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J Transl Med* 10:1–10.

Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S. 2009. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS ONE* 5:1–12.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

3. Variations de biomarqueurs cardiaques durant et après la chimiothérapie néoadjuvante pour le cancer du sein

L'importante élévation du miR-34a plasmatique sous l'effet des anthracyclines, et sa corrélation positive avec l'augmentation des troponines, nous a poussé à explorer davantage l'évolution de différents biomarqueurs cardiaques durant et après la NAC, compte tenu de sa cardiotoxicité potentielle.

Dans cette partie du projet, nous avons mesuré, dans le plasma de 45 patientes (**Tableau 1**), le niveau des cTnT, les NT-proBNP, le sST2 et 10 miARN circulants. Les miARN circulants, en plus du miR-34a, avaient été sélectionnés sur base de données bibliographiques et de leur implication potentielle dans la cardiopathie ischémique ou la CHF. Les biomarqueurs ont été mesurés à 4 temps : avant la NAC (NA1), après 1 ou 2 cycles d'anthracyclines (NA2), à la fin de la NAC (D-8) et 3 mois après la chirurgie mammaire (3M) (**Figure 1**).

Une élévation significative des cTnT et des NT-proBNP a été notée sous l'effet de la NAC, mais également une majoration du sST2 et de 4 miARN circulants (miR-126-3p, miR-199a-3p, miR-423-5p, miR-34a-5p) (**Figures 2 et 3**). De manière intéressante, dans la littérature, 3 de ces 4 miARN (miR-126-3p, miR-199a-3p, miR-423-5p) étaient associés au diagnostic et/ou à la physiopathologie de la CHF. Par rapport aux cTnT et aux NT-proBNP, le sST2 et les 4 miARNs augmentaient plus précocement et chez un plus grand nombre de patientes (**Tableau 2**).

Aucune corrélation n'a pu être identifiée dans l'évolution des différents biomarqueurs, suggérant que ces molécules pourraient apporter des informations distinctes et complémentaires sur l'effet cardiaque de la chimiothérapie.

Toutes les patientes avaient une FEVG normale avant de débiter la NAC. Une diminution significative de celle-ci a été notée chez 7 patientes durant ou après la chimiothérapie. Parmi les 7 patientes, une seule a finalement développé une CHF. L'augmentation du miR-423-5p était significativement plus importante directement après les anthracyclines (NA2) chez les patientes qui ont finalement présenté une diminution de leur FEVG (**Figure 4**).

Résultats

Dans la cohorte, 17 patientes étaient porteuses d'un cancer du sein HER2+ et ont donc bénéficié d'un traitement ciblé (Trastuzumab) durant la NAC. Connaissant la toxicité cardiaque potentielle du Trastuzumab, nous avons comparé l'évolution des biomarqueurs chez les patientes HER2+ et HER2-. Nous n'avons cependant observé aucune différence significative dans les variations des biomarqueurs entre ces 2 groupes de patientes.

En conclusion, nous avons identifié le sST2 et 3 miARN circulants potentiellement intéressants pour prédire une toxicité cardiaque liée aux anthracyclines. Pour arriver à des conclusions définitives, nous devons cependant disposer d'une cohorte plus large avec un suivi prolongé.

Article : Variations of circulating cardiac biomarkers during and after anthracycline-containing chemotherapy in breast cancer patients.

Pierre Frères, Nassim Bouznad, Laurence Servais, Claire Josse, Stéphane Wenric, Aurélie Poncin, Jérôme Thiry, Marie Moonen, Cécile Oury, Patrizio Lancellotti, Vincent Bours et Guy Jerusalem.

Article en révision dans le journal BMC Cancer depuis septembre 2017.

Title: Variations of circulating cardiac biomarkers during and after anthracycline-containing chemotherapy in breast cancer patients.

Authors: Frères Pierre^{1,2}, Bouznad Nassim³, Servais Laurence³, Josse Claire², Wenric Stéphane², Poncin Aurélie^{1,2}, Thiry Jérôme², Moonen Marie⁴, Oury Cécile³, Lancellotti Patrizio^{3,4}, Bours Vincent², Jerusalem Guy¹

¹Department of Medical Oncology, University Hospital (CHU) and University of Liège, Liège, Belgium

²Laboratory of Human Genetics, GIGA Research, University Hospital (CHU) and University of Liège, Liège, Belgium

³GIGA Cardiovascular Sciences, Department of Cardiology, Heart Valve Clinic, University Hospital (CHU) and University of Liège, Liège, Belgium

⁴Gruppo Villa Maria Care and Research, Anthea Hospital, Bari, Italy

Abstract

Over time, the chance of cure after the diagnosis of breast cancer has been increasing, as a consequence of earlier diagnosis, improved diagnostic procedures and more effective treatment options. However, oncologists are concerned by the risk of long term treatment side effects, including congestive heart failure (CHF). In this study, we evaluated innovative circulating cardiac biomarkers during and after anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients. Levels of cardiac-specific troponins T (cTnT), N-terminal natriuretic peptides (NT-proBNP), soluble ST2 (sST2) and 10 circulating microRNAs (miRNAs) were measured. Under chemotherapy, we observed an elevation of cTnT and NT-

proBNP levels, but also the upregulation of sST2 and of 4 CHF-related miRNAs (miR-126-3p, miR-199a-3p, miR-423-5p, miR-34a-5p). The elevations of cTnT, NT-proBNP, sST2 and CHF-related miRNAs were poorly correlated, suggesting that these molecules could provide different information. Further studies and long-term follow-up are needed in order to evaluate if these new markers may help to predict chemotherapy-related cardiac dysfunction (CRCD) and to identify the patients at risk to later develop CHF.

Key words: biomarkers, cardiotoxicity, chemotherapy, soluble ST2, microRNAs

Introduction

The cancer burden is a worldwide major public health problem. Fortunately, the outcome, including the cancer death rate, can be improved by earlier diagnosis and better treatment¹.

Because more patients are cured, the attention is now focusing on quality of life and long-term outcome of cancer survivors. Cardiovascular disease is the leading cause of late mortality among survivors of childhood and adolescent cancer. The risk of cardiovascular death is higher than the actual risk of cancer recurrence in many adult cancer patients in complete remission. Cancer survivors have a ten-fold higher mortality than the general population, with a fifteen-fold increased risk of developing a congestive heart

Résultats

failure (CHF) and a ten-fold increased risk of coronary artery disease^{2,3}. These patients also have a higher risk of atherosclerosis, hypertension, pericardial disease, valvular heart disease and dyslipidemia^{4,5}. The higher cardiovascular death rate in cancer survivors is secondary to a combination of cancer treatment-related risk effects (ionizing irradiation, cytotoxic and targeted agents), familiar risk factors and health behavior. Consequently, cancer survivors need appropriate surveillance in order to early detect long-term side effects of cancer therapy, allowing appropriate treatment before the toxicity becomes irreversible^{4,5}.

In this respect, easily accessible circulating biomarkers could be seen as highly valuable diagnostic tools for early detection of cardiotoxicity related to cancer treatments.

The cardiac-specific isoenzymes of troponins T and I (cTnT, cTnI) are released into the blood when cardiomyocytes are damaged. Troponin levels rapidly increase after chemotherapy and might predict late cardiac events⁶. However, troponins release is related to lysis of myocardial cells, which may be initially absent in case of type II heart damage chemotherapy. In addition, their half-life is relatively short (2 hours)⁷, requiring the collection of multiple blood samples during the treatment, which is hardly feasible during outpatient's treatments.

Résultats

N-terminal brain natriuretic peptides (NT-proBNP) are released by left ventricular cardiomyocytes in response to wall stress. This biomarker has well-established clinical utility in CHF. NT-proBNP elevation during chemotherapy in breast cancer patients has been related to asymptomatic decline in left ventricular ejection fraction (LVEF)⁸⁻¹¹. Nevertheless, studies evaluating the predictive role of NT-proBNP in the detection of chemotherapy-related cardiac dysfunction (CRCDD) gave conflicting results and the threshold of positive tests has not been determined yet^{12,13}.

Soluble ST2 (sST2), a member of the interleukin-1 receptor family, is a more recently discovered biomarker of cardiovascular stress. Two studies have demonstrated that high levels of sST2 may be a strong predictor of cardiovascular death in CHF patients^{14,15}. Furthermore, sST2 has a higher discrimination power than NT-proBNP in CHF patients¹⁶, and in community-based populations free of cardiovascular disease¹⁷.

MicroRNAs (miRNAs) are approximately 22-nucleotide long RNAs that regulate gene expression by binding to and consequently silencing target messenger RNAs. They are involved in multiple biological processes including cell proliferation, differentiation and apoptosis. All cell types release miRNAs in peripheral blood under both normal and pathological conditions. Therefore, circulating miRNAs are promising biomarkers for the

early and minimally invasive diagnosis of cancer and its treatment-related cellular toxicity¹⁸⁻²⁴.

The use of anthracyclines in the treatment of breast cancer is limited by dose-dependent cardiotoxicity, which eventually may lead to CHF. The aim of the present study is to evaluate the variations of innovative biomarkers during and after anthracycline-containing chemotherapy. Plasma levels of cTnT, NT-proBNP, sST2 and 10 selected miRNAs were measured in a total of 45 breast cancer patients receiving anthracyclines as part of their neoadjuvant chemotherapy (NAC). The neoadjuvant setting was selected because patients were treatment-naïve, so that markers levels were not modified by other therapies such as surgery or radiotherapy.

Methods

Population

Ethics approval was obtained from the local Institutional Review Board and the Ethic Committee (Ethical Committee of the Faculty of Medicine of the University of Liège). This prospective study was performed in compliance with the Declaration of Helsinki. Patients with treatment-naïve primary breast cancer ($n = 45$, median age = 49 years, range = 26 - 78 years) were recruited prospectively at CHU of Liège (Liège, Belgium) from 7/2011 to 9/2014. All patients signed a written informed consent form. Biomarker results were not

communicated to the treating physicians and consequently did not lead to any change in treatment. Patients and tumor characteristics are summarized in

Table 1.

Characteristics	Primary breast cancer patients (n = 45)
Median age (range) (y)	49 (26-78)
Estrogen receptor [n (%)]	29 (64)
Progesterone receptor [n (%)]	26 (58)
HER2 [n (%)]	17 (38)
Ki67 (median ± SD) (%)	30 ± 24
Initial T staging [n (%)]	
	NA 0
	1 4 (9)
	2 23 (51)
	3 7 (16)
	4 11 (24)
Lymph node involvement [n (%)]	33 (73)
Tumor node metastasis (TNM) stage [n (%)]	
	NA 0
	1 0
	2 26 (58)
	3 19 (42)
Scarff-Bloom-Richardson grading system [n (%)]	
	NA 0
	1 0
	2 19 (42)
	3 26 (58)
Histologic subtype [n (%)]	
	NA 0
	IDC 42 (93)
	ILC 3 (7)
	Others 0
Lymphovascular invasion [n (%)]	9 (20)
Cardiovascular risk factors [n (%)]	
	Smoking 12 (27)
	Type 2 diabetes 4 (9)
	High blood pressure 9 (20)
	Obesity 7 (16)
	Dyslipidemia 21 (47)
	Chronic kidney disease 2 (4)
Left ventricular ejection fraction (median ± SD) (%)	
	Before chemotherapy 64 ± 11
	After chemotherapy 60 ± 29

Table 1. Characteristics of patients and tumors (NA = not assessed, IDC = invasive ductal carcinoma, ILC = invasive lobular carcinoma).

Chemotherapy treatment

All patients received NAC consisting in the sequential use of 4 courses of alkylating (cyclophosphamide) and anthracycline-based (epirubicin) chemotherapy followed by 9 to 12 weeks of tubulin-binding agent (paclitaxel) based chemotherapy. Seventeen patients suffering from HER2 amplified breast cancer received, in addition, targeted therapy (trastuzumab or lapatinib) administered concomitantly with tubulin-binding agents.

Plasma collection

Blood samples were drawn at baseline before NAC (NA1), after 2 cycles of anthracycline-containing chemotherapy (NA2), at the end of the chemotherapy 8 days before surgery (D8) and 3 months after the surgery (3M), as shown in Figure 1. Plasma was collected in 9 ml EDTA tubes, was prepared within 1 hour by retaining supernatant after double centrifugation at 4°C (10 min at 815 g and 10 min at 2500 g) and was stored at -80°C.



Figure 1. Blood samples were drawn at baseline before neoadjuvant chemotherapy (NA1), after 2 cycles of anthracycline-containing chemotherapy (NA2), at the end of the chemotherapy 8 days before surgery (D8) and 3 months after the surgery (3M).

Plasma concentration of cardiac-specific troponins T, N-terminal brain natriuretic peptides and soluble ST2

cTnT and NT-proBNP were assessed in plasma with highly sensitive third-generation quantitative test (electrochemoluminescence method ECLIA, Roche Diagnostics, Belgium), as recommended by the manufacturer. Detection limit was 14 µg/L for cTnT and 400 ng/mL for NT-proBNP.

The concentrations of sST2 in the plasma were measured using a IL-1 R4/ST2 enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, United Kingdom), with a mean minimal detectable dose of 5.1 pg/ml. The inter- and intra-assay variation was 6% and 5%, respectively.

Selection, extraction and qRT-PCR of microRNAs

Based on previous publications, potentially interesting miRNAs in the context of the CRCB were selected. Three groups of miRNAs were determined: *i*) Acute myocardial infarction (AMI)-related miRNAs, including miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-499-5p²⁵; *ii*) CHF-related miRNAs, including miR-208a, miR-208b, miR-126-3p, miR-199a-3p and miR-423-5p²⁶⁻²⁸; and *iii*) miR-34a-5p, which is highly upregulated after anthracycline treatment²³ and correlated with cardiac aging and function²⁹.

Essential MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) guidelines were followed during specimen preparation³⁰.

Circulating miRNAs were purified from 100 µl of plasma with the miRNeasy mini kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. The standard protocol was adapted on the basis of Kroh's recommendations³¹. MS2 (Roche, Belgium) was added to the samples as a carrier, cel-miR-39 and cel-miR-238 were added as spike-ins. RNA was eluted in 50 µl of RNase-free water at the end of the procedure.

Reverse transcription was performed using the miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, polyadenylation and cDNA synthesis kit (Exiqon, Denmark). Quantitative PCR was performed according to the manufacturer's instructions on custom panels with the 10 selected miRNAs (Pick-&-Mix

microRNA PCR Panels, Exiqon). Controls included the reference genes described in the text, inter-plate calibrators in triplicate (Sp3) and negative controls.

All PCR reactions were performed on a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Belgium). miRNAs were considered for analysis with a quantification cycle (Cq) value < 36.

Data analysis

Analyses were conducted using the $2^{-\Delta Cq}$ method ($\Delta Cq = Cq_{\text{sample}} - Cq_{\text{reference gene}}$) for each sample to obtain a normalized expression value of the miRNAs³². Data were then normalized using the ΔCq method as recommended by Mestdagh *et al.*³³. The mean Cq of the 3 most stable miRNAs across NAC-treated patients (miR-484, miR-652 and miR-148b according GeNorm analysis of previous published data)²³ was used as reference genes in addition to the cel-miR-39 spike-in.

Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism software, version 6.00 (GraphPad Software, USA) (www.graphpad.com/scientific-software/prism/). The normal distribution of values was evaluated with the D'Agostino-Pearson omnibus and Shapiro-Wilk tests. To compare marker levels, Student's t-test (two-tailed) and non-parametric two-sided Wilcoxon or Mann-Whitney *U* tests were used. Correlations between continuous variables were assessed with the Spearman test. Statistical significance was

established as $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) or $p < 0.0001$ (****).

Results

Neoadjuvant chemotherapy induces high plasma level expression of cardiac-specific troponins T, N-terminal brain natriuretic peptides and soluble ST2

cTnT were initially undetectable in most patients, with a median level under the detection limit at baseline (NA1 time point). Their levels were then increased with a 1.3-fold at NA2 ($p < 0.0001$), a 2-fold at D8 ($p < 0.0001$) and a 1.2-fold at 3M ($p < 0.01$). An elevation in cTnT levels was demonstrated in 42% of patients at NA2, 73% at D8 and 47% at 3M (Figure 2, Table 2, Additional file 1).

NT-proBNP were found to be 1.4-fold elevated at NA2, 1.8-fold elevated at D8 and 1.6-fold elevated at 3M ($p < 0.01$ for each time point). The concentrations of NT-proBNP were increased in 58% of patients at NA2 and 60% of patients at D8 and 3M (Figure 2, Table 2, Additional file 1).

sST2 levels were increased by 1.4-fold in 64% of patients at NA2 ($p < 0.001$), by 1.6-fold in 87% of patients at D8 ($p < 0.0001$) and by 1.3-fold in 69% of patients at 3M ($p < 0.001$) (Figure 2, Table 2, Additional file 1).

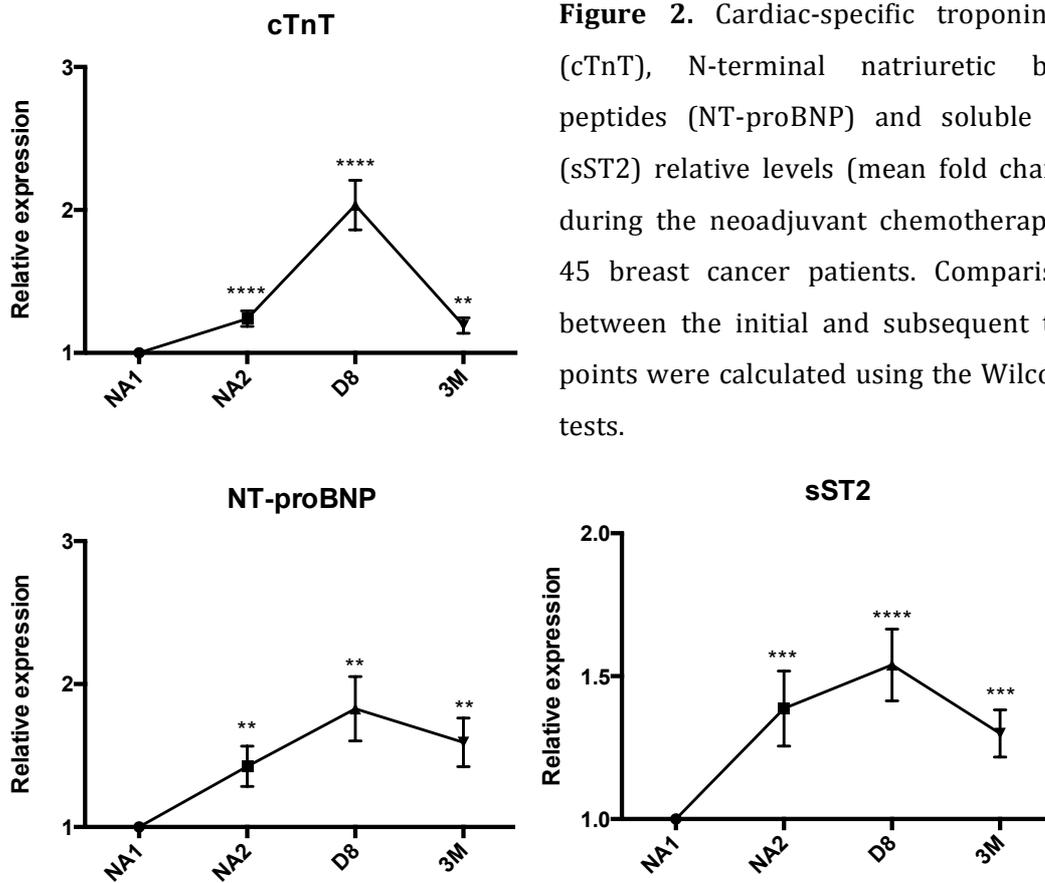


Figure 2. Cardiac-specific troponins T (cTnT), N-terminal natriuretic brain peptides (NT-proBNP) and soluble ST2 (sST2) relative levels (mean fold change) during the neoadjuvant chemotherapy in 45 breast cancer patients. Comparisons between the initial and subsequent time points were calculated using the Wilcoxon tests.

Time points	cTnT	NT-proBNP	sST2	miR-126-3p	miR-199a-3p	miR-423-5p	miR-34a-5p
NA2	42%	58%	64%	76%	64%	78%	98%
D8	73%	60%	87%	-	-	78%	89%
3M	47%	60%	69%	71%	-	73%	89%

Table 2. Percentage of significant increase in markers levels at each time point of the chemotherapy treatment.

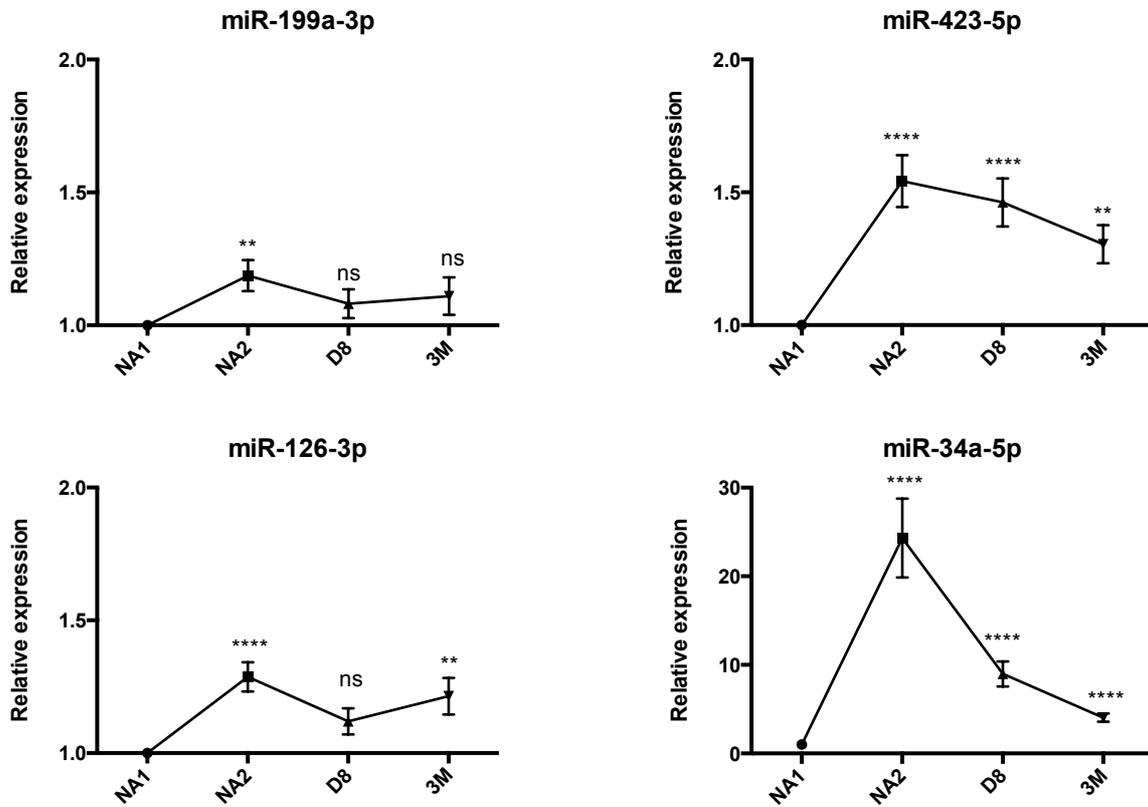


Figure 3. The relative level of microRNAs (mean fold change) during the neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients. Plasma levels of microRNAs were determined by RT-qPCR in the plasma of 45 NAC-treated patients. Comparisons between the initial and subsequent time points were calculated using the Wilcoxon tests.

Cardiac heart failure-related microRNAs plasma levels significantly increase after neoadjuvant chemotherapy

None of the AMI-related miRNAs (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-499-5p) were significantly deregulated during and after the NAC.

Significant increases were found regarding the levels of CHF-related miRNAs. The concentrations of miR-126-3p were elevated by 1.3-fold in 76% of patients at NA2 ($p < 0.0001$) and in 71% of patients at 3M. This miRNA was not significantly deregulated at D8 ($p > 0.05$). miR-199a-3p levels were found elevated by 1.2-fold in 64% of patients at NA2 ($p < 0.01$) but were not modified at D8 and 3M time points. miR-423-5p levels were increased by 1.6-fold in 78% of patients at NA2 ($p < 0.0001$), by 1.5-fold in 78% of patients at D8 ($p < 0.0001$) and by 1.3-fold in 73% of patients at 3M ($p < 0.01$). On the other side, miR-208a and miR-208b levels were not deregulated during the NAC (Figure 3, Table 2, Additional file 1).

Finally, miR-34a-5p was confirmed to be sensitive to anthracycline-based chemotherapy with a 24.3-fold increase at NA2 in 98% of patients. miR-34a-5p levels were also increased by 9-fold at D8 and 4.1-fold at 3M, in 89% of patients. The increase of miR-34a-5p was highly significant at each time point ($p < 0.0001$) (Figure 3, Table 2, Additional file 1).

Correlations between cardiac biomarkers and miRNAs

Relationships between changes in the plasma levels of the biomarkers were evaluated (see Additional file 2 for the statistical analyses). The elevation of cTnT was significantly correlated with that of NT-proBNP ($p < 0.01$, $r = 0.46$) and sST2 ($p < 0.001$, $r = 0.48$) at D8. No correlation was found between the elevation of NT-proBNP and sST2. The only correlation observed between miRNAs and the other biomarkers concerns the increase of cTnT and miR-199a-3p at D8 ($p < 0.05$, $r = 0.31$), and the rise of sST2 that is inversely correlated with that of miR-423-5p at 3M ($p < 0.05$, $r = -0.29$).

Correlations between biomarkers variations and clinical data

All patients had normal LVEF before starting chemotherapy. A significant decline in LVEF, defined as $\geq 10\%$ decline from baseline to $\leq 55\%$ ³⁴, has been noted in 7 patients (16% of the cohort), on average 20 months after the initial ultrasound. Of these 7 patients, 6 had HER2-positive breast cancer and degraded their LVEF during or after anti-HER2 treatment. One of these patients finally developed a CHF, with an LVEF evaluated at 33%, while she was still under adjuvant anti-HER2 treatment.

Biomarkers variations were compared between the 2 groups of patients (normal vs. decreased LVEF). No significant differences for cTnT, NT-proBNP and sST2 were found. However, the patient who developed a CHF had higher-than-average values for these 3 markers, particularly at the end of

chemotherapy for sST2 (D-8 time point, 3.64 vs. 1.53 pg/mL, SD = 0.84) and 3 month after surgery for NT-proBNP (3M time point, 6.54 vs. 1.55 ng/mL, SD = 1.14). For miRNAs, the elevation of miR-423-5p directly after anthracyclines (NA2 time point) was significantly greater in patients with decreased LVEF ($p = 0.045$, 1.28-fold, Figure 4). The patient who developed a CRCDD also had a higher elevation of miR-423-5p than the mean of other patients (2.39 vs. 1.54-fold, SD = 0.65).

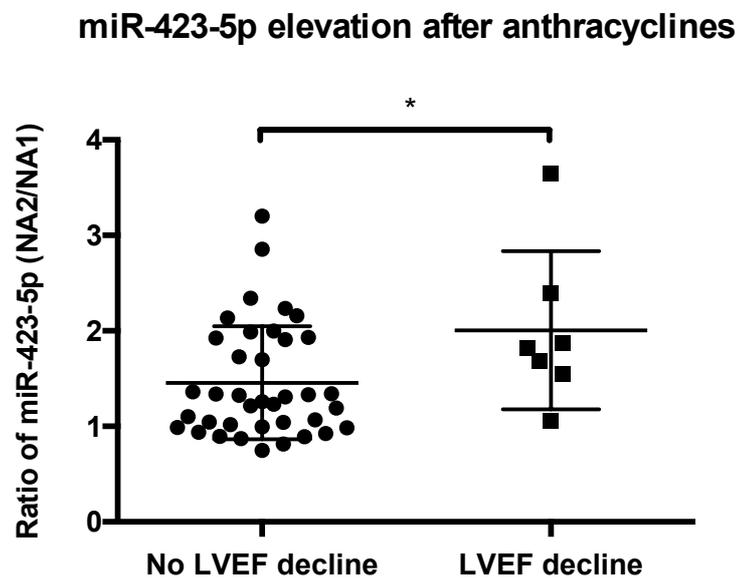


Figure 4. Comparison of circulating miR-423-5p elevation directly after anthracyclines between patients with ($n = 7$) or without ($n = 38$) LVEF decline. Expression was determined by RT-qPCR at NA1 and NA2 time points. Comparisons between the 2 groups were calculated using the Mann-Whitney U test. The data are expressed as the mean \pm SEM.

HER2-targeted therapies do not modify cardiac biomarkers plasma levels

In our cohort, 17 patients with HER2-positive breast cancer received HER2-targeted therapy during the neoadjuvant setting (trastuzumab or lapatinib). HER2-targeted therapies are associated with a modest risk of reversible cardiotoxicity, which is typically observed as an asymptomatic decrease in left ventricular function³⁵. We did not observe any difference in biomarker modifications in these patients as compared with HER2-negative patients (see Additional file 2).

Discussion

cTnT and NT-proBNP are both important biomarkers in heart diseases. Our study finds a significant increase in these biomarkers at the end of the NAC for breast cancer, and potentially identifies a group of patients at risk of CRCD.

Compared with cTnT and NT-proBNP, sST2 levels increase in a higher percentage of patients directly after anthracyclines-based chemotherapy (NA2 time point). As sST2 is strongly associated with CHF severity and outcome^{14,15}, its blood concentration during chemotherapy may be an important predictor of long-term CRCD. Nonetheless, sST2 lacks tissue specificity and its levels could be elevated in case of breast cancer^{36,37}. In fact, Lu *et al.* previously reported elevated sST2 levels in the serum of breast

Résultats

cancer patients, with a decrease after tumor surgery³⁶. All our patients experienced a complete - or at least a partial - pathologic response to the NAC, and were free of disease after 3 months. If tumor cells indeed secreted plasma sST2, we would expect a progressive decrease in its levels as the tumor responds or after the surgery. On the contrary, plasma levels of sST2 remain significantly higher, compared with baseline, after the chemotherapy and even 3 months after breast surgery (D8 and 3M time points, Figure 2). Apoptotic cancer cells could also have released plasma sST2. If this was the case, we should detect a correlation between sST2 upregulation and tumor response to chemotherapy, but such a correlation was not found. Based on these results, we think that sST2 elevation is a consequence of the chemotherapy rather than a reflection of the tumor presence and/or response. Among selected miRNAs, we demonstrated the increase of 3 miRNAs related to the diagnosis and prognosis of CHF: miR-126-3p, miR-199a-3p, miR-423-5p. Vascular endothelium-enriched miR-126 has been associated with coronary artery disease and CHF. Reduced levels were observed in the acute phase^{26,28,38}, followed by normalization after clinical improvement^{26,28}. CRCVD does not necessarily imply tissue ischemia¹⁸ and an increase, rather than a decrease, of miR-126-3p concentrations was found after the chemotherapy. As miR-126-3p is enriched in endothelial cells and promotes blood vessels formation³⁹, its upregulation could be a response to cellular

Résultats

stress and anti-angiogenic activity of the chemotherapy⁴⁰. In the same way, miR-199a-3p levels also decreased in acute heart failure⁴¹, while our results have shown an elevation after chemotherapy. miR-199a-3p is largely expressed in cardiomyocytes and its myocardial levels are upregulated in hypertrophic hearts⁴², which is sometimes observed in CRC¹⁸. After myocardial infarction in mice, miR-199a promotes cardiomyocytes regeneration and recovery of cardiac functional parameters⁴³. Cardiomyocytes could therefore release miR-199a-3p under the effect of the chemotherapy to play a cardio-protective role, though this hypothesis requires further explorations. Plasma levels of miR-423-5p were highly increased immediately after anthracyclines (NA2 time point), especially in patients with decreased LVEF (Figure 4). Two recent studies have unveiled that miR-423-5p was enriched in the blood of patients suffering from CHF, with a high diagnosis power and a significant correlation with CHF prognostic markers^{27,44}. In another study, circulating miR-423-5p levels were able to predict long-term mortality of CHF patients⁴⁵. Based on these reports and our findings, we believe that the diagnostic, prognostic and predictive roles of miR-423-5p in CRC should be further explored.

Circulating miR-34a-5p was also studied for multiple reasons. Boon *et al.* demonstrated that miR-34a was involved in the alteration of cardiac contractile function after AMI, by inducing telomere attrition²⁹. Desai *et al.*

Résultats

evaluated miR-34a expression in myocardial tissues of mouse exposed to increasing doses of doxorubicin. Unlike troponins, upregulation of miR-34a was an early event inside the cardiac tissue and did not involve prior necrosis of cardiomyocytes²⁰. Our study indicates a strong increase in miR-34a plasma levels immediately after anthracycline-based chemotherapy, followed by a gradual decrease. The tumor suppressor p53 is known to promote both growth arrest and apoptosis upon DNA damage⁴⁶. miR-34a is directly induced by p53 to exert anti-tumor functions⁴⁷. This might explain the miR-34a upregulation observed after anthracyclines, which cause DNA breaks and p53 activation⁴⁸. The subsequent tubulin-binding agent based chemotherapy does not act via DNA breaks but by the disruption of microtubule function. Plasma miR-34a increase could therefore be specific of anthracyclines chemotherapy, explaining the gradual decrease of miR-34a levels after this part of the treatment. The concentration of miR-34a-5p may help for the identification of patients at risk of developing CRCD, however, the threshold of a positive test is still unknown. One problem may be the significant elevation in a high percentage of patients although most of them will not develop any cardiotoxicity. Furthermore, miR-34a is broadly expressed in normal tissues and this miRNA may thus lack specificity. The increase of miR-34a levels after anthracyclines was not correlated with the increase of troponins. This observation is in contradiction with our previous study that

Résultats

was performed on a smaller number of patients²³, probably because of the limited statistical power. Globally, the elevation of the other markers (cTnT, NT-proBNP, sST2) was poorly correlated with that of CHF-related miRNAs, which could imply that these molecules provide distinct information about CRCD.

Interpretation of our results is limited for several reasons. Firstly, the small number of patients, with only one who developed a clinical CRCD, does not allow definitive conclusions to be drawn. In addition, majority of patients experienced an asymptomatic decline in LVEF in the context of anti-HER2 therapy, and we know that the cardiotoxicity mechanism is different from that of anthracyclines¹⁸. As cardiomyopathy is a late side effect of the chemotherapy, a long-term follow-up is required. The biomarkers we identified (sST2, miR-126-3p, miR-199a-3p, miR-423-5p and miR-34a-5p) should therefore be studied in a larger prospective trial with regular and prolonged cardiac monitoring. These biomarkers may be useful either as a predictive marker of cardiotoxicity at the time of treatment or as a new tool for the early identification of late side effects before the patients have clinical symptoms. Importantly, appropriate treatment of CRCD may prevent irreversible consequences if initiated early.

Conclusion

We identified sST2, miR-126-3p, miR-199a-3p, miR-423-5p and miR-34a-5p as innovative biomarkers for potential early and sensitive detection of the cardiomyopathy associated with anthracycline-based breast cancer chemotherapy.

Abbreviations

AMI = acute myocardial infarction

cTnT = cardiac-specific troponins T

CHF = congestive heart failure

CRCO = chemotherapy-related cardiac dysfunction

LVEF = Left Ventricular Ejection Fraction

MIQUE = Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments

miRNAs = microRNAs

NAC = neoadjuvant chemotherapy

NT-proBNP = N-terminal brain natriuretic peptides

SD = standard deviation

SEM = standard error of the mean

sST2 = soluble ST2

Declarations

Ethic approval and consent: Ethics approval was obtained from the local Institutional Review Board and the Ethic Committee. All patients signed a written informed consent form.

Consent for publication: Not applicable.

Availability of data and materials: All datasets on which the conclusions of the manuscript rely are presented in the Additional file 1.

Competing of interests: none

Funding: PF is a F.R.S.-FNRS PhD fellow. LS and NB had a Televie fellowship. CO is a Senior Research Associate at the F.R.S.-FNRS. This work was supported by the French Community of Belgium; the Belgian Funds for Scientific Research (F.R.S.-FNRS); the F.R.S.-FNRS-Televie; the F.I.R.S (CHU de Liège) and the Région Wallone (Secance, BRAMIR).

Authors' contributions: PF, NB, LS, SW, AP, and JT carried out the molecular genetic studies, participated in the design of the study and statistical analyses, and drafted the manuscript. CJ, MM, CO, and PL participated in the design of the study and the writing of the manuscript. PL, VB and GJ conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We would like to thank Olivier Dengis, Corinne Fasquelle, Tiberio Sticca, Sonia El Guendi, Bouchra Boujemla, the GIGA-imagery-platform, the GIGA-immunohistology-platform, the team of medical oncologists and the Biobank of CHU de Liège.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
2. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT et al. Chronic Health Conditions in Adult Survivors of Childhood Cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(15):1572-82.
3. Mertens AC, Yasui Y, Neglia JP, Potter JD, Nesbit ME Jr, Ruccione K et al. Late Mortality Experience in Five-Year Survivors of Childhood and Adolescent Cancer: The Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol.* 2001;19:3163-72.
4. Diller L, Chow EJ, Gurney JG, Hudson MM, Kadin-Lottick NS, Kawashima TI et al. Chronic Disease in the Childhood Cancer Survivor Study Cohort: A Review of Published Findings. *J Clin Oncol.* 2009;27:2339-55.
5. Carver JR, Shapiro CL, Ng A, Jacobs L, Schwartz C, Virgo KS et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Evidence Review on the Ongoing Care of Adult Cancer Survivors: Cardiac and Pulmonary Late Effects. *J Clin Oncol.* 2007;25:3991-4008.
6. Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo N, Boeri M, Lamantia G et al. Prognostic Value of Troponin I in Cardiac Risk Stratification of Cancer Patients Undergoing High-Dose Chemotherapy. *Circulation.* 2004;109:2749-54.
7. Gerhardt W, Katus H, Ravkilde J, Hamm C, Jørgensen PJ, Peheim E et al. S-troponin T in suspected ischemic myocardial injury compared with mass and catalytic concentrations of S-creatin kinase isoenzyme MB. *Clinical Chemistry.* 1991;37:1405-11.

Résultats

8. Cil T, Kaplan AM, Altintas A, Akin AM, Alan S, Isikdogan A. Use of N-terminal pro-brain natriuretic peptide to assess left ventricular function after adjuvant doxorubicin therapy in early breast cancer patients: a prospective series. *Clin Drug Investig.* 2009;29(2):131-7.
9. Kittiwarawut A, Vorasettakarnkij Y, Tanasanvimon S, Manasnayakorn S, Sriuranpong V. Serum NT-proBNP in the early detection of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2013;9(2):155-61.
10. Ky B, Putt M, Sawaya H, French B, Januzzi JL Jr, Sebag IA et al. Early increases in multiple biomarkers predict subsequent cardiotoxicity in patients with breast cancer treated with doxorubicin, taxanes, and trastuzumab. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(8):809-16.
11. De Iuliis F, Salerno G, Taglieri L, De Biase L, Lanza R, Cardelli P, Scarpa S. Serum biomarkers evaluation to predict chemotherapy-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Tumour Biol.* 2016;37(3):3379-87.
12. Vogelsang TW, Jensen RJ, Hesse B, Kjær A. BNP cannot replace gated equilibrium radionuclide ventriculography in monitoring of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Int J Cardiol.* 2008;124:193-7.
13. Daugaard G, Lassen U, Bie P, Pedersen EB, Jensen KT, Abildgaard U et al. Natriuretic peptides in the monitoring of anthracycline induced reduction in left ventricular ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* 2005;7:87-93.
14. Weinberg EO, Shimpo M, Hurwitz S, Tominaga S-I, Rouleau J-L, Lee RT. Identification of Serum Soluble ST2 Receptor as a Novel Heart Failure Biomarker. *Circulation.* 2003;107:721-6.
15. Pascual-Figal DA, Ordoñez-Llanos J, Tornel PL, Vázquez R, Puig T, Valdés M et al. Soluble ST2 for predicting sudden cardiac death in patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(23):2174-9.
16. Gruson D, Lepoutre T, Ahn SA, Rousseau MF. Increased soluble ST2 is a stronger predictor of long-term cardiovascular death than natriuretic peptides in heart failure patients with reduced ejection fraction. *Int J Cardiol.* 2014;172(1):e250-2.

17. Coglianese EE, Larson MG, Vasan RS, Ho JE, Ghorbani A, McCabe EL et al. Distribution and Clinical Correlates of the Interleukin Receptor Family Member Soluble ST2 in the Framingham Heart Study. *Clinical Chemistry*. 2012;58:1673-81.
18. Sandhu H, Maddock H. Molecular basis of cancer-therapy-induced cardiotoxicity: introducing microRNA biomarkers for early assessment of subclinical myocardial injury. *Clinical Science*. 2014;126:377-400.
19. Horie T, Ono K, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with miR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB pathway. *Cardiovascular Res*. 2010;87:656-64.
20. Desai VG, C Kwekel J, Vijay V, Moland CL, Herman EH, Lee T et al. Early biomarkers of doxorubicin-induced heart injury in a mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;281:221-9.
21. Nishimura Y, Kondo C, Morikawa Y, Tonomura Y, Torii M, Yamate J, Uehara T. Plasma miR-208 as a useful biomarker for drug-induced cardiotoxicity in rats. *J Appl Toxicol*. 2015;35:173-80.
22. Vacchi-Suzzi C, Bauer Y, Berridge BR, Bongiovanni S, Gerrish K, Hamadeh HK et al. Perturbation of microRNAs in Rat Heart during Chronic Doxorubicin Treatment. *PLoS One*. 2012;7:e40395.
23. Frères P, Josse C, Bovy N, Boukerroucha M, Struman I, Bours V, Jerusalem G. Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Induces miR-34a and miR-122 Expression. *J Cell Physiol*. 2015;230:473-81.
24. Frères P, Wenric S, Boukerroucha M, Fasquelle C, Thiry J, Bovy N et al. Circulating microRNA-based screening tool for breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7:5416-28.
25. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010;31:2765-73.
26. Akat KM, Moore-McGriff D, Morozov P, Brown M, Gogakos T, Da Rosa JC et al. Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *PNAS*. 2014;111:11151-6.

27. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p As a Circulating Biomarker for Heart Failure. *Circ Res.* 2010;106:1035-9.
28. Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of Plasma miRNAs in Congestive Heart Failure. *Circ J.* 2011;75:336-40.
29. Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature.* 2013;495:107-10.
30. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22.
31. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods.* 2010;50(4):298-301.
32. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3:1101-8.
33. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009;10(6):R64.
34. Ganz WI, Sridhar KS, Forness TJ. Detection of early anthracycline cardiotoxicity by monitoring the peak filling rate. *Am J Clin Oncol.* 1993;16(2):109-12.
35. Ewer MS, Vooletich MT, Durand JB, Woods ML, Davis JR, Valero V, Lenihan DJ.. Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J Clin Oncol.* 2005;23(31):7820-6.
36. Lu DP, Zhou XY, Yao LT, Liu CG, Ma W, Jin F, Wu YF. Serum soluble ST2 is associated with ER-positive breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:198.
37. Gillibert-Duplantier J, Duthey B, Sisirak V, Salaün D, Gargi T, Trédan

- O et al. Gene expression profiling identifies sST2 as an effector of ErbB2-driven breast carcinoma cell motility, associated with metastasis. *Oncogene*. 2012;31:3516-24.
38. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C et al. Circulating MicroRNAs in Patients With Coronary Artery Disease Novelty and Significance. *Circ Res*. 2010;107:677-84.
39. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA et al. The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev Cell*. 2008;15:261-71.
40. Luengo-Gil G, González-Billalabeitia E, Chaves-Benito A, Martínez EG, Garre EG, Vicente V, la Peña de FA. Effects of conventional neoadjuvant chemotherapy for breast cancer on tumor angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;151:577-87.
41. Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, Maaten ter JM, Valente MAE, Liu LCY et al. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2016;18:414-23.
42. Song XW, Li Q, Lin L, Wang XC, Li DF, Wang GK et al. MicroRNAs are dynamically regulated in hypertrophic hearts, and miR-199a is essential for the maintenance of cell size in cardiomyocytes. *J Cell Physiol*. 2010;225:437-43.
43. Eulalio A, Mano M, Ferro MD, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*. 2012;492:376-81.
44. Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2012;14:147-54.
45. Seronde MF, Vausort M, Gayat E, Goretti E, Ng LL, Squire IB et al. Circulating microRNAs and Outcome in Patients with Acute Heart Failure. *PLoS One*. 2015;10:e0142237.
46. Boominathan L. The Tumor Suppressors p53, p63, and p73 Are Regulators of MicroRNA Processing Complex. *PLoS One*. 2010;5:e10615.
47. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y et al. A

microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447:1130-4.

48. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*. 1994;266(5186):807-10.

Additional files

Additional file 1: Datasets including miRNAs raw and normalized Cq and cTnT, NT-proBNP and sST2 levels at each time point.

Additional file 2: Results of statistical analyses. (A) Correlations Spearman tests between the fold change of cTnT, NT-proBNP, sST2, miR-126-3p, miR-199a-3p, miR-423-5p and miR-34a-5p at different time point of the neoadjuvant chemotherapy in 45 breast cancer patients. (B) Comparison between the increase of the markers at the end of the chemotherapy (NA1 vs. D8 and NA1 vs. 3M) in patients treated ($n = 17$) or not ($n = 28$) with HER2 targeted therapy, using Mann-Whitney tests.

Discussion & perspectives

1. Les miARN comme biomarqueurs

En étudiant les miARN circulants chez les patientes avec un cancer du sein, nous avons cherché à déterminer si ceux-ci avaient le potentiel de nous guider dans les différentes étapes de la prise en charge : aux moments du diagnostic, de la décision thérapeutique et de la surveillance des patientes.

Notre signature diagnostique possède plusieurs avantages intéressants par rapport à une mammographie de dépistage. Premièrement, sa performance n'est pas affectée par l'âge. Elle pourrait, dès lors, s'avérer utile pour dépister des femmes jeunes et à haut risque, pour qui éviter une irradiation est primordiale. Deuxièmement, la sensibilité du test est plus élevée que celle de la mammographie (Pisano et al., 2005). Il pourrait, donc, réduire le risque de faux négatifs. Par contre, sa spécificité est faible et la réalisation d'une mammographie resterait donc indispensable si les résultats de la signature devaient évoquer un cancer du sein. Finalement, comme la performance de la signature est indépendante du stade tumoral, son utilisation pour le dépistage de cancer du sein débutant ne poserait pas de problème.

Notre modèle classe correctement les femmes en rémission d'un cancer du sein et celles avec une rechute métastatique. Il constitue donc un outil potentiel pour détecter une récurrence chez des patientes précédemment traitées pour un cancer localisé. Le miR-34a et le miR-122 pourraient également servir pour le suivi des patientes, vu qu'ils sont diminués au diagnostic et retournent à des valeurs comparables à celles des femmes saines après les traitements. Cependant, l'impact réel d'une détection précoce d'une rechute métastatique du cancer du sein n'est pas encore démontré à l'heure actuelle (Rosselli Del Turco et al., 1994). L'intérêt des miARN circulants, comme tous les autres biomarqueurs, pour la surveillance des patientes est donc plus qu'incertain.

Afin d'étudier le potentiel pronostique de nos miARN, nous avons besoin d'une observation plus longue, car seulement une faible

proportion de nos patientes ont rechuté à l'heure actuelle. Néanmoins, nous avons regardé si, dans la littérature, les miARN de notre signature étaient associés au pronostic du cancer du sein. En 2015, Sahlberg a montré qu'un taux sérique élevé de 2 de nos miARN, le miR-107 et le miR-103, était indépendamment associé à une plus courte survie sans progression et survie globale dans les TNBC (Sahlberg et al., 2015). Dans une autre étude, un niveau d'expression faible du miR-148a au sein du tissu tumoral était associé à une moins bonne survie globale, également dans le TNBC (Xu et al., 2016).

La prédiction de l'efficacité de la chimiothérapie pourrait permettre de réduire sa prescription et d'éviter sa toxicité chez un nombre notable de patientes. Nos résultats montrent que, dans les cancers HER2+ et TNBC, une élévation importante du miR-34a circulant durant la NAC est associée à une réponse partielle au traitement. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par une équipe indépendante, sur une cohorte de 86 patientes (Liu et al., 2017). D'un point de vue pratique, l'évolution du miR-34a durant la NAC n'est cependant pas pertinente, car il faut attendre la fin de la chimiothérapie pour noter une différence significative. Il n'y aurait donc aucun impact sur la décision initiale de débiter ou non une chimiothérapie. Nous n'avons pas encore identifié de miARN circulants qui permettraient, dès le départ ou après 1 ou 2 cycles d'anthracyclines, de prédire la réponse pathologique finale à la NAC. Toutefois, pour le moment, nous disposons d'un nombre trop limité de patientes pour tirer des conclusions définitives.

Finalement, nous avons montré une élévation de plusieurs biomarqueurs qui pourraient refléter la toxicité cardiaque des anthracyclines : le sST2 et 3 miARN circulants (miR-126-3p, miR-199a-3p, miR-423-5p). Il est déjà démontré que les taux de sST2 sont corrélés à la sévérité et au pronostic de la CHF (Weinberg et al., 2003 et Pascual-Figal et al., 2009), mais les 3 miARN sont aussi associés, d'une façon ou d'une autre, à la CHF. Les taux du miR-126-3p et le miR-199a-3p sont diminués dans la phase aiguë de la CHF (Akat et al., 2014; Fukushima et al., 2011 et Ovchinnikova et al., 2016), ce qui est contradictoire avec nos résultats, montrant une élévation des miARN sous l'effet des anthracyclines. Le miR-423-5p, par contre, s'est montré plus intéressant. Ce miARN augmentait fortement après les anthracyclines puis diminuait progressivement au cours du temps. De plus, son élévation après les anthracyclines était plus marquée chez les patientes qui ont présenté une altération de la FEVG dans le décours des traitements. Deux études

ont montré une élévation du miR-423-5p dans le plasma de patients souffrant d'une CHF, avec une performance diagnostique satisfaisante (Tijssen et al., 2010 et Goren et al., 2012). Une autre étude montrait que le miR-423-5p circulant permettait de prédire la mortalité à long terme liée à la CHF (Seronde et al., 2015). En intégrant ces données à nos résultats, nous pensons que la valeur pronostique et prédictive du miR-423-5p circulant dans la CRCD devrait être davantage explorée.

Cette partie du projet est néanmoins affaiblie par le fait qu'une seule de nos patientes a présenté une CRCD. Comme cette toxicité est rare et tardive, il faudrait disposer d'une large cohorte avec un suivi cardiologique régulier, ce qui représente un défi de taille. De plus, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les biomarqueurs cardiaques déjà utilisés en routine (cTnT, NT-proBNP) et les nouveaux biomarqueurs étudiés (sST2, miARN). La corrélation positive entre l'élévation des cTnT et du miR-34a circulant, démontrée dans l'**Article 2**, n'a pas pu être confirmée sur un plus grand nombre de patientes dans l'**Article 3**. Toutefois, la chimiothérapie pourrait induire les différents biomarqueurs par des mécanismes distincts, expliquant cette absence de corrélation significative.

Si nous voulons réellement valider, puis utiliser, les miARN comme biomarqueurs chez nos patientes, il sera d'abord primordial d'établir une méthode de normalisation universelle. En effet, dans le cadre d'une quantification relative par qPCR, la normalisation avec un gène de référence (*housekeeping gene*) est indispensable afin de pouvoir comparer les échantillons. La littérature actuelle regorge d'études sur les miARN et leur rôle de biomarqueur dans tous les domaines de la médecine. Pourtant, les méthodes utilisées dans ces différentes études sont hétérogènes en terme de types d'échantillon (tissu, sang, sérum, plasma), de leur préparation (centrifugation, conservation, extraction de l'ARN) et, surtout, de méthodes de normalisation. Le miR-16, par exemple, est souvent utilisé comme référence car son niveau d'expression est élevé dans le plasma et le sérum. De plus, le miR-16 est réputé relativement stable sur un large panel d'échantillons (Kroh et al., 2010). Pourtant, ce miARN est principalement dérivé des érythrocytes, et est significativement modifié en cas d'hémolyse ou d'anémie, des conditions assez fréquentes en pratique (Leidner et al., 2013). De plus, le miR-16 et le miR-103, également utilisé comme gène de référence et censé être stable dans différents types de tumeurs (Peltier et al., 2008), sont impliqués dans la pathogénèse du cancer du sein (Polytarchou et

al., 2012). Leur utilisation comme gènes de référence y est donc discutable. Comme alternative, l'équipe de Mestdagh a proposé d'utiliser le niveau d'expression de l'ensemble des miARN sur l'ensemble des échantillons. Cette technique permet en effet de réduire la variabilité (Mestdagh et al., 2009), mais aboutit cependant à des performances médiocres pour distinguer les sujets cancéreux des contrôles (Kodahl et al., 2014).

Afin d'établir une méthode de normalisation optimale, nous avons comparé la stabilité des miARN, pris individuellement ou en combinaison, à l'aide du programme GeNorm®. Cette analyse a montré que la moyenne du niveau d'expression des 50 miARN les plus exprimés constituait une référence aussi stable que la moyenne globale des miARN. Par contre, l'utilisation d'un plus petit nombre de miARN (40, 30, 20, 10, ...) ne permettait pas de conserver une stabilité satisfaisante. Nous avons donc utilisé la moyenne des 50 miARN les plus exprimés comme référence pour chaque étape de notre travail, même si cette méthode serait difficile à appliquer en routine, pour des raisons logistiques et financières. En procédant de la sorte, nous avons démontré que le miR-16 et le miR-103 circulants, souvent utilisés comme référence dans d'autres études (cf. Introduction, section 2.e., Tableau 5), étaient significativement diminués en cas de cancer du sein. Ces 2 miARN ne semblent donc pas de bons candidats pour une normalisation optimale. L'analyse a aussi révélé que le miR-484 était le plus stable de tous les miARN circulants sur l'ensemble des échantillons. Dans 2 études (Hu et al., 2012 et Dvinge et al., 2013), le miR-484 était également le miARN le plus stable dans le tissu tumoral de plusieurs milliers de cancer du sein. Il pourrait donc constituer un outil de normalisation intéressant pour les prochaines recherches portant sur les miARN dans le cancer du sein.

2. L'effet de la chimiothérapie sur les miARN

Nous avons montré que la NAC modifiait un grand nombre de miARN circulants. Il est cependant difficile de déterminer la cellule d'origine et le mécanisme par lequel la chimiothérapie pourrait interférer avec l'expression des miARN.

Le miR-34a et le miR-122 sont les 2 miARN dont le taux était le plus fortement augmenté après la NAC. La source de ces 2 miARN reste pourtant inconnue. Sur base de nos résultats, ils semblent avoir de multiples origines.

La tumeur elle-même pourrait produire et/ou excréter des miARN circulants sous l'effet de la chimiothérapie. Des études *in vitro* ont en effet montré que les cellules tumorales exposées à des agents cytotoxiques ou des radiations ionisantes ré-exprimaient le miR-34a (Tazawa et al., 2007; Ghawanmeh et al., 2011; John-Aryankalayil et al., 2012 et Stankevicius et al., 2013). Nous avons aussi observé une élévation du miR-34a tumoral après la NAC, chez les patientes en réponse partielle.

Cependant, le tissu tumoral ne peut pas être la seule source des miARN circulants induits par la NAC. Il existe différentes raisons à cela : (i) le miR-122 tumoral n'était pas augmenté après la NAC ; (ii) aucune corrélation n'a été identifiée entre les variations des miARN circulants et tumoraux et (iii) le miR-34a était majoré par l'effet de la chimiothérapie adjuvante, après le retrait de la tumeur. Le miR-34a et le miR-122 sont, tous les deux, hautement exprimés dans les tissus normaux (Hsu et al., 2008), qui pourraient aussi contribuer à la libération de miARN vu l'effet systémique de la chimiothérapie. Le miR-122, par exemple, est le miARN le plus abondant dans le foie (Hu et al., 2012). Nous avons recherché une concordance entre l'élévation du miR-122 et des enzymes de cytolysse hépatique (les transaminases) durant la chimiothérapie, mais nous n'avons trouvé aucune corrélation significative nous permettant d'étayer cette hypothèse.

Au niveau moléculaire, l'induction du miR-34a et du miR-122 par la chimiothérapie pourrait être expliquée via la voie p53. Le suppresseur de tumeur p53 est connu pour, sous l'effet de dommages de l'ADN, promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Plusieurs miARN sont impliqués dans la voie du p53, y compris le miR-34a et le miR-122, qui sont induits par celui-ci (He et al., 2007; Manfè et al., 2012). Ceci expliquerait pourquoi les anthracyclines, qui provoquent des cassures d'ADN et une activation du p53 (Lowe et al., 1994), entraînent une augmentation aussi intense des 2 miARN (**Figure 1**). Il a d'ailleurs été démontré, sur des lignées de cellules cancéreuses d'origine colique, que les anthracyclines augmentaient le taux du miR-34a uniquement lorsque le p53 était intact (Tazawa et al., 2007). D'un autre côté, aucune corrélation n'a pu être établie entre la diminution du miR-34a dans le cancer du sein et la présence d'une mutation p53 (Javeri et al., 2013). De plus, le miR-34a peut être induit par la chimiothérapie indépendamment du p53. Par exemple, dans le cancer de la vessie, les sels de platine

entraînent une élévation du miR-34a en agissant sur la méthylation de son promoteur plutôt que via le p53 (Li et al., 2013).

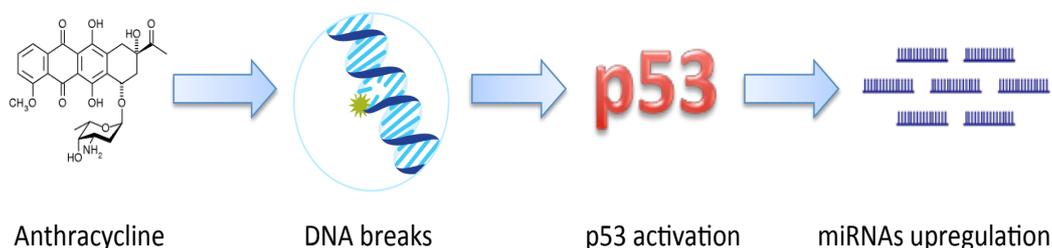


Figure 1. Mécanisme potentiel de l'induction du miR-34a et du miR-122 sous l'effet de la chimiothérapie, en particulier des anthracyclines.

3. Rôles biologiques des miARN circulants

L'objectif primaire de notre projet était d'identifier des biomarqueurs dans le cancer du sein et d'étudier leur régulation par la chimiothérapie. Toutefois, les progrès des dernières années nous ont montré que les miARN circulants ne sont pas seulement des biomarqueurs, mais aussi des acteurs de la pathologie humaine.

En dehors du miR-22* (ou miR-22-5p), les miARN de notre signature diagnostique sont tous impliqués dans différents processus oncogéniques. Leur niveau d'expression dans le tissu tumoral et/ou le sang périphérique avait d'ailleurs déjà été décrit comme perturbé en cas de cancer du sein. Dans le **Tableau 1**, nous avons résumé, pour les 8 miARN, leurs principaux rôles dans les voies oncogéniques et leur(s) dérégulation(s) dans le cancer du sein (Janaki Ramaiah et al., 2014; Büssing et al., 2008; Martello et al., 2010; Olive et al., 2013 et Tao et al., 2014). Nous y avons aussi ajouté les modifications du taux d'expression plasmatique observées dans l'**Article 1**. Seulement 4 de nos 8 miARN étaient dérégulés dans la même direction entre le tissu tumoral et le plasma. Une autre équipe avait déjà démontré que les miARN modifiés au niveau systémique ne le sont pas forcément au niveau tumoral, et vice versa (Zhu et al., 2014). Comme nous n'avons pas mesuré nos 8 miARN à l'intérieur des tumeurs, la composition en miARN de notre signature ne nous permet pas d'établir des hypothèses plausibles sur leur implication biologique dans la cancérogénèse du tissu mammaire.

miARN	Fonctions	Expression dans le tissu du cancer du sein	Expression dans le plasma en cas de cancer du sein
let-7i-5p	Régulent la balance entre la prolifération et la différenciation (<i>stemness regulators</i>)	↓	↓
let-7d-5p		↓	↓
miR-103a-3p	Régulent le métabolisme lipidique et favorise l'instabilité génomique	↑	↓
miR-107		↑	↓
miR-148a-3p	Empêche la tumeur d'échapper au système immunitaire	↓	↑
miR-19b-3p	Active la voie Akt/mTOR et favorise la survie cellulaire	↑	↑
miR-22-5p	Pas de cible validée	Inconnu	Pas de changement
miR-16-5p	Contrôle la progression dans le cycle cellulaire en ciblant les CDK	↓	↑

Tableau 1. Les 8 miARN de la signature diagnostique avec leurs principales fonctions et leur(s) dérégulation(s) dans le cancer du sein (**Article 1**; Janaki Ramaiah et al., 2014; Büssing et al., 2008; Martello et al., 2010; Olive et al., 2013 et Tao et al., 2014).

Suite à nos résultats dans les **Articles 2 et 3**, plusieurs questions ont inévitablement émergé : à quoi peuvent servir les miARN circulants induits par la chimiothérapie ? Sont-ils simplement libérés, comme des débris, par les cellules nécrotiques ? Ou sont-ils activement et spécifiquement sécrétés par les cellules sous l'action des agents cytotoxiques afin d'obtenir un effet à distance ?

Le miR-34a et le miR-122 sont régulièrement décrits comme des miARN suppresseurs de tumeur. Afin de ralentir la progression tumorale, ils ciblent des oncogènes, comme le Bcl-2, le N-Myc ou le E2F3 pour le miR-34a (Hermeking, 2010) et la voie PI3K/Akt pour le miR-122 (Manfè et al., 2012). Plusieurs données cliniques vont dans le sens d'un rôle anti-tumoral de ces 2 miARN. D'abord, leur niveau d'expression est diminué dans le tissu tumoral comparé aux tissus sains (Peurala et al., 2011; Wang et al., 2010 et Javeri et al., 2013), mais également dans le

plasma de nos patientes avec un cancer du sein, comparé à celui des femmes saines (**Article 2**). Ensuite, une diminution du miR-34a tumoral durant la NAC a été observée chez la seule patiente avec une mauvaise réponse à la chimiothérapie et une rechute métastatique précoce.

En 2012, Li et al. ont traité des souris porteuses d'un cancer du sein avec le miR-34a encapsulé dans des nanoparticules lipidiques. Le traitement a induit, par rapport aux contrôles, une régression significative de la masse tumorale et une survie prolongée, prouvant l'effet systémique du miARN (Li et al., 2012). Nous pourrions donc imaginer que, via leur action anti-tumorale, le miR-34a et le miR-122 induits par la NAC préviennent l'apparition de métastases et participent à l'impact bénéfique de la chimiothérapie sur l'évolution de la maladie.

Parmi les miARN circulants induits par la chimiothérapie, le miR-503 a aussi attiré notre attention. Son taux était augmenté après la NAC et ce miARN était également étudié dans le laboratoire du Docteur Ingrid Struman (GIGA-Cancer, Molecular Angiogenesis Laboratory, Université de Liège). Son équipe a pu démontrer, *in vitro*, que la chimiothérapie induisait la libération, par les cellules endothéliales, d'une importante quantité de miR-503. Via les exosomes, le miR-503 transitait jusqu'aux cellules tumorales pour inhiber leur prolifération et leur capacité d'invasion (**Figure 2**, Bovy et al., 2015, voir Annexes, **Article 7**). Ce modèle, parmi d'autres (Mathivanan et al., 2010 et Turchinovich et al., 2013), a contribué à l'idée que les miARN circulants ne sont pas uniquement des biomarqueurs passifs dans le cancer du sein, mais également des acteurs de l'effet systémique de la chimiothérapie

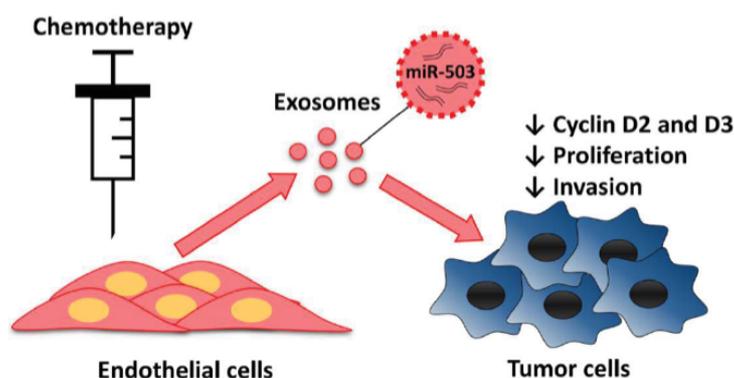


Figure 2. Les cellules endothéliales exposées à la chimiothérapie libèrent plus d'exosomes enrichis en miR-503. Ces exosomes induisent une diminution de la prolifération et de l'invasion tumorale en inhibant les cyclines D2 et D3 (Bovy et al., 2015, voir Annexes, **Article 7**).

Sur le plan cardiaque, les miARN induits par la chimiothérapie jouent probablement aussi un rôle. Le miR-126-3p est enrichi dans les cellules endothéliales et favorise l'angiogenèse (Wang et al., 2008). Son élévation sous l'effet de la chimiothérapie pourrait donc être une réponse au stress cellulaire et à l'effet anti-angiogénique de celle-ci (Luengo-Gil et al., 2015). Le miR-199a, quant à lui, promeut la régénération des cardiomyocytes et la récupération de la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde (Eulalio et al., 2012). Les cardiomyocytes pourraient donc le libérer afin qu'il favorise la régénération cardiaque après l'exposition aux anthracyclines. Enfin, Boon et al. ont démontré que le miR-34a était impliqué dans les altérations de la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde, en provoquant un raccourcissement des télomères dans les cardiomyocytes (Boon et al., 2013). L'élévation du miR-34a dans les cardiomyocytes est d'ailleurs un événement précoce suite à l'exposition aux anthracyclines (Desai et al., 2014). Le miR-34a pourrait ainsi participer à la pathophysiologie de la CRCD.

4. Perspectives

Concernant la signature diagnostique, celle-ci mériterait une validation multicentrique. Néanmoins, nous aimerions pouvoir nous affranchir du processus de normalisation, long et coûteux, avant d'envisager la mesure des 8 miARN sur une large population. Les nouvelles techniques de PCR, comme la ddPCR (*droplet digital PCR*), pourraient nous permettre de contourner ce problème. Cette technique reste cependant difficilement accessible à l'heure actuelle.

Le test diagnostique a également été évalué sur une cohorte de femmes rwandaises, comprenant des patientes atteintes d'un cancer du sein et des femmes saines. Via cette étude, nous aimerions déterminer si notre signature est applicable sur une autre ethnie. Nous aimerions aussi savoir si les miARN circulants dérégulés en cas de cancer du sein sont différents dans une population africaine par rapport à une population européenne.

Le recrutement des patientes bénéficiant d'une NAC se poursuit. Nous avons, pour le moment, une centaine de patientes avec un prélèvement réalisé avant la chimiothérapie et après 1 ou 2 cycles d'anthracyclines. Nous espérons, avec ces données, pouvoir dessiner une signature prédictive de la réponse tumorale finale à la NAC. Nous

proposons également à ces patientes un suivi cardiologique rapproché, en collaboration avec l'équipe de cardiologie du CHU de Liège. De cette façon, nous espérons pouvoir détecter efficacement nos CRCd et approfondir notre exploration des biomarqueurs cardiaques.

De par sa visée translationnelle, notre projet s'est peu investi dans l'exploration du rôle biologique des miARN étudiés. Comme illustré ci-dessus, il a cependant permis de soulever un certain nombre d'hypothèses et de dessiner des voies de recherche futures.

Finalement, ces dernières années nous ont apporté de nombreuses avancées dans le domaine des biopsies liquides dans le cancer. Par exemple, la recherche de mutations dans l'ADN libre circulant (*cell-free DNA*), comme l'étude de sa méthylation, pourrait nous aider à mieux capturer l'hétérogénéité des tumeurs. Il serait remarquable que, en associant les informations livrées par plusieurs biomarqueurs circulants, nous arrivions à améliorer la valeur diagnostique, pronostique et prédictive, de chacun d'eux.

5. Conclusion

Ce travail a fait naître plus de questions que véritablement apporter de réelles réponses. Il m'a cependant ouvert les yeux sur la complexité des techniques de laboratoire et sur les difficultés de mise au point d'un test applicable en pratique courante. Il m'a aussi permis d'apprendre à analyser les articles de recherche avec un œil critique.

Dans le domaine des biomarqueurs, les efforts sont notoires. Ceci n'empêche que la route sera encore longue avant l'identification de biomarqueurs assez fiables pour nous guider dans la prise en charge du cancer du sein. Misons sur l'accélération des progrès scientifiques au cours des prochaines années pour espérer que des nouvelles formes de dépistage seront rapidement disponibles pour nos patientes.

Références

A

Akat KM, Moore-McGriff D, Morozov P, Brown M, Gogakos T, Da Rosa JC et al. Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *PNAS*. 2014;111:11151-6.

Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol*. 2008;26(20):3324-30.

Andersson Y, Frisell J, Sylvan M, de Boniface J, Bergkvist L. Breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes. *J Clin Oncol*. 2010;28(17):2868-73.

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003;72(5):1117-30.

Armstrong GT, Plana JC, Zhang N, Srivastava D, Green DM, Ness KK, et al. Screening adult survivors of childhood cancer for cardiomyopathy: comparison of echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging. *J Clin Oncol*. 2012;30(23):2876-84.

Arpino G, Laucirica R, Elledge RM. Premalignant and In Situ Breast Disease: Biology and Clinical Implications. *Ann Intern Med*. 2005;143:446-57.

Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9:16-32.

B

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.

Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet.* 2012;379(9816):633-40.

Bastiaannet E, Liefers GJ, de Craen AJ, Kuppen PJ, van de Water W, Portielje JE et al. Breast cancer in elderly compared to younger patients in the Netherlands: stage at diagnosis, treatment and survival in 127,805 unselected patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;124(3):801-7.

Beral V, Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet.* 2003;362:419-27.

Bleyer A, Welch HG. Effect of Three Decades of Screening Mammography on Breast-Cancer Incidence. *N Engl J Med.* 2012;367:1998-2005.

Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature.* 2013;495(7439):107-10.

Boukerroucha M, Josse C, ElGuendi S, Boujemla B, Frères P, Marée R et al. Evaluation of BRCA1-related molecular features and microRNAs as prognostic factors for triple negative breast cancers. *BMC Cancer.* 2015;755.

Bovy N, Blomme B, Frères P, Dederen S, Nivelles O, Lion M et al. Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer. *Oncotarget.* 2015;6:10253-66.

Büssing I, Slack FJ, Großhans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med.* 2008;14:400-9.

C

Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A, Tricca A, Civelli M, Lamantia G et al. Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *J Am Coll Cardiol*. 1999;36(2):517-22.

Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo N, Boeri M, Lamantia G et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation*. 2004;109(22):2749-54.

Challagundla KB, Wise PM, Neviani P, Chava H, Murtadha M, Xu T et al. Exosome-mediated transfer of microRNAs within the tumor microenvironment and neuroblastoma resistance to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(7):djv135.

Chan M, Liaw CS, Ji SM, Tan HH, Wong CY, Thike AA et al. Identification of circulating microRNA signatures for breast cancer detection. *Clin Cancer Res*. 2013;19:4477-87.

Chang S, Wang RH, Akagi K, Kim KA, Martin BK, Cavallone L et al. Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. *Nat Med*. 2011;17(10):1275-82.

Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5697-704.

Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008;54(3):482-90.

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;26:1533-46.

Coglianesi EE, Larson MG, Vasan RS, Ho JE, Ghorbani A, McCabe EL et al. Distribution and Clinical Correlates of the Interleukin Receptor Family Member Soluble ST2 in the Framingham Heart Study. *Clinical Chemistry*. 2012;58:1673-81.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: Collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 2001;358 :1389-99.

Colleoni M, Sun Z, Price KN, Karlsson P, Forbes JF, Thürlimann B et al. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *J Clin Oncol*. 2016;34(9):927-35.

Connor Y, Tekleab S, Nandakumar S, Walls C, Tekleab Y, Husain A et al. Physical nanoscale conduit-mediated communication between tumour cells and the endothelium modulates endothelial phenotype. *Nature Commun*. 2015;6:8671.

Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* ed 2005. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.7.1, <http://www.wormbook.org>.

Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Walmark N et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014;384(9938):164-72.

Cortez MA, Ivan C, Valdecanas D, Wang X, Peltier HJ, Ye Y et al. PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *J Natl Cancer Inst*. 2015;108(1):djv303.

Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. Two Decades After BRCA : Setting Paradigms in Personalized Cancer Care and Prevention. *Science*. 2014;343:1466-70.

Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer*. 2013;132(7):1602-12.

Cuppone F, Bria E, Verma S, Pritchard KI, Gandhi S, Carlini P et al. Do adjuvant aromatase inhibitors increase the cardiovascular risk in postmenopausal women with early breast cancer? Meta-analysis of randomized trials. *Cancer*. 2008;112(2):260-7.

Curigliano G, Cardinale D, Suter T, Plataniotis G, de Azambuja E, Sandri MT et al. Cardiovascular toxicity induced by chemotherapy, targeted agents and radiotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.* 2010;21(5):v277-82.

D

Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet.* 2011;378(9804):1707-16.

Darby SC, Ewertz M, McGale P, Bennet AM, Blom-Goldman U, Brønnum D et al. Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(11):987-98.

Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011;378(9793):771-84.

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. *Lancet.* 2013;381(9869):805-16.

Dawood S, Broglio K, Ensor J, Hortobagyi GN, Giordano SH. Survival differences among women with *de novo* stage IV and relapsed breast cancer. *Ann Oncol.* 2010;21(11):2169-74.

Desai VG, C Kwekel J, Vijay V, Moland CL, Herman EH, Lee T et al. Early biomarkers of doxorubicin-induced heart injury in a mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;281:221-9.

Donker M, van Tienhoven G, Straver ME, Meijnen P, van de Velde CJ, Mansel RE et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):1303-10.

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. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(22):1656-64.

Dowsett M, Forbes JF, Bradley R, Ingle J, Aihara T, Bliss J et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet.* 2015;386(10001):1341-52.

Dvinge H, Git A, Gräf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A et al. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature.* 2013;497(7449):378-82.

E

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403-10.

Ejlertsen B, Jensen MB, Rank F, Rasmussen BB, Christiansen P, Kroman N et al. Population-based study of peritumoral lymphovascular invasion and outcome among patients with operable breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):729-35.

Esserman LJ, Shieh Y, Rutgers EJ, Knauer M, Retèl VP, Mook S et al. Impact of mammographic screening on the detection of good and poor prognosis breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(3):725-34.

Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell.* 2008;132(1):9-14.

Eulalio A, Mano M, Ferro MD, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature.* 2012;492:376-81.

Ewer MS, Lippman SM. Type II Chemotherapy-Related Cardiac Dysfunction: Time to Recognize a New Entity. *J Clin Oncol.* 2005;23(13):2900-2.

F

Francis PA, Regan MM, Fleming GF, Láng I, Ciruelos E, Bellet M et al. Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(5):436-46.

Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC, Perry MC. Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2005;23(30):7685-96.

Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 2015;17(2):183-94.

Frères P, Collignon J, Gennigens C, Scagnol I, Rorive A, Barbeaux A et al. Le cancer du sein « triple négatif ». *Rev Med Liège*. 2010;65:120-6.

Frères P, Gonne E, Collignon J, Giot JB, Gennigens C, Jerusalem G. Prise en charge de la neutropénie fébrile chez le patient cancéreux. *Rev Med Liège*. 2015;70(4):195-200.

Frères P, Josse C, Bovy N, Boukerroucha M, Struman I, Bours V, Jerusalem G. Neoadjuvant chemotherapy induces miR-34a and miR-122 expression. *J Cell Physiol*. 2015;230:473-81.

Frères P, Lousberg L, Jerusalem G. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors in breast cancer treatment. *Belgian Journal of Medical Oncology*. 2016;10:132-8.

Frères P, Poncin A, Moonen M, Josse C, Oury C, Bours V, Lancellotti P, Jerusalem G. La cardiotoxicité des traitements anti-cancéreux. *Rev Med Liège*. 2016;71(9):382-7.

Frères P, Wenric S, Boukerroucha M, Fasquelle C, Thiry J, Bovy N et al. Circulating micro-RNA-based screening tool for breast cancer. *Oncotarget*. 2015;7(5):10253-66.

Frères P, Wenric S, Poncin A, Bours V, Josse C, Jerusalem G. Les micro-ARN dans le cancer du sein. *Onco-hemato*. 2016;10(2):44-8.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19(1):92-105.

Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of Plasma miRNAs in Congestive Heart Failure. *Circ J.* 2011;75:336-40.

G

Gasparini G, Pozza F, Harris AL. Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:1206-1219.

Germanakis I, Anagnostatou N, Kalmanti M. Troponins and natriuretic peptides in the monitoring of anthracycline cardiotoxicity. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;51(3):327-33.

Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(26):2733-43.

Ghawanmeh T, Thunberg U, Castro J, Murray F, Laytragoon-Lewin N. miR-34a expression, cell cycle arrest and cell death of malignant mesothelioma cells upon treatment with radiation, docetaxel or combination treatment. *Oncology.* 2011;81(5-6):330-5.

Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Porta VG, Semiglazov V, Lluch A et al. Phase III Trial Evaluating the Addition of Paclitaxel to Doxorubicin Followed by Cyclophosphamide, Methotrexate, and Fluorouracil, As Adjuvant or Primary Systemic Therapy: European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(15):2474-81.

Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(1):25-32.

Gion M, Mione R, Leon AE, Lüftner D, Molina R, Possinger K, Robertson JF. CA27.29: a valuable marker for breast cancer management. A confirmatory multicentric study on 603 cases. *Eur J Cancer.* 2001;37:355-63.

Références

Goldhirsch A, Gelber RD, Piccart-Gebhart MJ, de Azambuja E, Procter M, Suter TM et al. 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2013;382(9897):1021-8.

Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2012;14:147-54.

Goss PE, Ingle JN, Pritchard KI, Robert NJ, Muss H, Gralow J et al. Extending Aromatase-Inhibitor Adjuvant Therapy to 10 Years. *N Engl J Med*. 2016;375(3):209-19.

Gøtzsche PC, Jørgensen KJ. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;6:CD001877.

Gruson D, Lepoutre T, Ahn SA, Rousseau MF. Increased soluble ST2 is a stronger predictor of long-term cardiovascular death than natriuretic peptides in heart failure patients with reduced ejection fraction. *Int J Cardiol*. 2014;172(1):e250-2.

Guo L, Zhao Y, Yang S, Cai M, Wu Q, Chen F. Genome-wide screen for aberrantly expressed miRNAs reveals miRNA profile signature in breast cancer. *Mol Biol Rep*. 2013;40(3):2175-86.

Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Säve-Söderborgh J, Anbazhagan R et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1992;10(7):1049-56.

H

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(7):e48-72.

Harris JR. *Diseases of the Breast*, Fifth edition. Philadelphia 2014:Lippincott Williams and Wilkins.

Références

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(33):5287-312.

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522-31.

He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447(7148):1130-4.

Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 Differentiates Breast Cancer from Other Malignancies and Is a Potential Biomarker for Detecting Noninvasive and Early Stage Disease. *The Oncologist*. 2010;15:673-82.

Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2010;17(2):193-9.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.

Hsu SD, Chu CH, Tsou AP, Chen SJ, Chen HC, Hsu PW et al. miRNAMap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D165-9.

Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell*. 2012;3(5):364-71.

Hu Z, Dong J, Wang LE, Ma H, Liu J, Zhao Y et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*. 2012;33(4):828-34.

J

Janaki Ramaiah M, Lavanya A, Honarpisheh M, Zarea M, Bhadra U, Bhadra MP. MiR-15/16 complex targets p70S6 kinase 1 and controls cell proliferation in MDA- MB-231 breast cancer cells. *Gene*. 2014;552:255-64.

Javeri A, Ghaffarpour M, Taha MF, Houshmand M. Downregulation of miR-34a in breast tumors is not associated with either p53 mutations or promoter hypermethylation while it correlates with metastasis. *Med Oncol*. 2013;30(1):413.

John-Aryankalayil M, Palayoor ST, Makinde AY, Cerna D, Simone CB, Falduto MT et al. Fractionated radiation alters oncomir and tumor suppressor miRNAs in human prostate cancer cells. *Radiat Res*. 2012;178(3):105-17.

Jung EJ, Santarpia L, Kim J, Esteva FJ, Moretti E, Buzdar AU et al. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer*. 2012;118(10):2603-14.

K

Kasinski AL, Kelnar K, Stahlhut C, Orellana E, Zhao J, Shimer E et al. A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2015;34(27):3547-55.

Kodahl AR, Lyng MB, Binder H, Cold S, Gravgaard K, Knoop AS, Ditzel HJ. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER- positive early-stage breast cancer: A case control study. *Mol Oncol*. 2014;8:874–83.

Kohn L, Mambourg F, Robays J, Albertijn M, Janssens J, Hoefnagels K et al. Dépistage du cancer du sein: messages en support d'un choix informé – Synthèse. Good Clinical Practice (GCP). Bruxelles : Centre Fédéral d'Expertise des Soins de Santé (KCE). 2014. KCE Reports 216Bs. D/2014/10.273/02.

Références

Kong W, He L, Richards EJ, Challa S, Xu CX, Permeth-Wey J et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 2014;33(6):679-89.

Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2087-92.

Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem*. 2013;288(15):10849-59.

Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(10):927-33.

Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. 2010;50(4):298-301.

Krop IE, Kim SB, González-Martín A, LoRusso PM, Ferrero JM, Smitt M et al. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(7):689-99.

Kremer LC, van Dalen EC, Offringa M, Ottenkamp J, Voûte PA. Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study. *J Clin Oncol*. 2000;19(1):191-6.

Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H, Jin Z, Wang X, Chang TC et al. miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature*. 2014;512(7515):431-5.

L

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Sciences*. 2001;294(5543):853-8.

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;141(5):672-5.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.

Leidner RS, Li L, Thompson CL. Dampening enthusiasm for circulating microRNA in breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e57841.

Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93(9):1046-52.

Li H, Yu G, Shi R, Lang B, Chen X, Xia D et al. Cisplatin-induced epigenetic activation of miR-34a sensitizes bladder cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer*. 2014;13:8.

Li L, Xie X, Luo J, Liu M, Xi S, Guo J et al. Targeted expression of miR-34a using the T-VISA system suppresses breast cancer cell growth and invasion. *Mol Ther*. 2012;20(12):2326-34.

Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, Goorin AM, Sallan SE, Sanders SP et al. Female sex and drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *N Engl J Med*. 1995;332(26):1738-43.

Liu B, Su F, Li Y, Qi X, Liu X, Liang W et al. Changes of serum miR34a expression during neoadjuvant chemotherapy predict the treatment response and prognosis in stage II/III breast cancer. *Biomed Pharmacother*. 2017;88:911-7.

Références

Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med.* 2011;17(2):211-5.

Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science.* 1994;266(5186):807-10.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-8.

Luengo-Gil G, González-Billalabeitia E, Chaves-Benito A, Martínez EG, Garre EG, Vicente V, la Peña de FA. Effects of conventional neoadjuvant chemotherapy for breast cancer on tumor angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;151:577-87.

Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB 3rd, Bodurka DC, Burstein HJ et al. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7703-20.

Lyng MB, Kodahl AR, Binder H, Ditzel HJ. Prospective validation of a blood-based 9-miRNA profile for early detection of breast cancer in a cohort of women examined by clinical mammography. *Mol Oncol.* 2016;10(10):1621-6.

M

Maisel A. B-type natriuretic peptide levels: diagnostic and prognostic in congestive heart failure: what's next ? *Circulation.* 2002;105(20):2328-31.

Manfè V, Biskup E, Rosbjerg A, Kamstrup M, Skov AG, Lerche CM et al. miR-122 regulates p53/Akt signalling and the chemotherapy-induced apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma. *PLoS One.* 2012;7(1):e29541.

Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, Dewar JA, Thompson SG, Wilcox M. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. *Br J Cancer.* 2013;108(11):2205-40.

Références

Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S et al. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*. 2010;141:1195-207.

Matamala N, Vargas MT, González-Cámpora R, Miñambres R, Arias JI, Menéndez P et al. Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection. *Clin Chem*. 2015;61(8):1098-106.

Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2010;73(10):1907-20.

McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, Ewertz M, Ewertz M et al. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet*. 2014;383(9935):2127-35.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast Cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000;321:624-8.

Meinardi MT, Gietema JA, van Veldhuisen DJ, van der Graaf WT, de Vries EG, Sleijfer DT. Long-term chemotherapy-related cardiovascular morbidity. *Cancer Treat Rev*. 2000;26(6):429-47.

Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*. 2009;10(6):R64.

Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;2:CD005002.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(30):10513-8.

Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V et al. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;4:CD006243.

N

Ng EK, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CP, Ma ES. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PLoS One.* 2013;8(1):e53141.

O

O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD et al. Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clin Cancer Res.* 2010;16(24):6100-10.

Olive V, Sabio E, Bennett MJ, De Jong CS, Biton A, McGann JC, Greaney SK, Sodir NM, Zhou AY, Balakrishnan A, Foth M, Luftig MA, Goga A, et al. A component of the mir-17-92 polycistronic oncomir promotes oncogene-dependent apoptosis. *Elife.* 2013;2:e00822.

Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, Maaten ter JM, Valente MAE, Liu LCY et al. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2016;18:414-23.

P

Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J.* 2009;15(6):593-602.

Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Vaduc D, Vickery T et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1160-7.

Pascual-Figal DA, Ordoñez-Llanos J, Tornel PL, Vázquez R, Puig T, Valdés M et al. Soluble ST2 for predicting sudden cardiac death in

Références

patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23):2174-9.

Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008;14(5):844-52.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. Molecular portrait of human breast tumors. *Nature*. 2000;406:742-52.

Perry N, Broeders M, de Wolf C, Tömberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis, Fourth Edition-summary document. *Ann Oncol*. 2008;19(4):614-22.

Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*. 2012;379:432-44.

Peurala H, Greco D, Heikkinen T, Kaur S, Bartkova J, Jamshidi M et al. MiR-34a expression has an effect for lower risk of metastasis and associates with expression patterns predicting clinical outcome in breast cancer. *PLoS One*. 2011;6(11):e26122.

Pisano ED, Gatsonis C, Hendrick E, Yaffe M, Baum JK, Acharyya S et al. Diagnostic Performance of Digital versus Film Mammography for Breast-Cancer Screening. *N Engl J Med*. 2005;353:1773-83.

Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, Hugh JC, Mastropasqua MG et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(24):1897906.

Polytarchou C, Iliopoulos D, Struhl K. An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(36):14470-5.

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

Powell SN, Kachnic LS. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene*. 2003;22:5784-91.

Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, Ashfield A, Ogston S, Dewar JA, Thompson AM. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer*. 2014;110(3):565-72.

R

Riggs BL, Hartmann LC. Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2003; 348:618-29.

Rosselli Del Turco M, Palli D, Cariddi A, Ciatto S, Pacini P, Distante V. Intensive diagnostic follow-up after treatment of primary breast cancer. A randomized trial. National Research Council Project on Breast Cancer follow-up. *JAMA*. 1994;271(20):1593-7.

Roth C, Rack B, Müller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12:R90.

S

Sahlberg K, Bottai G, Naume B, Burwinkel B, Calin GA, Børresen-Dale AL, Santarpia L. A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triple-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2015;21(5):1207-14.

Sandhu H, Maddock H. Molecular basis of cancer-therapy-induced cardiotoxicity: introducing microRNA biomarkers for early assessment of subclinical myocardial injury. *Clin Sci*. 2014;126(6):377-400.

Sardanelli F, Boetes C, Borisch B, Decker T, Federico M, Gilbert FJ et al. Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. *Eur J Cancer*. 2010;46:1296-316.

Références

Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E et al. Primary breast cancer : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26(5):v8-30.

Seronde MF, Vausort M, Gayat E, Goretti E, Ng LL, Squire IB et al. Circulating microRNAs and Outcome in Patients with Acute Heart Failure. *PLoS One.* 2015;10:e0142237.

Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):212-36.

Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirincione CT, Tolaney SM et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol.* 2015;33(1):13-21.

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 USA.* 2001;98:10869-74.

Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(21):2005-14.

Stankevics L, Almeida da Silva AP, Ventura Dos Passos F, Dos Santos Ferreira E, Menks Ribeiro MC, G David M et al. MiR-34a is up-regulated in response to low dose, low energy X-ray induced DNA damage in breast cells. *Radiat Oncol.* 2013;8:231.

Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(8):724-34.

T

Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1989;7(8):1120-8.

Tao S, He H, Chen Q, Yue W. GPER mediated estradiol reduces miR-148a to promote HLA-G expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;451:74-8.

Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(39):15472-7.

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

Théberge I, Chang S-L, Vandal N, Daigle J-M, Guertin M-H, Pelletier E, Brisson J. Radiologist interpretive volume and breast cancer screening accuracy in a Canadian organized screening program. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106:djt461.

Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep.* 2011;3:15.

Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p As a Circulating Biomarker for Heart Failure. *Circ Res.* 2010;106:1035-9.

Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(11):460-5.

Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function ? *Front Genet.* 2013;4:119.

V

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.

van Maaren MC, de Munck L, de Bock GH, Jobsen JJ, van Dalen T, Linn SC et al. 10 year survival after breast-conserving surgery plus radiotherapy

Références

compared with mastectomy in early breast cancer in the Netherlands: a population-based study. *Lancet Oncol.* 2016;17(8):1158-70.

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

Vogelsang TW, Jensen RJ, Hesse B, Kjaer A. BNP cannot replace gated equilibrium radionuclide ventriculography in monitoring of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Int J Cardiol.* 2008;124(2):193-7.

Volinia S, Galasso M, Sana ME, Wise TF, Palatini J, Huebner K, Croce CM. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(8):3024-9.

Volinia S, Croce CM. Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(18):7413-7.

von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(7):747-56.

von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, Zardavas D, Benyunes M, Viale G et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(2):122-31.

W

Wang F, Zheng Z, Guo J, Ding X. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol Oncol.* 2010;119(3):586-93.

Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA et al. The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev Cell.* 2008;15:261-71.

Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010;56(11):1733-41.

Références

Weinberg EO, Shimpo M, Hurwitz S, Tominaga S-I, Rouleau J-L, Lee RT. Identification of Serum Soluble ST2 Receptor as a Novel Heart Failure Biomarker. *Circulation*. 2003;107:721-6.

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

White DH. Pathobiology of Troponin Elevations. Do Elevations Occur With Myocardial Ischemia as Well as Necrosis ? *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(24):2406-8.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62.

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31:3997-4013.

Wu Q, Wang C, Lu Z, Guo L, Ge Q. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection. *Clin Chim Acta*. 2012;413(13-14):1058-65.

Wu X, Somlo G, Yu Y, Palomares MR, Li AX, Zhou W et al. De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer. *J Transl Med*. 2012;10:42.

X

Xu X, Zhang Y, Jasper J, Lykken E, Alexander PB, Markowitz GJ et al. MiR-148a functions to suppress metastasis and serves as a prognostic indicator in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(15):20381-94.

Y

Yaffe MJ, Mainprize JG. Risk of Radiation-induced Breast Cancer from Mammographic Screening. *Radiology*. 2011;258(1):98-105.

Yager JD, Davidson NE. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2006;354:270-82.

Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*. 2008;14(11):2348-60.

Z

Zeero S, Kim E, Zhu Y, Zhao JT, Sidhu SB, Robinson BG et al. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer*. 2014;14:200.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as onco genes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 2007;302:1-12.

Zhang L, Xu Y, Jin X, Wang Z, Wu Y, Zhao D et al. A circulating miRNA signature as a diagnostic biomarker for non-invasive early detection of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;154(2):423-34.

Zhang L, Zhang S, Yao J, Lowery FJ, Zhang Q, Huang WC et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*. 2015;527(7576):100-4.

Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS One*. 2010 29;5(10):e13735.

Zhu J, Zheng Z, Wang J, Sun J, Wang P, Cheng X et al. Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum. *Front Genet*. 2014;5:149.

LE CANCER DU SEIN «TRIPLE NÉGATIF»

P. FRERES (1), J. COLLIGNON (2), C. GENNIGENS (2), I. SCAGNOL (3), A. RORIVE (2), A. BARBEAUX (4), P.A. COUCKE (5), G. JÉRUSALEM (2)

RESUME : Le cancer du sein touche une femme sur huit dans les pays occidentaux. Son incidence a considérablement augmenté au cours de ces deux dernières décennies mais, en même temps, le niveau de mortalité spécifique est resté stable et a même diminué en Europe et aux États-Unis, notamment, grâce à l'apport de nouvelles armes thérapeutiques, aux changements dans l'utilisation du traitement hormonal substitutif à la ménopause et à un diagnostic plus précoce. Malgré cela, le cancer du sein reste la première cause de décès par cancer chez la femme de moins de 65 ans. Le cancer du sein «triple négatif», un sous-type représentant environ 10 % des cancers du sein, est caractérisé par l'absence de récepteurs hormonaux aux œstrogènes et à la progestérone et l'absence d'expression du facteur de croissance HER-2 en étude d'immunohistochimie. Ce type de cancer du sein est associé à un profil clinique défavorable avec un haut risque de rechute métastatique précoce. De plus, le cancer du sein «triple négatif» ne présente aucune cible thérapeutique propre et son pronostic est donc particulièrement mauvais. La définition de facteurs prédictifs de la réponse tumorale aux différents traitements et l'apport des thérapies ciblées sont deux pistes susceptibles d'améliorer la prise en charge et la survie des patients atteints par ce type de cancer extrêmement agressif.

MOTS-CLÉS : *Cancer du sein triple négatif - Facteurs pronostiques et prédictifs - Classification moléculaire - Cancer du sein basal-like - Traitements ciblés*

INTRODUCTION

Le cancer du sein est une maladie hétérogène tant du point de vue biologique que clinique. Cependant, les techniques d'immunohistochimie ont permis au clinicien de distinguer trois principaux types de cancer du sein : (1) ceux qui expriment les récepteurs aux œstrogènes (70 % des cas); (2) ceux qui expriment le facteur de croissance HER-2 (20 % des cas); et (3) les cancers du sein «triple négatifs» (10 % des cas).

Plus précisément, le cancer du sein dit «triple négatif» se trouve défini, d'une part, par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux aux œstrogènes, à la progestérone et de HER-2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2) et, d'autre part, est associé à un comportement particulièrement agressif (1-3).

- (1) Étudiant, 4^{ème} doctorat, Université de Liège.
 (2) Chef de Clinique, Service d'Oncologie Médicale, CHU de Liège.
 (3) Chef de Laboratoire, Service d'Anatomie pathologique, CHU de Liège.
 (4) Oncologue, Service d'Oncologie-Hématologie, CHR de la Citadelle.
 (5) Chef de Service, Service de Radiothérapie, CHU de Liège.

«TRIPLE NÉGATIF» BREAST CANCER

SUMMARY : In western countries, every woman out of eight will develop breast cancer. Over the last two decades, the incidence has considerably increased, but mortality has remained stable and begins to decrease in Europe and the United States, probably because of new therapy, changes in the use of hormone replacement therapy in postmenopausal women and early diagnosis. Breast cancer is still the first cause of death by cancer in woman under 65. « Triple negative » breast cancer, a subtype representing 10% of all breast cancers, is characterised by the absence of receptors to oestrogen, progesterone and no histochemical expression of HER-2 growth factor. This subtype carries a poor prognosis and a high incidence of early metastatic recurrence. Furthermore, no target therapy can be defined up to now in this subtype. Thus, identification of new target therapy and prediction of tumoral response to various treatments could help in the global understanding of patients affected by this particularly aggressive type of breast cancer.

KEYWORDS : *Triple negative breast cancer - Prognostic and Predictive factors - Molecular classification - Basal-like breast cancer - Target therapy*

Les études génétiques par microarrays ont permis, quant à elles, de classer les cancers du sein dans cinq groupes distincts. Parmi ces groupes, le cancer du sein basal-like présente un phénotype triple négatif de façon préférentielle, mais non exclusive (4).

Le cancer du sein «triple négatif» ne bénéficie actuellement d'aucun traitement ciblé et la seule thérapeutique systémique validée est la chimiothérapie. Malgré l'utilisation des schémas récents de chimiothérapie, le pronostic reste sombre (2, 4). Dans cet article, nous revoyons les données récentes de la littérature en ce qui concerne cette entité particulière afin de définir leurs implications dans la pratique clinique.

OBSERVATIONS CLINIQUES

CAS CLINIQUE N°1

Une patiente (D.C.) âgée de 29 ans, est prise en charge pour une néoplasie du sein droit dans les suites d'un allaitement. La lésion est stadifiée cT3N1M0 et la microbiopsie confirme le diagnostic de carcinome canalaire infiltrant peu différencié (grade III de Bloom) avec embolies lymphovasculaires. Les examens immunohistologiques complémentaires démontrent l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et de HER-2. La patiente bénéficie d'une chimiothé-

rapie néoadjuvante, à base d'anthracyclines et de taxanes. En raison d'une reprise évolutive sous traitement, elle subit une mastectomie radicale avec curage axillaire, qui met en évidence un résidu tumoral de 2 cm et l'absence d'envahissement des adénopathies axillaires prélevées. Elle bénéficie ensuite de la poursuite d'une chimiothérapie par anthracyclines, ainsi que d'une radiothérapie complémentaire. Deux ans après le diagnostic initial, un bilan de suivi chez la patiente asymptomatique met en évidence une carcinomatose pulmonaire avec multiples adénopathies métastatiques médiastinales et sus-claviculaires droites.

CAS CLINIQUE N°2

Une autre patiente (J.W.), âgée de 52 ans, bénéficie d'une prise en charge pour un cancer du sein droit. Elle subit une tumorectomie avec curage axillaire. Il s'agit d'un carcinome canalaire infiltrant de grade I selon Bloom. Le bilan d'extension est négatif (stade pT1bN0Mx). L'examen immunohistologique pour la recherche de facteurs pronostiques et prédictifs confirme un cancer du sein «triple négatif». À l'époque, la prise en charge complémentaire consiste en une radiothérapie et une curiethérapie. Quatre ans après le diagnostic initial, un nouveau bilan d'extension est réalisé en raison d'une élévation du marqueur tumoral CA 15,3 à la prise de sang. Le scanner thoracique démontre une vingtaine de lésions nodulaires infra-centimétriques disséminées dans les deux hémichamps pulmonaires sans adénopathies médiastinales.

Ces deux patientes ont été prises en charge au CHU de Liège dans le cadre d'un nouveau protocole thérapeutique associant un taxane et deux inhibiteurs de l'angiogénèse, le bévacizumab (Avastin®) et l'AMG 386. En ce qui concerne le premier cas, nous avons obtenu une réponse partielle avec l'apparition ultérieure de métastases cérébrales. La seconde patiente a présenté une réponse clinique et métabolique complète.

ÉPIDÉMIOLOGIE

Dans les pays occidentaux, le cancer du sein est le premier cancer de la femme en termes d'incidence et, en Belgique, il représente 35 % des cancers féminins. Cette maladie touche une femme sur huit, et une femme sur vingt-cinq en meurt. A partir de 20 ans, l'incidence augmente de façon exponentielle, jusqu'à l'âge de 60 ans. Au diagnostic, la moyenne d'âge est de 61 ans. Cette incidence est en constante augmentation chez la femme ménopausée, notamment suite à un dépistage de plus en plus efficace dans nos

pays. En Belgique, alors que 7.656 cas de cancer du sein ont été recensés en 2000, on a observé 9.405 cas en 2005 (5).

Alors que l'incidence est en augmentation, la mortalité globale du cancer du sein a reculé dans certains pays industrialisés (États-Unis, Australie, Allemagne,...), probablement grâce aux campagnes de dépistage par mammographie et à la performance des différentes armes thérapeutiques (6).

Le cancer du sein «triple négatif» représente quant à lui 10 à 17 % des cancers du sein (2). Ce pourcentage dépend du seuil de positivité des récepteurs hormonaux et de la technique de détection de HER-2. Par exemple, une tumeur mammaire est positive pour les récepteurs hormonaux si ceux-ci sont exprimés sur plus de 10% des cellules tumorales. Le rôle du pathologiste est donc primordial dans le diagnostic de la maladie et l'identification des cibles thérapeutiques. Le cancer du sein «triple négatif» touche plus spécifiquement les femmes jeunes de moins de 50 ans et d'origine africaine et américano-hispanique (7).

Dans la littérature, 57 % des femmes porteuses d'un cancer du sein associé à une mutation BRCA-1 présentent une tumeur de phénotype triple négatif. Cette association n'est pas retrouvée dans les cancers du sein associés au BRCA-2 (8) où, par contre, les tumeurs mammaires exprimant les récepteurs hormonaux sont plus fréquentes.

LES FACTEURS HISTO-PRONOSTIQUES

Les différents consensus internationaux, dont le plus récent est le consensus de St Gallen 2009 (9), ont identifié plusieurs facteurs pronostiques dans le cancer du sein : l'âge, la taille tumorale, l'atteinte ganglionnaire, l'infiltration lymphovasculaire, le degré de différenciation selon Bloom (grade I à III), la présence des récepteurs hormonaux aux œstrogènes et à la progestérone, et la surexpression de HER-2. Les facteurs histopronostiques, en particulier l'hormonosensibilité et le statut HER-2 de la tumeur, sont devenus les déterminants de l'attitude thérapeutique au détriment de l'ancienne classification TNM (10). Ils permettent une approche individualisée dans le traitement du cancer du sein en sélectionnant le traitement le plus efficace correspondant à un type particulier de cancer mammaire.

Ces facteurs pronostiques doivent cependant être affinés. En effet, le bénéfice du traitement n'est pas le même pour toutes les patientes et, ce, malgré des facteurs pronostiques identiques. A l'heure actuelle, il paraît important de définir

des facteurs prédictifs de la réponse tumorale à un traitement donné. Cette approche est particulièrement développée dans le cancer du sein, plus que dans les autres domaines de l'oncologie, et pourrait permettre de mieux individualiser les traitements. Malheureusement, il n'y a pas encore suffisamment de facteurs prédictifs connus pour orienter efficacement les choix thérapeutiques, qui se basent, alors davantage, sur les facteurs pronostiques (11, 12) (Tableau I).

DÉFINITION DES CANCERS DU SEIN «TRIPLE NÉGATIFS»

L'analyse immunohistochimique de ces tumeurs est caractérisée par l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone et l'absence de surexpression de HER-2.

L'étude d'expression génique par microarrays (ou méthode d'amplification de l'ADN) dans le cancer du sein a permis d'établir une classification moléculaire qui identifie cinq profils moléculaires distincts : les profils luminaux A et B où les récepteurs aux œstrogènes sont le plus souvent exprimés; le profil normal-like, le profil HER-2 et le profil basal-like. Ce dernier a particulièrement attiré l'attention car, le plus souvent, il n'exprime ni les récepteurs hormonaux, ni le facteur HER-2 et présente alors un phénotype triple négatif (4).

Le profil basal-like se définit par la présence des cytokératines 5/6 et 14/17 (CK, molécules de haut poids moléculaire exprimées dans les cellules basales de la glande mammaire normale) et de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor ou HER-1). Il concerne 15 % des carcinomes canaux et présente en général un grade histopronostique élevé. Si le profil basal-like a un phénotype triple négatif préférentiel (56 à 80 % des cas), il peut, cependant, exprimer faiblement les récepteurs hormonaux ainsi que HER-2. Les cancers du sein «triple négatifs» et basal-like ne sont donc pas des synonymes, mais présentent de

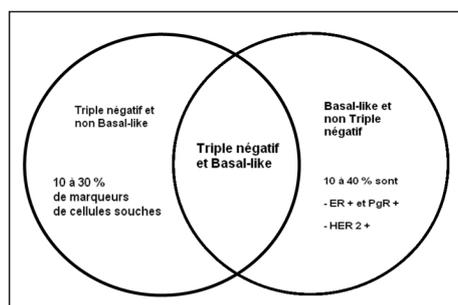


Figure 1. Comparaison entre les cancers du sein «triple négatif» et basal-like.

nombreux points communs au niveau épidémiologique, morphologique et clinique (2, 13-15).

Les implications pratiques de cette classification moléculaire sont multiples : définition d'une nouvelle taxonomie de cancer du sein, de nouveaux facteurs pronostiques et de facteurs prédictifs de la réponse aux différents traitements ainsi que l'identification des cibles moléculaires permettant le développement de nouveaux traitements ciblés (16) (Fig. 1).

DIAGNOSTIC DU CANCER DU SEIN «TRIPLE NÉGATIF»

IMAGERIE

A la mammographie, le cancer du sein «triple négatif» se présente, la plupart du temps, sous la forme d'une masse circonscrite sans microcalcifications et spiculations caractéristiques du cancer du sein classique. Cette particularité évoque un cancer agressif, à prolifération majeure sans carcinome canalaire *in situ* associé (17). La place de l'IRM doit encore être définie car elle pourrait diminuer le taux de faux négatif, mais se heurte à un problème de coût dans le cadre d'un dépistage de masse.

ANATOMOPATHOLOGIE

Sur le plan histologique, on retrouve essentiellement des carcinomes canaux de haut grade (grade 3 de Bloom dans 66 % des cas). Les caractéristiques tumorales sont celles d'un cancer agressif : architecture peu différenciée, figures mitotiques nombreuses, rapport nucléocytoplasmique important, noyaux irréguliers et hyperchromatiques. La masse tumorale refoule les tissus voisins et présente des zones de nécrose géographiques et souvent centrales (18).

TABLEAU I. RÉSUMÉ DES FACTEURS PRONOSTIQUES ET PRÉDICTIONNELS.

Facteurs	Pronostiques	Prédictifs
Atteinte ganglionnaire	oui	
Infiltration lymphovasculaire	oui	
Taille tumorale	oui	
Index Ki-67	oui	
Age	oui	
Récepteurs hormonaux	oui	oui
HER-2	oui	oui
Profil moléculaire	oui	oui

La taille tumorale moyenne est plus élevée dans le groupe des cancers du sein «triple négatifs» que dans les autres groupes (> 2 centimètres de diamètre au diagnostic dans 2/3 des cas) (1).

CLINIQUE

Au point de vue clinique, le cancer du sein «triple négatif» se caractérise par un profil de récurrence particulier. Le risque de rechute augmente au cours des deux premières années pour atteindre un pic après 2-3 ans, puis diminue au cours des cinq années suivantes. La majorité des patientes qui ne présentent pas de récurrence après huit ans d'évolution sont guéries contrairement aux autres types de cancer du sein où le risque de récurrence persiste même tardivement. En cas de récurrence, la médiane de survie est de 9 mois, contre 20 mois pour les autres types de tumeur (1), avec une réponse moindre à la chimiothérapie.

La récurrence à distance constitue la majorité des cas, sans récurrence locale préalable (1). Dans le cancer de type basal-like, par rapport aux autres groupes de cancer du sein, le risque de métastases à distance est moins important au niveau des os et du foie (15 % *versus* 25 % à 5 ans) alors qu'il augmente au niveau du cerveau (15 % *versus* 7% à 5 ans) et des poumons (27% *versus* 23 % à 5 ans) (2, 19).

Le risque de récurrence locale est mal défini puisqu'il varie selon les études publiées (20, 21). On remarque tout de même que ces récurrences sont plus précoces dans le cancer du sein «triple négatif» que dans les autres types de cancer du sein. L'absence d'expression de CK19 est associée à un plus haut risque de récurrence locale (22).

Le risque de métastases ganglionnaires est, lui aussi, mal défini (1, 15, 20). Cependant, il n'existe aucune corrélation entre la taille de la tumeur et le risque d'envahissement ganglionnaire pour les tumeurs de moins de cinq centimètres de diamètre. Cette caractéristique est bien connue pour le cancer du sein associé au BRCA-1 (1, 23), qui, généralement, s'apparente au cancer du sein «triple négatif».

PRONOSTIC

Le décès survient en majorité au cours des cinq premières années (77 % des cas), particulièrement, lors de l'absence de réponse pathologique complète (pCR) après le traitement néoadjuvant. La survie médiane est de 4,2 ans. Tous les décès causés par le cancer du sein «triple négatif» surviennent endéans les 10 ans après le diagnostic (1). Le pronostic du cancer du sein «triple négatif» est péjoratif, même pour les petites tumeurs pT1aN0 et pT1bN0 (Fig. 2).

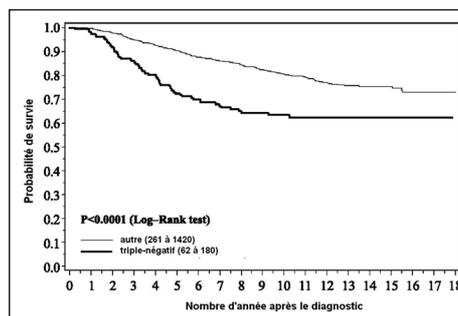


Figure 2. Probabilité de survie dans le cancer du sein «triple négatif» comparativement aux autres types de cancers du sein (1).

tif» est péjoratif, même pour les petites tumeurs pT1aN0 et pT1bN0 (Fig. 2).

LE TRAITEMENT ACTUEL

En dehors de la chirurgie et de la radiothérapie, la chimiothérapie est le seul traitement systémique validé dans le cancer du sein «triple négatif». Etant donné leur index mitotique élevé, ces tumeurs sont davantage chimiosensibles, particulièrement aux anthracyclines et, peut-être aussi, aux platines et ses dérivés (24). Elles répondent également aux taxanes mais n'y sont pas plus sensibles que les cancers du sein non triple négatifs (25).

Le schéma actuellement validé est un schéma séquentiel FEC (Fluorouracil, Epirubicine, Cyclophosphamide)/taxane.

Malgré leur chimiosensibilité, les cancers du sein «triple négatifs» sont de moins bon pronostic en raison d'une progression rapide chez les non-répondeurs. Aujourd'hui, les études se focalisent sur les traitements ciblés afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique dans les cancers du sein «triple négatifs».

LE TRAITEMENT CIBLÉ ET SES CIBLES

INTRODUCTION

Le traitement ciblé s'attaque aux cibles moléculaires qui sont supposées jouer un rôle dans la carcinogenèse. On distingue deux grandes catégories de thérapie ciblée, les anticorps monoclonaux (Mabs) et les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKis). Habituellement, ces traitements donnent des taux de réponse limités en monothérapie et sont considérés comme cytostatiques plutôt que cytotoxiques. L'identification de ces nouvelles cibles thérapeutiques

a profondément modifié la prise en charge du patient atteint d'un cancer du sein.

LA FAMILLE EGFR

L'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor ou HER-1) est un récepteur de type tyrosine kinase (TK) surexprimé dans 66 % des cancers du sein «triple négatifs» (2). Il existe deux types de thérapie ciblée sur ce récepteur, les anticorps monoclonaux (cetuximab ou Erbitux®) et les inhibiteurs de son activité tyrosine kinase (gefitinib ou Iressa® et erlotinib ou Tarceva®). Le blocage du récepteur entraîne la non-activation des kinases associées, une inhibition de la croissance cellulaire, une induction de l'apoptose, une diminution des métallo-protéinases de la matrice extracellulaire et une diminution de la vascularisation. Le principal effet secondaire est un rash acnéiforme (26). Ces médicaments sont déjà utilisés dans le traitement des cancers pulmonaire, colorectal et ORL métastasés et sont à l'étude en cancérologie mammaire et plus particulièrement en ce qui concerne le cancer du sein «triple négatif».

LE C-KIT

Le c-kit est un facteur de croissance exprimé dans 31 % des cancers du sein avec un profil basal-like (3,26). Une étude a cependant montré une faible incidence de mutation des gènes kit dans ces cancers (27). L'Imatinib mesylate (STI 571 ou Glivec®) est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de c-kit entre autres (notamment, la protéine Bcr-Abl impliquée dans la transformation néoplasique des leucémies myéloïdes chroniques). Son activité en cancérologie mammaire n'a pas encore été démontrée (28).

LES INHIBITEURS DE L'ANGIOGENÈSE

La néo-angiogenèse joue un rôle important dans la croissance tumorale. Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est le premier facteur contrôlant la formation des vaisseaux. Il n'est pas surexprimé de façon spécifique dans le cancer du sein «triple négatif», mais la vascularisation joue un rôle important dans la dissémination métastatique de la maladie (29). Le bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal anti-VEGF. Son taux de réponse en monothérapie est faible, mais, associé au paclitaxel, il augmente significativement la survie sans rechute (11 mois *versus* 6 mois) mais pas la survie globale (30). Deux études ont récemment confirmé le bénéfice en termes de survie sans progression d'une association du bévacizumab avec le docétaxel (étude AVADO) et à la capé-

citabine. On ne connaît pas encore les facteurs prédictifs de la réponse à ce traitement qui possède, par ailleurs, des effets secondaires de type hypertension artérielle, hémorragie, protéinurie et perforation digestive (31). D'autres molécules, agissant sur l'angiogenèse, sont à l'étude, comme l'AMG 386, un inhibiteur de l'angiopoïétine.

LA CHIMIOTHÉRAPIE MÉTRONOMIQUE

A faibles doses, certains médicaments de chimiothérapie administrés sur des durées plus longues (à l'inverse du schéma posologique usuel: fortes doses sur de courtes périodes) semblent être efficaces tout en ne provoquant pas d'effets indésirables importants. Cette forme de traitement est connue sous le nom de chimiothérapie métronomique et différentes données suggèrent que cette approche aurait une action inhibitrice sur l'angiogenèse et ralentirait l'émergence de la chimiorésistance (32). Par exemple, le paclitaxel hebdomadaire peut jouer ce rôle d'inhibiteur de l'angiogenèse.

LES INHIBITEURS PARP ET LES MÉCANISMES DE RÉPARATION DU DNA

Il y a de plus en plus de preuves qu'il existe un lien entre le cancer du sein «triple négatif» et le cancer du sein lié à une mutation BRCA-1 (33). En effet, ces deux types de cancers présentent de nombreuses similitudes au niveau morphologique et clinique. Le BRCA-1 joue un rôle majeur dans la réparation des cassures des doubles brins de DNA par le mécanisme de recombinaison homologue (HR). L'expression de la protéine BRCA-1 est significativement plus faible dans les tumeurs mammaires avec un grade histologique élevé, un déficit d'expression des récepteurs hormonaux et un profil basal-like (2). Ainsi, la voie BRCA-1 est probablement dysfonctionnelle dans les cancers du sein «triple négatifs» (33). Un mécanisme épigénétique, la méthylation du gène promoteur de BRCA-1, pourrait être en cause (2). Ces tumeurs présentant une altération de la voie BRCA-1 ont une sensibilité accrue aux sels de platine, qui génèrent des cassures DNA, d'où l'idée de les utiliser d'avantage dans le traitement du cancer du sein «triple négatif» (34). Les cellules avec une dysfonction de la voie BRCA-1 seraient également sensibles aux inhibiteurs d'une enzyme, la Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) (35). Cette enzyme est activée par les cassures DNA simples brins et permet la réparation de cette cassure unique. Dans ces tumeurs BRCA-1 déficientes, la réparation des cassures de DNA est impossible si les deux voies de réparation PARP et HR sont

inhibées. Or, la perte de fonction BRCA-1 inhibe la voie HR et les cellules tumorales soumises aux inhibiteurs PARP sont vouées à l'apoptose.

PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Le cancer du sein «triple négatif» est une pathologie rare, mais de mauvais pronostic. L'absence de thérapie ciblée vis-à-vis de cette catégorie de cancer du sein a poussé de nombreuses équipes à mener des recherches. Récemment, deux études ont été présentées à l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) concernant les inhibiteurs PARP. La première étude (BSI-210) associe un inhibiteur PARP avec une ligne de chimiothérapie gemcitabine/carboplatine. Cette association a permis d'augmenter la survie sans progression tumorale de 3,3 mois à 6,9 mois dans les tumeurs mammaires «triple négatives». La seconde étude s'est intéressée à un autre inhibiteur PARP, l'Olaparib. Ce principe actif a démontré son efficacité en monothérapie dans les tumeurs BRCA-1 avec un taux de réponse globale de 41 %. Devant ces résultats, les chercheurs espèrent le développement futur d'une stratégie thérapeutique ciblée efficace contre les cancers du sein «triple négatifs». Ces études sont prometteuses, mais nécessitent davantage de résultats avant une éventuelle application en pratique clinique. En attendant l'avènement de ce traitement ciblé potentiel, le traitement séquentiel classique reste d'application.

BIBLIOGRAPHIE

- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al.— Triple-negative breast cancer : clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**, 4429-4434.
- Reis-Filho JS, Tutt AN.— Triple negative tumours : a critical review. *Histopathology*, 2008, **52**, 108-118.
- Stockmans G, Deraedt K, Wildiers H, Moerman P, Paridaens R.— Triple-negative breast cancer. *Curr Opin Oncol*, 2008, **20**, 614-620.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al.— Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**, 10869-10874.
- Belgian Cancer Registry.— <http://www.registreducancer.org/>- Cancer incidence in Belgium, 2000-2005.
- Mettlin C.— Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin*, 1999, **49**, 138-144.
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al.— Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 2006, **295**, 2492-2502.
- Atchley DP, Albarracín CT, Lopez A, et al.— Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 2008, **26**, 4282-4288.
- Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al.— Thresholds for therapies : highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Ann Oncol*, 2009, **20**, 1319-1329.
- Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, et al.— Progress and promise : highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol*, 2007, **18**, 1133-1144.
- Cianfrocca M, Goldstein LJ.— Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*, 2004, **9**, 606-616.
- Dieras V.— Classification moléculaire des cancers du sein : vers une classification prédictive. Compte-rendu du cours supérieur francophone de Cancérologie, Saint-Paul-de-Vence [abstract]. Cours supérieur francophone de Cancérologie. 2007, 297-305.
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO.— Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*, 2008, **26**, 2568-2581.
- Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, et al.— Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*, 2007, **7**, 134.
- Rakha EA, El Sayed ME, Green AR, et al.— Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*, 2007, **109**, 25-32.
- Penault-Llorca F.— Classification moléculaire des cancers du sein. Implications pratiques. Compte-rendu d cours supérieur francophone de Cancérologie Saint-Paul-de-Vence. [abstract]. Cours supérieur francophone de Cancérologie. 2007, 289-295.
- Yang WT, Dryden M, Broglio K, et al.— Mammographic features of triple receptor-negative primary breast cancers in young premenopausal women. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, **111**, 405-410.
- Diaz LK, Cryns VL, Symmans WF, Sneige N.— Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype : from expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol*, 2007, **14**, 419-430.
- Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, et al.— Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast : patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res*, 2007, **9**, R4.
- Haffty BG, Yang Q, Reiss M, et al.— Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*, 2006, **24**, 5652-5657.
- Kyndi M, Sorensen FB, Knudsen H, et al.— Estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and response to postmastectomy radiotherapy in high-risk breast cancer : the Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 2008, **26**, 1419-1426.
- Parikh RR, Yang Q, Higgins SA, Haffty BG.— Outcomes in young women with breast cancer of triple-negative phenotype : the prognostic significance of CK19 expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, **70**, 35-42.
- Foulkes WD, Metcalfe K, Hanna W, et al.— Disruption of the expected positive correlation between breast tumor size and lymph node status in BRCA1-related breast carcinoma. *Cancer*, 2003, **98**, 1569-1577.
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al.— The triple negative paradox : primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**, 2329-2334.
- Harris LN, Broadwater G, Lin NU, et al.— Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease : results from CALGB 9342. *Breast Cancer Res*, 2006, **8**, R66.

26. Wasserman EJ, Tan AR.— Evolving Strategies for the Treatment of «Triple-Negative» Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol*, 2008, 120-126.
27. Simon R, Panussis S, Maurer R, et al.— KIT (CD117)-positive breast cancers are infrequent and lack KIT gene mutations. *Clin Cancer Res*, 2004, 10, 178-183.
28. Cristofanilli M, Morandi P, Krishnamurthy S, et al.— Imatinib mesylate (Gleevec) in advanced breast cancer-expressing C-Kit or PDGFR-beta : clinical activity and biological correlations. *Ann Oncol*, 2008, 19, 1713-1719.
29. Bando H.— Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer*, 2007, 14, 163-173.
30. Miller K, Wang M, Gralow J, et al.— Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2007, 357, 2666-2676.
31. Izzedine H, Ederhy S, Goldwasser F, et al.— Management of hypertension in angiogenesis inhibitor-treated patients. *Ann Oncol*, 2009, 20, 807-815.
32. Van Cutsem E, Geboes K.— The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. The integration of cytotoxics and biologicals in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2007, 21, 1089-1108.
33. Turner NC, Reis-Filho JS.— Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*, 2006, 25, 5846-5853.
34. Rottenberg S, Nygren AO, Pajic M, et al.— Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104, 12117-12122.
35. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al.— Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*, 2009, 361, 123-134.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au
Dr J. Collignon, Service d'Oncologie médicale, CHU
de Liège, 4000 Liège, Belgique.
Email : joelle.collignon@chu.ulg.ac.be

Pharmacotherapy

Cyclin-dependent protein kinase inhibitors in breast cancer treatment

P. Frères, MD¹, L. Lousberg, MD¹, G. Jerusalem, MD, PhD^{1,2}

Dysregulation of the cell cycle is a classic hallmark of cancer. Cell cycle control by the inhibition of cyclin-dependent protein kinases represents new options for anticancer therapy. Abemaciclib (LY2835219), ribociclib (LEE011) and palbociclib (PD0332991) are selective oral inhibitors of CDK4/6 and are largely under evaluation in clinical trials in the field of breast cancer. In an open-label, randomised phase II study (PALOMA-1/TRIO-18 trial), the combination of palbociclib and letrozole, compared to letrozole alone, significantly prolongs progression-free survival of patients suffering from ER positive HER2 negative advanced breast cancer and who had not received any systemic treatment for their advanced disease. More recently, it has also been shown that palbociclib combined with fulvestrant resulted in longer progression-free survival than fulvestrant alone in patients presenting ER positive HER2 negative advanced breast cancer and who had progression of disease during endocrine therapy. The toxicity profile of palbociclib is manageable. The most common grade 3 or 4 adverse events include neutropenia, anaemia, thrombocytopenia and fatigue. Toxicity related permanent discontinuation is unusual. Additional phase III data evaluating CDK4/6 inhibitors in patients with endocrine sensitive disease or after failure of previous endocrine therapy are expected in the very near future. Impact of CDK4/6 inhibitors on overall survival and the role of CDK4/6 inhibitors in the adjuvant or neoadjuvant setting are under evaluation. More treatment options are now evaluable for patients with ER positive HER2 negative advanced breast cancer. Optimal sequence of the available therapies remains unknown. Unfortunately, no trials have been designed to answer this important question.

(*Belg J Med Oncol* 2016;10(4):132-138)

Introduction

Breast cancer is the first cause of death by cancer among women in Western countries. Its incidence has continuously increased in the late 1980s and 1990s. However, in the same period, mortality from breast cancer (BC) has decreased due to early detection and improved treatments.¹ Incidence rates in some of these countries including the United States, United Kingdom, France and Australia, sharply decreased from the beginning of the millennium.¹

De novo metastatic disease is rare in Belgium. Most times advanced breast cancer (ABC) is diagnosed during or after prior adjuvant endocrine therapy. In general, ABC is considered to be an incurable disease. The aim

of therapy in this setting is to transform the disease into a chronic disease. Consequently, the quality of life is a major concern.

Endocrine therapy is active and well tolerated as first-line treatment of oestrogen receptor (ER) positive ABC. Unfortunately, resistance to endocrine therapy will emerge in almost all patients, requiring other treatment approaches, including the use of chemotherapy agents. A therapeutic option to overcome the acquired resistance to endocrine therapy is therefore very attractive.

Everolimus has been approved in Europe for the treatment of ER positive HER2 negative ABC in combination with exemestane in postmenopausal women without

¹Department of Medical Oncology, CHU Sart Tilman Liege, Liège, Belgium, ²University of Liège, Liège, Belgium.

Please send all correspondence to: G. Jerusalem, MD, PhD, CHU Sart Tilman, Department of Medical Oncology, Avenue de L'Hôpital 1, 4000 Liège, Belgium, tel: +32 43 66 84 14 / +32 43 66 78 01, email: g.jerusalem@chu.ulg.ac.be.

Conflict of interest: G. Jerusalem: honoraria Amgen, Pfizer, Novartis, Roche, Celgene; research grant: Novartis, Roche, MSD.

Keywords: breast cancer, CDK4/6 inhibitors, endocrine therapy, palbociclib.

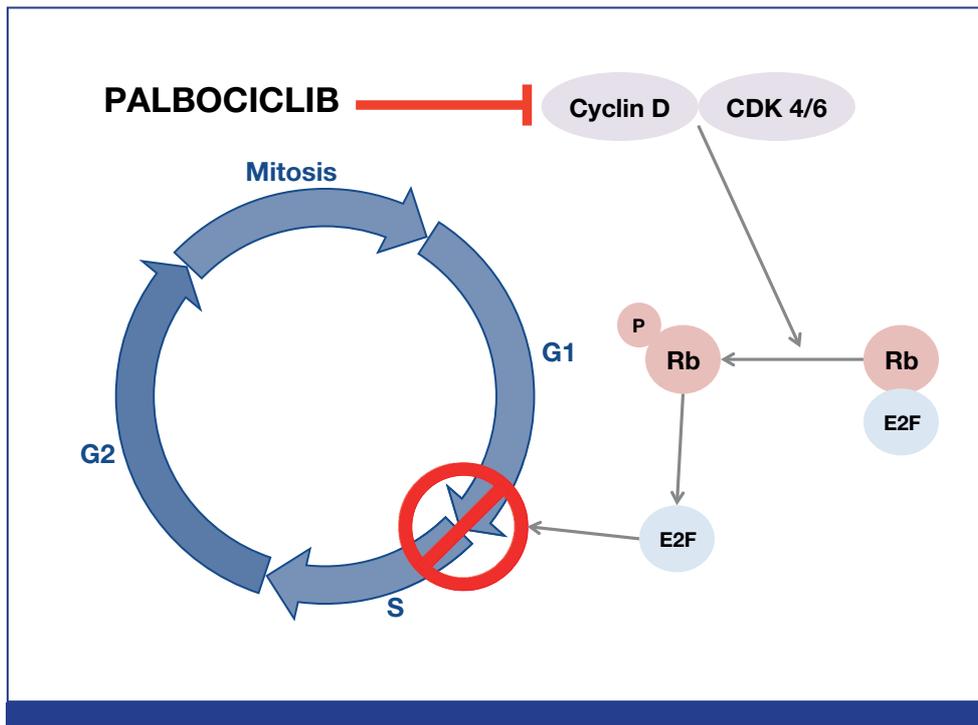


Figure 1. Inhibition of the cell cycle progression by palbociclib in breast cancer cells. Heterodimer complex CDK/cyclin D1 phosphorylates the Retinoblastoma protein (Rb). Phosphorylated Rb releases E2F, which facilitates G1 to S phase transition. The inhibition of CDK4/6 by palbociclib can therefore prevent the progression of the breast cancer cell through the cell cycle.

symptomatic visceral disease after recurrence or progression after a non-steroidal aromatase inhibitor (NSAI) therapy based on the results of the Bolero-2 trial.² Median progression-free survival (PFS) in the overall population increased from 3.2 months in the exemestane + placebo arm to 7.8 months in the exemestane + everolimus (EVE + EXE) arm.³ Although the median overall survival (OS) increased by over four months in the EVE + EXE arm (31.0 months versus 26.6 months), this underpowered trial for OS evaluation failed to show a statistically significant improvement of this important secondary endpoint. Importantly, although EVE + EXE is associated with more side effects compared to EXE + placebo, EVE + EXE improves PFS without adversely impacting health-related quality of life.⁴

Additional treatment options are needed in order to further postpose the use of chemotherapy in ABC. All international guidelines indicate that, outside the context

of extensive, symptomatic visceral disease, endocrine therapy based approaches should be preferred. In this context, CDK4/6 inhibitors represent an additional important step forward in the treatment of ER positive HER2 negative ABC. In this article, we will review the mechanism of action and clinical data of CDK4/6 inhibitors in BC. Their current position in the treatment strategy and the plan for future development of these agents will also be described.

Mechanism of action

The timing of DNA synthesis divides the cycle of eukaryotic cells into four distinct phases. CDKs are a large family of serine threonine kinases first discovered for their role in controlling cell cycle progression. A key point in the regulation of the cell cycle is the transition from G1 to S phase (G1/S phase transition), which is under the control of CDK4/6 through a mechanism summarised in the *Figure 1*. CDK4/6 forms, with cyclin

Pharmacotherapy

D1, a heterodimer complex that phosphorylates the Retinoblastoma protein (Rb). The phosphorylated Rb can release and induce the expression of E2F, allowing for the G1/S transition to proceed.⁵

ER positive BC frequently exhibits hyperactivation of the CDK/cyclin D1/Rb pathway by different mechanisms, such as CDK or cyclin D1 amplification, mutation or loss of Rb or of endogenous CDK inhibitors (p16 or CDKN2A). Furthermore, in BC cells, growth inhibition by anti-oestrogen therapy may be accomplished by the decrease in cyclin D1 expression and activation. On the other hand, resistance to endocrine treatment is associated with cyclin D1 overexpression and Rb hyperphosphorylation. The inactivation of CDK/cyclin D1/Rb axis is therefore an attractive target for drug development in the subgroup of ER positive BC.^{5,6}

Palbociclib, formerly known as PD 0332991, is a highly selective, orally administrated inhibitor of CDK4/6-cyclin D1 kinase activity. In preclinical models, CDK inhibition is associated with decreased Rb phosphorylation, downstream signalling, and subsequent cell cycle arrest. The activity of PD 0332991 was highest in luminal ER positive and in HER2-amplified cell lines as compared with basal-like subtypes. Gene expression profiles revealed that Rb and cyclin D1 overexpression, as well as lower levels of CDKN2A (p16), were associated with higher response to the treatment. Moreover, the combination of PD 0332991 with tamoxifen or trastuzumab proved to be synergistic and, in cell lines previously resistant to tamoxifen, PD 0332991 monotherapy was able to re-sensitise to tamoxifen and to effectively halt cellular proliferation.⁶

Clinical data

Palbociclib was initially studied in two phase I dose-finding trials including patients with Rb-intact advanced malignancies. The recommended dose was deemed to be 125 mg once daily in a 3-week on, 1-week off schedule. In these studies, the principal dose-limiting toxicity was myelosuppression (neutropenia and thrombocytopenia), which was reversible and non-cumulative.^{7,8} Palbociclib has also been evaluated in combination with letrozole in a phase Ib study including ER positive HER2 negative ABC. The combination was generally well tolerated with encouraging anti-tumour activity.⁹

Palbociclib subsequently moved to phase II studies. The open-label, randomised PALOMA-1/TRIO-18 trial enrolled two cohorts of 165 postmenopausal women with

ER positive HER2-negative ABC who had not received any prior systemic therapy for their advanced disease.¹⁰ Patients who received letrozole or anastrozole in the adjuvant setting were not eligible for the study if disease recurrence occurred during or within twelve months following completion of treatment. Patients were randomly assigned to receive continuous letrozole (2.5 mg daily) with or without palbociclib 125 mg, given once daily from days 1-21, on a 28-day cycle. The primary-end point was PFS in the intention-to-treat population. In cohort 1 (66 patients), all patients fulfilling the general inclusion criteria were enrolled, whereas in cohort 2 (99 patients), they were also required to express in the tumour one of specific biomarkers which were candidates to identify patients with higher chances to respond to the experimental therapy: amplification of cyclin D1 (CCND1), loss of p16 (INK4A or CDKN2A), or both. Median PFS increased from 10.2 months in the control arm to 20.2 months in the palbociclib plus letrozole group. In cohort 1, median PFS increased from 5.7 months to 26.1 months whereas, in cohort 2, median PFS increased from 11.1 months to 18.1 months. Consequently, this trial has not validated these potential biomarkers for predicting benefits of CDK4/6 inhibitors. More frequent grade 3–4 toxicities in the palbociclib + letrozole group included neutropenia (54%), leucopenia (19%) and fatigue (4%). Based on these results, palbociclib plus letrozole received US Food and Drug Administration (FDA) accelerated approval as first-line therapy for ER positive HER2 negative ABC in February 2015.

The phase III trial, PALOMA-3, assessed in 521 patients the efficacy and safety of palbociclib + fulvestrant compared to placebo + fulvestrant in premenopausal or postmenopausal women with ER positive ABC that progressed during prior endocrine therapy.¹¹ Premenopausal or perimenopausal women also received goserelin. At the time of a pre-planned interim analysis (after 195 events of disease progression or death), the trial met its primary endpoint. The median PFS was 9.2 months in the experimental arm compared to 3.8 months in the placebo + fulvestrant group. Improved outcome was confirmed in the final PFS analysis.¹² Median PFS was 9.5 months in the fulvestrant + palbociclib group compared to 4.6 months in the control group. Subgroup analyses were generally consistent with the results observed in the overall population. Neither PIK3CA status determined in the plasma DNA nor hormone-receptor expression level significantly affected treatment response. The most common grade 3 or 4 adverse events

in the fulvestrant + palbociclib group were neutropenia (65%), anaemia (3%) and leucopenia (28%). Only 1% of patients receiving palbociclib + fulvestrant developed febrile neutropenia. Discontinuation because of adverse effects was low (4%) in the palbociclib + fulvestrant group.

Clinical practice

The recommended dose of palbociclib, in combination with continuous letrozole or fulvestrant, is 125 mg once daily for 21 days, followed by a 7-day off period, to complete a 28-day cycle. The combination is continued until disease progression or unacceptable toxicity. No food interactions have been described. Palbociclib is eliminated slowly by hepatic clearance, with mean terminal life of 26 hours. By consequence, there is a high risk of drug interaction between palbociclib and CYP3A4 inhibitors such as azole antifungals, clarithromycin, protease inhibitors, verapamil and grapefruit juice. During treatment, the monitoring of complete blood count is required prior to initiation, every two weeks for the first two cycles, and then prior to each cycle, or as clinically indicated. In case of grade 4 haematological toxicities or grade 3/4 non-hematologic toxicities, the recommended dose reduction is to 100 mg daily. If further reduction is required, a 75 mg daily dose is indicated. If dose reduction below 75 mg daily is required, treatment should be discontinued.

The role of palbociclib in the current treatment strategy of ER positive HER2 negative ABC has to be defined. Endocrine monotherapy is a validated approach as first-line therapy of ABC and allows sometimes for long term disease control, in particular in de novo metastatic disease or in the case of late relapses. Median PFS improvement is important if palbociclib is added to letrozole but no OS improvement has yet been proven. Cost is an important factor in addition to toxicity and is expected to impact even more in treatment decisions in the future. The optimal sequence of validated treatment options has to be determined. In particular, in patients who previously received a NSAI, it is unknown if we should first administer everolimus or palbociclib. Unfortunately, no ongoing clinical trials will answer this important question as no head-to-head comparisons are planned. Not any of these treatment options will cure the patients. Optimal sequence should allow offering the longest OS at the lowest costs. Moreover, tumour biology at time of relapse may depend on the treatment administered. Consequently, the option giv-

ing the longest median PFS in first-line is not necessarily the best approach if thereafter the other treatments have reduced activity because of the modified tumour biology. Clinicians have to decide the sequential use of these agents without being able to justify the choice by an evidence-based approach in countries where all treatment options are available.

Currently, in Belgium the combination of palbociclib and fulvestrant should be considered after the failure of prior endocrine therapy (tamoxifen or NSAI) in postmenopausal women. Everolimus and exemestane is another approved option after failure of NSAI in this patient population. The choice between these two regimens is up to the clinician and depends of course on access/reimbursement criteria which are not yet known for palbociclib in Belgium. The relative improvement in PFS benefit with palbociclib and fulvestrant in PALOMA-3 is similar compared to PFS benefit of everolimus and exemestane in the BOLERO-2 trial. Better outcome in the control arm in PALOMA-3 is either related to a more favourable patient population and/or superiority of high dose fulvestrant over exemestane. Neither BOLERO-2 nor PALOMA-3 were able to define subgroups based on clinical factors or biomarkers which benefit more in relative terms or which do not benefit from adding the targeted therapy. OS benefit has not yet been proven with any of these treatment options. Safety profiles are however different. Fewer patients permanently discontinued treatment because of side effects in PALOMA-3 compared to BOLERO-2. However, again, biology at time of disease progression influencing potential response to next line therapy and costs should also be integrated before the optimal sequence can be recommended both from a patient and a societal point of view.

Conclusion

The question is no longer if but when CDK4/6 inhibitors should be used as treatment of ER positive HER2 negative ABC. Currently, only phase III data are available for palbociclib. Many studies are currently underway to better define the role of CDK4/6 inhibitors in the BC treatment strategy (Table 1). Phase III trials with other CDK4/6 inhibitors (abemaciclib and ribociclib) are expected to be reported in the near future. It is difficult to predict if these other CDK4/6 inhibitors have any advantage in terms of safety or efficacy. No trials directly comparing CDK4/6 inhibitors are planned. Triple combinations combining endocrine therapy, CDK4/6

Pharmacotherapy

Table 1. Main combination treatments with CDK inhibitors under investigation in breast cancer patients (ER+ = estrogen receptor positive, PFS = progression-free survival, N/A = not available, NSAI = non-steroidal aromatase inhibitor, cCR = clinical complete response, iDFS = invasive disease-free survival) (source: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>).

Trial references	Phase	Patient population	Treatments	Primary end point	Status	Results
ADVANCED BREAST CANCER						
PALOMA-1/ TRIO-18 NCT00721409	2	Postmenopausal women with ER+, HER2-negative, advanced breast cancer First-line	Letrozole ± palbociclib	PFS	Not recruiting	Median PFS: 10.2 vs. 20.2 months (HR 0.488, 95% CI 0.32-0.75; p = 0.0004)
PALOMA-2 NCT01740427	3	Postmenopausal women with ER+, HER2-negative, advanced breast cancer First-line	Letrozole ± palbociclib	PFS	Not recruiting	N/A
PALOMA-3 NCT01942135	3	Pre- or post-menopausal women with ER+, HER2-negative, advanced breast cancer Prior endocrine therapy	Fulvestrant ± palbociclib + goserelin if premenopausal	PFS	Not recruiting	Median PFS: 9.2 vs. 3.8 months (HR 0.422, 95% CI 0.32-0.56, p < 0.0001)
PALOMA-4 NCT02297438	3	Asian postmenopausal women with ER+, HER2-negative, advanced breast cancer First-line	Letrozole ± palbociclib	PFS	Recruiting	N/A
MONALEESA-2 NCT01958021	3	Postmenopausal women with ER+, HER2-negative, advanced breast cancer First-line	Letrozole ± ribociclib	PFS	Not recruiting	N/A
MONALEESA-3 NCT02422615	3	Postmenopausal women with ER+, HER2-negative, advanced breast cancer First-line or prior endocrine therapy	Fulvestrant ± ribociclib	PFS	Recruiting	N/A
MONALEESA-7 NCT02278120	3	Premenopausal women with ER+, HER2-negative, advanced breast cancer First-line	Tamoxifen or NSAI + goserelin ± ribociclib	PFS	Recruiting	N/A
MONARCH-2 NCT02107703	3	Postmenopausal women with ER+, HER2-negative, advanced breast cancer First-line or prior endocrine therapy	Fulvestrant ± abemaciclib	PFS	Not recruiting	N/A
MONARCH-3 NCT02246621	3	Postmenopausal women with ER+, HER2-negative, advanced breast cancer First-line	NSAI ± abemaciclib	PFS	Not recruiting	N/A
PEARL NCT02028507	3	Postmenopausal women with ER+, HER2-negative, advanced breast cancer Prior NSAI	Exemestane + Palbociclib vs. Capecitabine	PFS	Recruiting	N/A
PATRICIA NCT02448420	2	Postmenopausal women with ER+ or negative, HER2-positive, advanced breast cancer Prior chemotherapy and trastuzumab	Trastuzumab + palbociclib ± letrozole	PFS	Recruiting	N/A

Table 1. Continued.

Trial references	Phase	Patient population	Treatments	Primary end point	Status	Results
EARLY BREAST CANCER						
PALLET/FB-11 NCT02296801	2	Postmenopausal women with ER+, HER2-negative, early breast cancer Neoadjuvant setting	Letrozole ± palbociclib	cCR Change in Ki67 from baseline to 14 weeks	Recruiting	N/A
neoMONARCH NCT02441946	2	Pre- or post-menopausal women with ER+, HER2-negative, early breast cancer Neoadjuvant setting	Anastrozole vs. abemaciclib vs anastrozole + abemaciclib	Change in Ki67 from baseline to 2 weeks after	Recruiting	N/A
NA-PHER2 NCT02530424	2	Pre- or post-menopausal women with ER+, HER2-positive, early breast cancer Neoadjuvant setting	Trastuzumab + pertuzumab + fulvestrant + palbociclib	Change in Ki67 from baseline to 2 weeks after and at surgery	Not recruiting	N/A
NeoPAL NCT02400567	2	Post-menopausal women with ER+, HER2-negative, early breast cancer Neoadjuvant setting	Chemotherapy (3 FEC + 3 Docétaxel) vs. Letrozole + Palbociclib	Residual Cancer Burden (RCB) after the completion of neoadjuvant therapy	Recruiting	N/A
PENELOPE-B NCT01864746	3	Pre- or post-menopausal women with ER+, HER2-negative, early breast cancer Residual disease after neoadjuvant chemotherapy Adjuvant setting	1-year placebo vs. palbociclib	iDFS	Recruiting	N/A
PALLAS NCT02513394	3	Pre- or post-menopausal women with ER+, HER2-negative, early breast cancer Adjuvant setting	5-years endocrine therapy ± 2-years palbociclib	iDFS	Recruiting	N/A

inhibitors and drugs targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway are also under evaluation. It remains to be proven if any of these triple combinations have advantages over sequential use of doublets.

The ultimate goal of our treatment is cure. CDK4/6 inhibitors are now also evaluated in the adjuvant and neoadjuvant setting in high risk patients. A neoadjuvant approach is sometimes used to enrich the trial population with high risk patients. The role of chemotherapy is questionable in high risk Luminal A type BC. It is reasonable to hope that CDK4/6 inhibitors will be used in the future instead of chemotherapy in combination with endocrine therapy in the adjuvant setting. However, it is still a long way before this can become a reality. Long term follow-up is needed in particular in the adjuvant setting and the first large registration trials just started recruitment.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.

2. Baselga J, Campone M, Piccart M, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(6):520-9.

3. Piccart M, Hortobagyi GN, Campone M, et al. Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2. *Ann Oncol.* 2014;25(12):2357-62.

4. Campone M, Beck JT, Gnant M, et al. Health-related quality of life and disease symptoms in postmenopausal women with HR(+), HER2(-) advanced breast cancer treated with everolimus plus exemestane versus exemestane monotherapy. *Curr Med Res Opin.* 2013;29(11):1463-73.

5. Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(2):130-46.

6. Finn RS, Dering J, Conklin D, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal oestrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res.* 2009;11(5):R77.

7. Schwartz GK, LoRusso PM, Dickson MA, et al. Phase I study of PD 0332991, a cyclin-dependent kinase inhibitor, administered in 3-week cycles (Schedule 2/1). *Br J Cancer.* 2011;104(12):1862-8.

8. Flaherty KT, LoRusso PM, Demichele A, et al. Phase I, dose-escalation trial of the oral cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor PD 0332991, administered

Pharmacotherapy

Key messages for clinical practice

1. The CDK4/6 inhibitor palbociclib combined with fulvestrant compared to placebo and fulvestrant improves PFS in premenopausal or postmenopausal women with ER positive ABC that progressed during prior endocrine therapy in the phase III PALOMA-3 trial.
2. Palbociclib combined with letrozole compared to letrozole alone improved PFS in postmenopausal women with ER positive HER2 negative ABC who had not received any prior systemic therapy for their advanced disease in the phase II PALOMA-1 trial.
3. The CDK4/6 inhibitor palbociclib is a new valid treatment option in ER positive HER2 negative ABC. Other CDK 4/6 inhibitors (abemaciclib and ribociclib) are under evaluation in phase III trials.
4. The optimal sequence of endocrine therapy-based treatment approaches in ER positive HER2 negative ABC remains unknown. Efficacy, safety, cost and efficacy of other treatment options at time of progression has to be integrated when defining the optimal sequence.
5. The CDK4/6 inhibitor palbociclib is under evaluation in the adjuvant or neoadjuvant setting.

using a 21-day schedule in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(2):568-76.

9. Slamon DJ, Hurvitz SA, Applebaum S, et al. Phase I study of PD 0332991, cyclin-D kinase (CDK) 4/6 inhibitor in combination with letrozole for first-line treatment of patients with ER-positive, HER2-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;15s:A3060.

10. Finn RS, Crown JP, Lang I, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast

cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):25-35.

11. Turner NC, Ro J, André F, et al. Palbociclib in hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(3):209-19.

12. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2016. [Epub ahead of print].

Call for oncocases

Share your interesting clinical cases
with your colleagues!

At the Belgian Journal for Medical Oncology we are constantly looking for clinical cases. Should you encounter an interesting oncological case in your centre please do not hesitate to let us know.

The BJMO is an ideal platform to share your experiences with your colleagues and underline the encountered practical pitfalls.

All article submissions are most welcome at editor@bjmo.be

LA CARDIOTOXICITÉ DES TRAITEMENTS ANTI-CANCÉREUX

P. FRÈRES (1), A. PONCIN (1), M. MOONEN (2), CL. JOSSE (3), C. OURY (4), V. BOURS (5), P. LANCELLOTTI (6), G. JERUSALEM (7)

RÉSUMÉ : Les cancers sont de plus en plus fréquents et leurs traitements de plus en plus agressifs. En conséquence, les médecins se trouvent régulièrement confrontés aux effets secondaires des traitements cytotoxiques. La cardiotoxicité induite par les traitements anti-cancéreux est une complication gravissime, car elle peut être mortelle et provoque un arrêt temporaire, voire définitif, des traitements. Dans cet article, nous décrivons les mécanismes, le dépistage et la prise en charge multidisciplinaire de la cardiotoxicité des agents anti-cancéreux.

MOTS-CLÉS : Cancer - Traitements - Cardiotoxicité - Chimiothérapie - Trastuzumab

CANCER THERAPY-INDUCED CARDIOTOXICITY

SUMMARY : The incidence of cancer is raising and the treatments are increasingly aggressive. Consequently, physicians are regularly facing side effects of cytotoxic therapies. Cancer-therapy-induced cardiotoxicity is a serious complication because it can be fatal and causes a temporary or permanent cessation of the treatment. In this article, we summarize the mechanisms, the monitoring and the multidisciplinary management of patients with cancer-therapy induced cardiotoxicity.

KEYWORDS : Cancer - Therapies - Cardiotoxicity - Chemotherapy - Trastuzumab

INTRODUCTION

Plusieurs traitements anti-cancéreux – la chimiothérapie, la radiothérapie et les thérapies ciblées – peuvent être à l'origine d'une toxicité cardiaque. Cette toxicité inclut l'hypertension artérielle (HTA), les arythmies, les altérations de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) et l'insuffisance cardiaque. Elle touche plus spécifiquement les patients présentant des facteurs de risque cardio-vasculaire (obésité, diabète, HTA) et la population pédiatrique. Cet effet secondaire, parfois dévastateur, est connu depuis de nombreuses années et ses bases moléculaires sont partiellement élucidées. Cependant, à l'heure actuelle, il est toujours difficile de prédire et prévenir une atteinte cardiaque liée à un traitement cytotoxique (1).

Dans ce contexte, le clinicien pourrait bénéficier d'un biomarqueur permettant de détecter précocement, voire de prédire, une atteinte myocardique liée à la chimiothérapie. Les

marqueurs cardiaques classiques (troponines, NT-proBNP) et l'échocardiographie doppler 2D ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter une toxicité cardiaque infra-clinique. Dans cet article, nous présentons une revue de la littérature sur la cardiotoxicité des agents anti-cancéreux et sur les méthodes biologiques et échographiques pour détecter précocement cette toxicité.

TRAITEMENTS ANTI-CANCÉREUX CARDIOTOXIQUES

ANTHRACYCLINES

Les anthracyclines sont utilisées depuis les années 1960 dans de nombreux types de cancers : cancers du sein, sarcomes, lymphomes, leucémies ... (2, 3). Les mécanismes de leur cardiotoxicité impliquent des cassures d'ADN par inhibition de la topoisomérase 2, une perturbation de l'homéostasie du calcium, une inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale et la formation de radicaux libres aboutissant à l'apoptose des cardiomyocytes (3).

Sur le plan clinique, on distinguera 2 types de cardiotoxicité (2) :

a) une toxicité aiguë, qui se traduit par des modifications de l'ECG (modifications aspécifiques du segment ST, prolongation de l'intervalle QT), des altérations modérées à sévères de la FEVG, voire des arythmies ventriculaires malignes. Ce type de réaction survient directement après l'infusion de la drogue, est rare (< 1 % des cas) et généralement réversible en 1 semaine;

(1) Assistant clinique, aspirant FRS-FNRS, Service d'Oncologie Médicale, CHU de Liège.

(2) Chef de clinique, Service de Cardiologie, CHU de Liège.

(3) Chercheur postdoctoral, Laboratoire de Génétique Humaine, GIGA, Université de Liège.

(4) Maître de recherche FRS-FNRS, GIGA-Sciences cardiovasculaires, Université de Liège.

(5) Chef de Service, Service de Génétique Humaine, CHU de Liège, Chargé de cours, Université de Liège.

(6) Professeur d'Imagerie fonctionnelle en Echographie, GIGA-Sciences cardiovasculaires, Université de Liège, Responsable du Service des Soins intensifs, Service de Cardiologie, CHU de Liège.

(7) Chef de Service, Service d'Oncologie Médicale, CHU de Liège, Chargé de cours, Université de Liège.

b) une toxicité chronique, qui entraînera une diminution progressive et irréversible de la FEVG. La cardiotoxicité chronique peut être précoce, apparaissant dans l'année (2 % des cas), ou tardive, jusqu'à 20 ans après l'arrêt des traitements (4 à 5 % des cas). Elle constitue un véritable défi : des études pédiatriques ont montré qu'environ 65 % des patients présentent une anomalie cardiaque 6 ans après la fin des anthracyclines (4, 5).

Le facteur de risque principal de la toxicité cardiaque chronique est la dose cumulée d'anthracycline. Les doses totales de doxorubicine et d'épirubicine sont ainsi limitées à 500 et 800-900 mg/m², respectivement. Les autres facteurs de risque sont : le sexe féminin, un antécédent de radiothérapie thoracique, l'âge (sujets jeunes et âgés), l'association avec d'autres agents cardiotoxiques (par exemple trastuzumab et taxane en cas de cancer du sein HER2), un traitement prolongé avec des doses rapprochées et une pathologie cardio-vasculaire sous-jacente (2, 3).

Lors d'un traitement par anthracycline, une évaluation cardiaque (échocardiographie doppler 2D et ECG) doit être réalisée régulièrement : avant le début du traitement, après une dose cumulée de doxorubicine de 300, 400 et 500 mg/m², 6 mois après la fin de la chimiothérapie, puis tous les ans pendant 2 à 3 ans et enfin tous les 3 à 5 ans à vie. Les guidelines de l'ESMO (European Society of Medical Oncology) recommandent d'interrompre l'anthracycline lorsque la FEVG diminue de plus de 15 % (ou de > 10 % pour des valeurs inférieures à 50 %). Un contrôle de l'échocardiographie devra être réalisé à 3 semaines afin de confirmer les valeurs de FEVG (2, 6).

Ces dernières années, des analogues de la doxorubicine sous forme liposomale pégylée (Caelyx®, Myocet®), ont été développés afin de réduire la cardiotoxicité de la doxorubicine. Ces analogues sont remboursés dans le traitement de certaines tumeurs solides (cancer de l'ovaire et du sein, sarcome de Kaposi et des tissus mous). La dose cumulée maximale de doxorubicine sous forme liposomale est de 550 mg/m². Les perfusions continues de doxorubicine, en 48 à 96h, permettent également de réduire la cardiotoxicité du produit, probablement en diminuant son pic de concentration plasmatique (7).

Le dexrazoxane est un chélateur du fer qui diminue significativement le risque de cardiotoxicité associée aux anthracyclines. Le

mécanisme moléculaire n'est pas clair, mais le dexrazoxane semble lier le fer libéré par les cellules myocardiques lésées. Cette drogue pourrait cependant interférer avec l'efficacité et augmenter la toxicité médullaire de la chimiothérapie. Elle est, donc, uniquement indiquée en cas de cancer du sein métastatique lorsque la dose cumulée de doxorubicine est \geq à 300 mg/m² et que le risque de cardiotoxicité est important (8). Le rôle protecteur des bêta-bloquants, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et des sartans au cours d'un traitement par anthracyclines doit encore être validé (2).

ANTIMÉTABOLITES

Le 5-fluorouracil (5-Fu) et la capécitabine (Xeloda®), une forme orale du 5-Fu, sont utilisés dans de nombreux types de cancers solides (cancers de la sphère ORL, du sein, de l'estomac, du pancréas, du côlon,...). Ces drogues constituent, après les anthracyclines, la deuxième cause de cardiotoxicité induite par la chimiothérapie. La toxicité cardiaque du 5-Fu survient dans 8 % des cas et se traduit le plus souvent par une douleur thoracique angineuse dans les 72 heures après l'administration du produit. La douleur est généralement accompagnée de modifications de l'ECG (élévation du segment ST, inversion des ondes T) et, plus rarement, d'une élévation des enzymes cardiaques (9).

Plusieurs mécanismes ont été proposés tel un vasospasme coronaire, une atteinte endothéliale ou une cardiomyopathie de stress type takotsubo. Cet angor survient particulièrement chez les patients avec des facteurs de risque cardio-vasculaire ou un antécédent de radiothérapie thoracique. Les protocoles d'infusion continue semblent plus à risque que l'administration en bolus (p.ex. dans les schémas FOLFOX et FOLFIRI utilisés dans le cancer colorectal). L'angor est généralement réversible à l'arrêt du 5-Fu et après l'administration de dérivés nitrés ou d'antagonistes calciques. En principe, la survenue de cet effet secondaire contre-indique l'administration ultérieure de 5-Fu (10,11).

AGENTS ALKYLANTS

Le cyclophosphamide et l'ifosfamide administrés à hautes doses sont associés à un risque de décompensation cardiaque aigue. Ceci a été illustré par une série de 32 patients traités par cyclophosphamide à 180 mg/kg pendant 4 jours dans le cadre d'une allogreffe de cellules souches pour hémopathie. Avec ce protocole, 9 patients ont développés une insuffisance car-

diague congestive dans les 3 semaines et 6 en sont morts (12).

Le cyclophosphamide a aussi été associé à l'apparition d'un épanchement péricardique hémorragique, typiquement dans la 1^{ère} semaine de traitement, pouvant conduire à une tamponnade fatale. Cet épanchement est probablement lié à une atteinte de l'endothélium capillaire et est efficacement traité par glucocorticoïdes dans la majorité des cas (13).

La famille des platines (cisplatine, carboplatine, oxaliplatine) augmente le risque de pathologie cardio-vasculaire au sens large (p.ex. syndrome de Raynaud, HTA, dyslipidémie, cardiomyopathie ischémique ou accident vasculaire cérébral). Cette toxicité apparaît sur le long terme et nécessite une surveillance prolongée, p.ex. chez les jeunes hommes traités par cisplatine pour un cancer du testicule (14). Par ailleurs, le cisplatine est responsable d'une néphrotoxicité aboutissant à des troubles électrolytiques (hypomagnésémie, hypokaliémie) et à diverses arythmies.

INHIBITEURS DES MICROTUBULES

Les alcaloïdes de la pervenche (principalement, la vinblastine, mais aussi la vincristine et la vinorelbine) sont associés à un risque d'HTA et de cardiopathie ischémique.

Les taxanes (docétaxel, paclitaxel, nab-paclitaxel), utilisés en monothérapie, provoquent le plus souvent des arythmies (bradycardie, bloc auriculo-ventriculaire, tachycardie ventriculaire). La cardiotoxicité des anthracyclines est potentialisée par leur association avec un taxane, comme c'est le cas dans les schémas de chimiothérapie adjuvante et néoadjuvante du cancer du sein (3, 11).

HORMONOTHÉRAPIES

Les inhibiteurs de l'aromatase (Aromatase Inhibitors, AI) sont indiqués dans le traitement adjuvant du cancer du sein hormono-sensible en post-ménopause. Une méta-analyse, regroupant 19.000 patientes, suggèrent que les AI sont associés à une augmentation du risque relatif d'événements cardio-vasculaires par rapport au tamoxifène (risque relatif de 1,31). Le risque absolu reste cependant faible, de l'ordre de 0,5 %. Le mécanisme proposé est une perturbation du profil lipidique induite par l'AI (15).

THÉRAPIES CIBLÉES

Le trastuzumab (Herceptine®) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre

HER2 (Human Epidermal Growth factor Receptor 2). Le trastuzumab joue un rôle primordial dans le traitement des stades précoces et avancés des cancers du sein présentant une surexpression de HER2 (15 à 20 % des cas). Sa cardiotoxicité implique le plus souvent une réduction asymptomatique de la FEVG et, rarement, une insuffisance cardiaque congestive. Le risque de cardiotoxicité est compris entre 2 et 13 %, particulièrement après 50 ans et lors de l'utilisation concomitante d'anthracyclines. Le mécanisme moléculaire est distinct de celui des anthracyclines : le trastuzumab diminue la contractilité des cardiomyocytes sans entraîner leur apoptose. Par conséquent, sa cardiotoxicité est réversible, le plus souvent en 2 à 4 mois (11). Une échocardiographie doppler 2D doit être réalisée avant le début du traitement, à 3, 6, 12 et 18 mois, puis tous les ans (16). Lorsque la FEVG diminue de > 15 %, ou de > 10 % pour des valeurs inférieures à 50 %, le trastuzumab devra être interrompu. La fonction cardiaque sera alors réévaluée après 4 semaines et, en cas de normalisation et en l'absence de symptômes d'insuffisance cardiaque (dyspnée, prise de poids, œdème), le trastuzumab pourra être repris (17). Trois agents anti-HER2, avec un mécanisme d'action différent du trastuzumab, ont été récemment développés (lapatinib, pertuzumab et trastuzumab emtansine) et, malgré des données limitées, ces nouvelles molécules semblent moins cardiotoxiques (18).

Les traitements ciblés contre le récepteur du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) réduisent l'angiogenèse tumorale au prix d'une toxicité cardio-vasculaire significative. Ces thérapies ciblées incluent des anticorps monoclonaux (bevacizumab, ramucirumab) et des inhibiteurs de tyrosine kinase (sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, carbosantinib, ponatinib, vandetanib, aflibercept). Elles sont utilisées dans plusieurs variétés de cancers (cancer du poumon, du rein, du colon, de l'estomac, du foie, de la thyroïde, sarcome des tissus mous, GIST, glioblastome).

Tous les inhibiteurs de l'angiogenèse disponibles sur le marché sont associés à l'apparition d'une HTA. L'incidence globale de cette HTA, tous grades et traitements confondus, est de 25 %, avec une HTA sévère dans 7 à 8 % des cas (19, 20). Le mécanisme moléculaire est partiellement compris : l'inhibition du VEGF diminue la production de monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur, et empêche la formation de nouveaux vaisseaux sanguins

(phénomène de raréfaction capillaire), aboutissant à l'augmentation des résistances vasculaires périphériques (21). L'apparition précoce d'une HTA systolique ou diastolique sous bevacizumab ou sunitinib pourrait même constituer un marqueur prédictif (surrogate marker) d'une réponse favorable au traitement, mais ce point est encore débattu à l'heure actuelle (22). Les spécialistes recommandent une évaluation rigoureuse des facteurs de risque cardio-vasculaire et un contrôle strict de la pression artérielle (PA) avant de débiter ce type de traitement. Une fois instauré, la PA devra être mesurée régulièrement, surtout les 2 premières semaines. Les patients qui développent une HTA (PA > 140/90 mmHg ou PA diastolique > 20 mmHg par rapport au départ) devront être traités avec pour objectif une PA < 140/90 mmHg, et < 130/80 mmHg en cas de diabète ou d'insuffisance rénale chronique. Le choix de l'antihypertenseur est guidé par les comorbidités du patient. On évitera les inhibiteurs du CYP3A4 (p.ex. verapamil, diltiazem) avec le sorafenib et le sunitinib qui sont partiellement métabolisés via cette enzyme. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les bêta-bloquants peuvent généralement être utilisés, notamment le nebivolol (Nobiten®) qui augmente la libération endothéliale de NO (23).

Une augmentation du risque d'accident thromboembolique artériel (ATE) a été associée à l'utilisation du bevacizumab, de l'aflibercept et du ramucirumab. La physiopathologie de cet effet secondaire n'est pas connue. On suppose qu'en inhibant le VEGF, ces drogues diminuent les propriétés anticoagulantes de la membrane endothéliale. Pour cette raison, on évitera d'utiliser les anti-angiogénèses chez des patients avec un antécédent d'ATE dans les 6 à 12 mois. L'augmentation du risque d'accident thromboembolique veineux sous inhibiteurs de l'angiogénèse n'est pas claire (24).

Les anti-VEGF, en particulier le sunitinib, peuvent aussi provoquer une diminution de la FEVG et un allongement de l'espace QT. Il est donc nécessaire de réaliser une échocardiographie et un ECG avant de débiter le traitement et d'assurer une surveillance rapprochée, en particulier chez le sujet âgé (25).

MÉTHODES DE DÉTECTION DE LA CARDIOTOXICITÉ INDUITE PAR LES AGENTS ANTI-CANCÉREUX

La méthode de surveillance la plus utilisée à l'heure actuelle est l'échographie cardiaque

bidimensionnelle (2D). Cependant, il n'existe pas de recommandations claires des sociétés scientifiques concernant les modalités de ce suivi (fréquence, durée, type d'examen). L'échographie cardiaque 2D est malheureusement peu sensible pour détecter la cardiotoxicité liée aux traitements anti-cancéreux. Ceci est principalement dû au fait que la FEVG diminue tardivement dans le décours de l'atteinte cardiaque et que l'examen est opérateur-dépendant (2). Il est donc primordial d'évaluer de nouvelles méthodes afin d'identifier et traiter rapidement les patients concernés.

MÉTHODES BIOLOGIQUES

Le rôle des biomarqueurs dans la détection précoce de la toxicité cardiaque des traitements anti-cancéreux doit encore être validé par des études prospectives. Les biomarqueurs représentent cependant un potentiel intéressant, car ils sont facilement accessibles.

La troponine I est un marqueur sensible et spécifique de la lésion myocardique, comme l'infarctus du myocarde ou la myocardite. Des études ont montré que les patients ayant des troponines I élevées durant et après une chimiothérapie à base d'anthracyclines pour différents types de cancer présentaient une plus haute incidence d'événements cardiaques (26, 27). L'inconvénient des troponines I est que leur augmentation implique une lyse des cellules myocardiques, ce qui n'est pas forcément le cas lors de la chimiothérapie, et leur demi-vie est relativement courte (3–12h), ce qui requiert de multiples prises de sang rapidement après le traitement.

Le NT-pro-BNP (Brain Natriuretic Peptide) est sécrété par les ventricules cardiaques lorsque ceux-ci sont distendus. Le NT-pro-BNP est un marqueur validé dans l'insuffisance cardiaque. Des études ont démontré qu'une élévation persistante du NT-pro-BNP après un traitement par anthracyclines peut être corrélée à la diminution de la FEVG en échographie. De plus, l'augmentation du NT-pro-BNP sous anthracyclines est prédictive d'une toxicité tardive du traitement. Cependant, la valeur seuil de NT-pro-BNP n'est pas encore déterminée et ce biomarqueur ne peut remplacer l'échographie pour dépister une toxicité cardiaque aiguë (28, 29).

En complément de ces biomarqueurs cardiaques classiques, de nouveaux biomarqueurs (ST2, galactine 3, microARNs, ...) sont actuellement évalués dans le dépistage de la

cardiotoxicité induite par les traitements anti-cancéreux.

MÉTHODES D'IMAGERIE

L'échographie cardiaque 2D reste l'examen de référence, car elle est facilement accessible. Cependant, comme décrit ci-dessus, la reproductibilité de l'examen est discutable. L'autre difficulté des techniques d'échographie est que le seuil pathologique pour la FEVG n'est pas fixé. Ainsi, la sensibilité de l'échographie 2D augmentera d'autant plus que le seuil pathologique est bas. L'échographie avec contraste ou tridimensionnelle (3D) pourrait, dans l'avenir, remédier à ces problèmes, mais les données sont actuellement insuffisantes (30).

Pour les patients qui présentent une FEVG comprise entre 50 et 59 % en échographie 2D, une exploration complémentaire peut être préconisée. La ventriculographie isotopique (MUGA scan) et l'IRM cardiaque permettent de détecter des modifications de la structure ou de la fonction cardiaque liées aux drogues cytotoxiques lorsque les résultats de l'échographie sont sub-optimaux. Ces examens ont comme inconvénient de ne pas être facilement accessibles (30).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le panel d'agents anti-cancéreux avec une cardiotoxicité potentielle devient de plus en plus large. Dans ce domaine, la prévention est la clé. Les médecins généralistes et les oncologues doivent en effet traiter précocement les facteurs de risque cardio-vasculaires chez les patients, particulièrement lorsque l'objectif du traitement est curatif. Une collaboration dynamique avec les cardiologues est également indispensable afin d'identifier les patients à risque et de détecter rapidement une toxicité cardiaque. Le monitoring optimal des patients sous traitements oncologiques cardiotoxiques fait l'objet de recommandations internationales (31), mais de nombreuses questions restent encore sans réponse. Une étude prospective sur la cardiotoxicité observée dans le traitement du cancer du sein est en cours en Europe. L'objectif est d'obtenir des données supplémentaires sur le dépistage, le monitoring et le traitement de ces patientes (32).

BIBLIOGRAPHIE

1. Meinardi MT, Gietema JA, van Veldhuisen DJ et al.— Long-term chemotherapy-related cardiovascular morbidity. *Cancer Treat Rev*, 2000, **26**, 429–47.
2. Curigliano G, Cardinale D, Suter T et al.— Cardiovascular toxicity induced by chemotherapy, targeted agents and radiotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*, 2010, **21** (Suppl 5), v277–82.
3. Sandhu H, Maddock H.— Molecular basis of cancer-therapy-induced cardiotoxicity: introducing microRNA biomarkers for early assessment of subclinical myocardial injury. *Clin Sci*, 2014, **126**, 377–400.
4. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM et al.— Female sex and drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *N Engl J Med*, 1995, **332**, 1738–43.
5. Kremer LC, van Dalen EC, Offringa M et al.— Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term follow-up study. *J Clin Oncol*, 2000, **19**, 191–6.
6. Hensley ML, Hagerty KL, Kewalramani T et al.— American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *J Clin Oncol*, 2009, **27**, 127–45.
7. Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ et al.— Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*, 2010, **10**, 337.
8. van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LCM.— Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004, CD003917–7.
9. Saif MW, Shah MM, Shah AR.— Fluoropyrimidine-associated cardiotoxicity: revisited. *Expert Opin Drug Saf*, 2009, **8**, 191–202.
10. Stewart T, Pavlakis N, Ward M.— Cardiotoxicity with 5-fluorouracil and capecitabine: more than just vasospastic angina. *Intern Med J*, 2010, **40**, 303–7.
11. Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL et al.— Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol*, 2005, **23**, 7685–96.
12. Gottdiener JS, Appelbaum FR, Ferrans VJ et al.— Cardiotoxicity associated with high-dose cyclophosphamide therapy. *Arch Intern Med*, 1981, **141**, 758–63.
13. Appelbaum F, Strauchen JA, Graw RG et al.— Acute lethal carditis caused by high-dose combination chemotherapy. A unique clinical and pathological entity. *Lancet*, 1976, **1**(7950), 58–62.
14. Huddart RA, Norman A, Shahidi M et al.— Cardiovascular disease as a long-term complication of treatment for testicular cancer. *J Clin Oncol*, 2003, **21**, 1513–23.
15. Cuppon F, Bria E, Verma S et al.— Do adjuvant aromatase inhibitors increase the cardiovascular risk in postmenopausal women with early breast cancer? Meta-analysis of randomized trials. *Cancer*, 2008, **112**, 260–7.
16. Fox KF.— The evaluation of left ventricular function for patients being considered for, or receiving Trastuzumab (Herceptin) therapy. *Br J Cancer*, 2006, **95**, 1454–4.

17. Romond EH, Perez EA, Bryant J et al.— Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2005, **353**, 1673–84.
18. Fedele C, Riccio G, Malara AE et al.— Mechanisms of cardiotoxicity associated with ErbB2 inhibitors. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, **134**, 95–602.
19. An MM, Zou Z, Shen H et al.— Incidence and risk of significantly raised blood pressure in cancer patients treated with bevacizumab: an updated meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010, **66**, 813–21.
20. Zhu X, Stergiopoulos K, Wu S.— Risk of hypertension and renal dysfunction with an angiogenesis inhibitor sunitinib: systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol*, 2009, **48**, 9–17.
21. Sica DA.— Angiogenesis inhibitors and hypertension: an emerging issue. *J Clin Oncol*, 2006, **24**, 1329–31.
22. Hurwitz HI, Douglas PS, Middleton JP et al.— Analysis of early hypertension and clinical outcome with bevacizumab: results from seven phase III studies. *Oncologist*, 2012, **18**, 273–80.
23. Maitland ML, Bakris GL, Black HR et al.— Initial assessment, surveillance, and management of blood pressure in patients receiving vascular endothelial growth factor signaling pathway inhibitors. *J Natl Cancer Inst*, 2010, **102**, 596–604.
24. Zangari M, Fink LM, Elice F et al.— Thrombotic events in patients with cancer receiving antiangiogenesis agents. *J Clin Oncol*, 2009, **27**, 4865–73.
25. Force T, Krause DS, Van Etten RA.— Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer*, 2007, **7**, 332–44.
26. Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A et al.— Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *J Am Coll Cardiol*, 1999, **36**, 517–22.
27. Cardinale D, Sandri MT, Colombo A et al.— Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation*, 2004, **109**, 2749–54.
28. Germanakis I, Anagnostatou N, Kalmanti M.— Troponins and natriuretic peptides in the monitoring of anthracycline cardiotoxicity. *Pediatr Blood Cancer*, 2008, **51**, 327–33.
29. Vogelsang TW, Jensen RJ, Hesse B, Kjaer A.— BNP cannot replace gated equilibrium radionuclide ventriculography in monitoring of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Int J Cardiol*, 2008, **124**, 193–7.
30. Armstrong GT, Plana JC, Zhang N, et al.— Screening adult survivors of childhood cancer for cardiomyopathy: comparison of echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging. *J Clin Oncol*, 2012, **30**, 2876–84.
31. Plana JC, Galderisi M, Barac A et al.— Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Amer Soc Echocardiogr*, 2014, **27**, 911–39.
32. Jerusalem G, Moonen M, Frères P, Lancellotti P.— The European Association of Cardiovascular Imaging/Heart Failure Association Cardiac Oncology Toxicity Registry: long-term benefits for breast cancer treatment. *Future Oncology*, 2015, Web. DOI: 10.2217/fof.15.227.

Les demandes de tirés à part doivent être adressées au Dr P. Frères, Service d'Oncologie médicale, CHU de Liège, Site Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.
Email : pierre.freres@gmail.com

Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer

Nicolas Bovy¹, Benoît Blomme¹, Pierre Frères², Stella Dederen¹, Olivier Nivelles¹, Michelle Lion¹, Oriane Carnet³, Joseph A. Martial¹, Agnès Noël³, Marc Thiry⁴, Guy Jérusalem⁵, Claire Josse², Vincent Bours², Sébastien P. Tabruyn¹ and Ingrid Struman¹

¹ Laboratory of Molecular Angiogenesis, GIGA-R, University of Liège, Belgium

² Laboratory of Human Genetics, GIGA-R, University of Liège, Belgium

³ Laboratory of Tumor & Development Biology, GIGA-R, University of Liège, Belgium

⁴ Laboratory of Cell and Tissues Biology, University of Liège, Belgium

⁵ Department of Medical Oncology, CHU, Liège, Belgium

Correspondence to: Ingrid Struman, **email:** i.struman@ulg.ac.be

Keywords: Exosomes, microRNAs, Cancer, miR-503, Angiogenesis

Received: January 30, 2015

Accepted: February 17, 2015

Published: March 10, 2015

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The interaction between tumor cells and their microenvironment is an essential aspect of tumor development. Therefore, understanding how this microenvironment communicates with tumor cells is crucial for the development of new anti-cancer therapies. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that inhibit gene expression. They are secreted into the extracellular medium in vesicles called exosomes, which allow communication between cells via the transfer of their cargo. Consequently, we hypothesized that circulating endothelial miRNAs could be transferred to tumor cells and modify their phenotype. Using exogenous miRNA, we demonstrated that endothelial cells can transfer miRNA to tumor cells via exosomes. Using miRNA profiling, we identified miR-503, which exhibited downregulated levels in exosomes released from endothelial cells cultured under tumoral conditions. The modulation of miR-503 in breast cancer cells altered their proliferative and invasive capacities. We then identified two targets of miR-503, CCND2 and CCND3. Moreover, we measured increased plasmatic miR-503 in breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy, which could be partly due to increased miRNA secretion by endothelial cells. Taken together, our data are the first to reveal the involvement of the endothelium in the modulation of tumor development via the secretion of circulating miR-503 in response to chemotherapy treatment.

INTRODUCTION

The tumor microenvironment includes a variety of cell types: fibroblasts, immune and endothelial cells, pericytes, and local and bone marrow-derived cells, surrounded by matrix components [1]. The crosstalk of this microenvironment with tumor cells is essential for tumor development, adaptation and metastasis formation [2]. Moreover, the blood supply plays a crucial role in cancer

progression, allowing access to oxygen and nutrients that support tumor growth and eliminate metabolic waste. Thus, angiogenesis, the process by which new blood vessels arise from preexisting ones, is a crucial step in the progression of tumor development and metastases dissemination, and the blockade of angiogenesis is a promising strategy for the development of new cancer therapies [3]. However, drugs that inhibit tumor blood vessel formation by blocking the VEGF pathway have presently produced limited improvement in the clinical

setting [4]. Consequently, a better understanding of the interactions between cancer cells and the tumor microenvironment is necessary to unravel the complexity of tumor physiology and to limit the development of resistance mechanisms during anti-cancer treatments.

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that are essential for the regulation of various physiological and pathological processes, including development, differentiation, proliferation and cancer [5,6]. These transcripts bind to the 3' untranslated regions (UTRs) of messenger RNAs to either induce their degradation or inhibit their translation into proteins [7,8]. Cell-free miRNAs were found inside exosomes within biological fluids a few years ago [9,10]. Exosomes are small vesicles, ranging from 30 to 100 nm in size, composed of RNAs, microRNAs, and soluble and membranous proteins [11,12]. There is accumulating evidence that these organelles play a key role in intercellular communication via the transfer of their molecular contents [13–15]. Furthermore, recent findings demonstrate that circulating miRNAs are promising biomarkers for the diagnosis of several pathologies, demonstrating the notable abilities to discriminate between cancer types and stages and to monitor treatment responses [16–18].

Several studies have demonstrated that tumor exosomes are able to modulate the tumor microenvironment by activating angiogenesis, promoting the formation of cancer-associated fibroblasts (CAFs) and modulating the immune response [19–22]. However, little information is known regarding the role of exosomes derived from cells of the tumor microenvironment on the regulation of tumor cell metabolism. In the present study, we examined the potential transfer of miRNAs from endothelial to tumor cells via exosomes and their role in tumor behavior. We identified the endothelial miRNA miR-503, the expression of which is regulated by breast cancer neoadjuvant chemotherapy and which is able to inhibit tumor cell proliferation and invasion.

RESULTS

Endothelial exosomes allow the transfer of miRNAs to tumor cells

To investigate the role of circulating endothelial miRNAs on tumor cell physiology, we prospectively isolated and characterized exosomes from human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). As demonstrated by dynamic light scattering, exosomes from endothelial cells show the typical size range of these vesicles, with a maximum peak at approximately 95 nm (Fig. 1A). Flow cytometry analysis also confirmed the presence of two well-known exosomal markers, CD63 and CD9, on the exosome surface (Fig. 1B-C). Because

the membranous protein composition of the exosomes is representative of the originating cells, we compared the presence of endothelial markers on HUVECs and HUVEC exosomes. As expected, both compartments presented a similar composition of markers, including $\alpha v \beta 3$ integrins, CD31, CD105, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 and VE-cadherin. However, VEGFR2, which was strongly expressed on HUVECs, was not found on exosomes (Fig. 1D and Fig. S1A-P). In addition, electron microscopy visualization of the exosomes also revealed a characteristic cup-shaped morphology, with a diameter of approximately 100 nm. Furthermore, immunogold labeling was positive for the exosome marker CD63 and the endothelial marker CD105 (Fig. 1E).

Next, using an exogenous mouse miRNA that is not conserved in humans, mmu-miR-298, we sought to investigate the ability of endothelial cells to transfer miRNAs to human tumor cells. The miRNA was overexpressed in HUVECs, and the transfection efficiency was monitored using qRT-PCR (Fig. S1Q). Transfected HUVECs were then placed in a transwell coculture system with the cells separated by a membrane with 0.2- μ m pores to prevent the transfer of miRNAs from other vesicles. This assay was applied to four tumor cell lines (lung carcinoma: A549, colorectal carcinoma: HCT116, breast adenocarcinoma: MDA-MB-231, and glioblastoma: U87) (Fig. 1F). Whereas HCT116 cells presented markedly low levels of mmu-miR-298, the three other tumor cell lines showed significant incorporation of the exogenous miRNA after 48 h. Exosomes were also purified from endothelial cells overexpressing mmu-miR-298, and the presence of the miRNA in exosomes was assessed using qRT-PCR (Fig. S1R). In addition, mmu-miR-298- and control-loaded exosomes were incubated with the various tumor cell lines. As observed in the coculture system, mmu-miR-298 was detected in all cell lines, but HCT116 cells still displayed reduced transfer levels (Fig. 1G).

To study the interaction of endothelial exosomes with tumor cells, we labeled exosomes with the fluorescent lipid dye PKH67 and monitored uptake by the four tumor cell lines. Fluorescence microscopy revealed that all of the cell lines took up the exosomes, but the uptake by HCT116 cells was less pronounced (Fig. 1I). This observation was confirmed via flow cytometry (Fig. 1H). Notably, the exosome incorporation profile was similar to the mmu-miR-298 levels transferred via either coculture or endothelial exosomes, suggesting a major contribution by exosomes in the transfer of miRNAs. Moreover, the variation in uptake efficiencies between different tumor cell types strongly suggests the selective incorporation of endothelial exosomes. To further visualize the mechanism of exosome capture, we monitored exosome uptake over time using electron microscopy. For that experiment, we chose the MDA-MB-231 cell line, as these cells displayed a high level of exosome incorporation. If no exosomes were added to tumor cells, no specific patterns could be

observed inside the endocytic vesicles. However, after 2 hours, entities with the characteristic cup shape of exosomes could already be observed inside the endosomes; these entities accumulated over time, as observed after 8 and 24 h (Fig. 1J). These data demonstrate that endothelial exosomes are taken up by tumor cells via endocytosis to allow the intercellular transfer of miRNAs.

The tumor environment modifies the export of a subset of endothelial miRNAs

Several studies have shown that miRNAs can be transferred from tumor cells to modulate angiogenesis. Here, we speculated that the exchange could also occur in the opposite direction. We hypothesized that tumor cells might elicit an anti-tumor response through the secretion of miRNAs from the endothelium. We thus

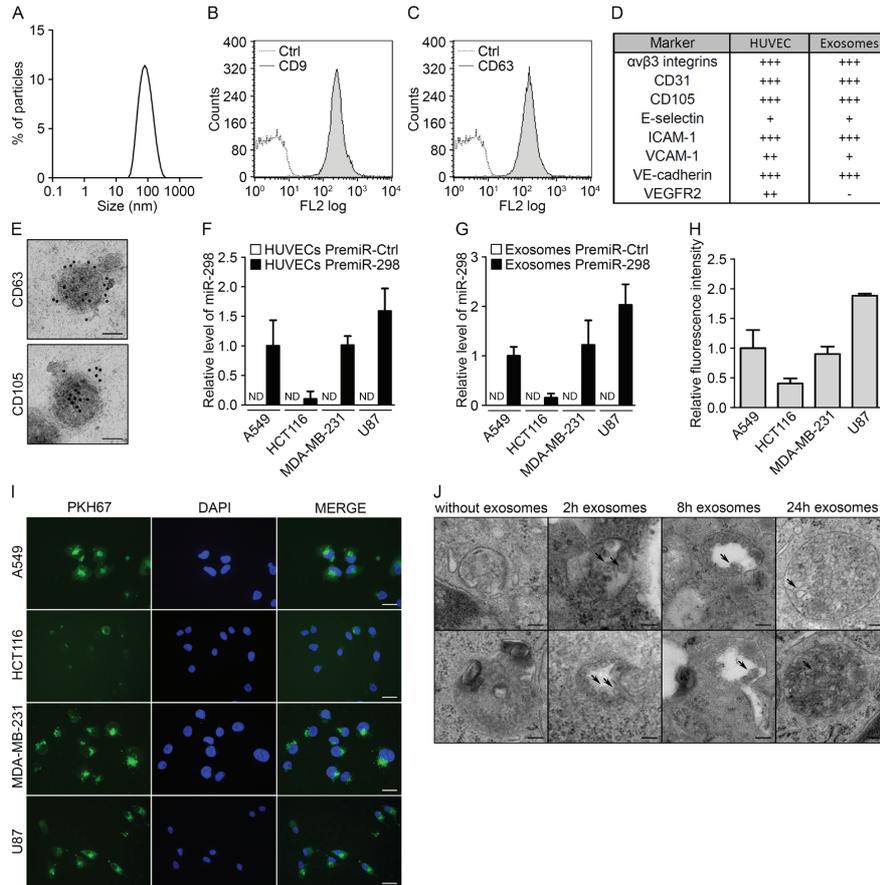


Figure 1: Endothelial exosomes can transfer miRNAs to tumor cells. (A) Dynamic light scattering analysis of HUVEC exosomes (max = 94.93). Flow cytometry analysis of HUVEC exosomes immunolabeled for (B) CD9 and (C) CD63. (D) Table summarizing the levels of endothelial markers in HUVECs and HUVEC exosomes, measured using flow cytometry. (E) Electron micrographs of HUVEC exosomes labeled with CD63 and CD105, scale bars = 50 nm. (F) MiR-298 levels evaluated using qRT-PCR in cocultures either of tumor cells with HUVECs transfected with pre-miR-control or pre-miR-298 or (G) of tumor cells incubated with exosomes from HUVECs transfected with pre-miR-control or pre-miR-298. (H) Flow cytometry analysis of the uptake of exosomes (labeled with the green fluorescent PHK67 membrane linker) by tumor cells. (I) Fluorescence microscopy detection of the uptake of PHK67-labeled exosomes by tumor cells (DAPI, blue), scale bars = 25 μ m. (J) Electron micrographs of MDA-MB-231 cell sections showing vesicles (arrows); after incubation with HUVEC exosomes for 0, 2, 8 and 24 hours, MDA-MB-231 cells showed larger multivesicular vesicles containing exosomes, scale bars = 100 nm. All data are the mean \pm SD (n \geq 3). *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 vs. the respective control. Additionally, see Fig. S1.

investigated the miRNA content of endothelial exosomes to identify miRNAs that could modify tumor growth. We first performed miRNA expression profiles using PCR panels (Exiqon) to compare between HUVECs and their exosomes. As observed in other studies [9,23], most of the miRNAs were expressed at similar levels in cells and exosomes, although some were detected only in cells (10 miRNAs) or in exosomes (16 miRNAs) (Fig. 2A-B and Fig. S2A). To identify endothelial miRNAs that could

affect tumor development, we then profiled the miRNA content of exosomes from HUVECs cultured in a basal medium or in a tumor-mimicking medium enriched with growth factors. Basal medium was composed of 5% serum whereas tumoral medium contained a mix of growth factors optimized for HUVECs culture supplemented everyday with high doses of VEGF (50 ng/ml) and bFGF (20 ng/ml). Indeed, these two molecules are well-known activators of tumor angiogenesis [24]. As measured by

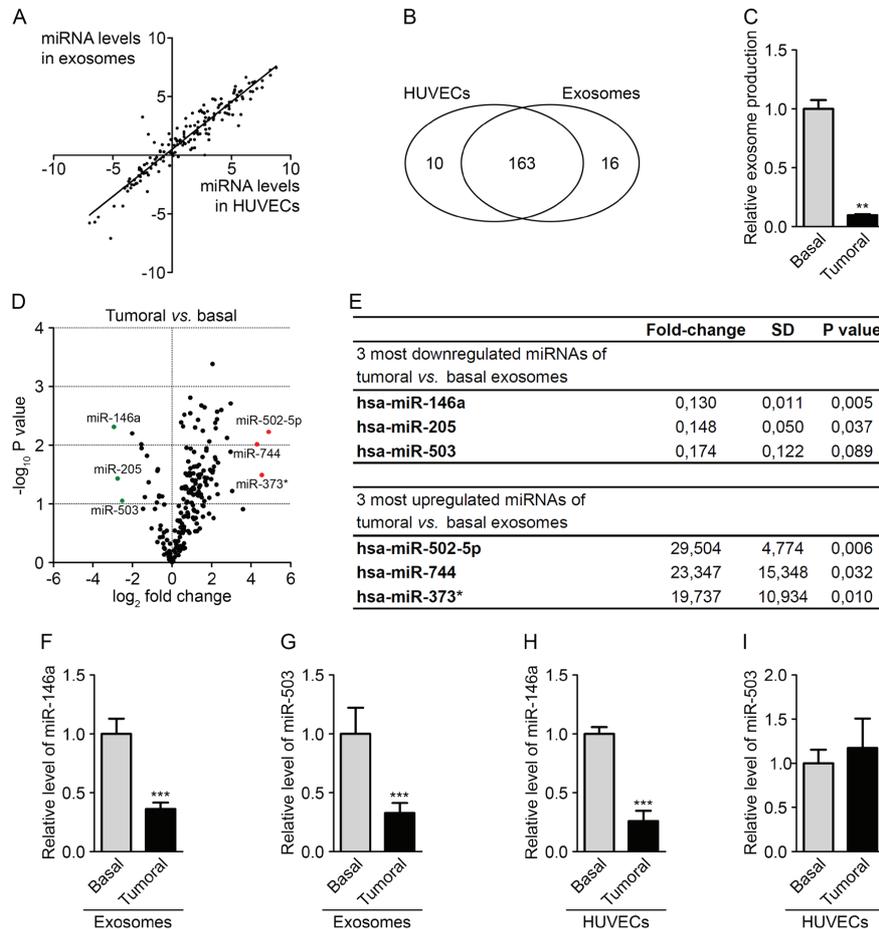


Figure 2: The tumor environment modifies the export of a subset of endothelial miRNAs. (A) Dot plot of miRNA levels in HUVECs compared with HUVEC exosomes. (B) Diagram of miRNAs common and specific to HUVECs and HUVEC exosomes. (C) Exosome levels measured by protein quantification from the conditioned medium of HUVECs cultured in basal and tumor-mimicking medium conditions. (D) Volcano plot of fold changes (\log_2 values) and probability values ($-\log_{10}$) for individual miRNAs in the exosomes from HUVECs cultured under basal and tumoral conditions. (E) Table of the three most upregulated and downregulated miRNAs under tumoral vs. basal conditions. MiR-146a (F) and miR-503 (G) levels, evaluated by qRT-PCR in HUVEC exosomes cultured under tumoral or basal conditions. MiR-146a (H) and miR-503 (I) levels, evaluated by qRT-PCR in HUVECs cultured in tumoral or basal conditions. All data are the mean \pm SD (A-E, n = 2; F-I, n = 3). *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 vs. the respective control. Additionally, see Fig. S2.

protein quantification, the first notable observation was the radical decrease in the level of exosome secretion in HUVECs cultured in the tumor medium compared with those cultured in the basal medium (Fig. 2C). Only miRNAs that were detected in all samples, displayed a variation lower than 2 between replicates and an individual Ct value lower than 40 were considered for further analysis. These criteria led to the selection of 204 miRNAs (Fig. S2B). When comparing the miRNA ratio derived from exosomes and HUVECs, 108 miRNAs were found to be modulated in HUVEC-derived exosomes by at least twofold (Fig. 2 D-E and Table S1). As shown in the volcano plot, the 3 most upregulated miRNAs were miR-502-5p, miR-744 and miR-373*, whereas the most downregulated miRNAs were miR-146a, miR-205 and miR-503 (Fig. 2D-E). For further investigation, we examined the 3 most downregulated miRNAs, which, according to our hypothesis, might exhibit antitumor properties. The decreased miR-146a and miR-503 levels in tumoral and basal exosomes were confirmed using TaqMan microRNA assays; however, we were unable to confirm the alteration in miR-205 levels (Fig. 2F-G). Interestingly, we observed that miR-146a levels were also decreased in the exosome-producing endothelial

cells, whereas miR-503 levels were not modified under tumor-mimicking conditions (Fig. 2H-I). We then decided to further study miR-503 because this miRNA undergoes a selective export mechanism under tumor-mimicking conditions. In addition, miR-503 is a member of the extended miR-16 family, which has been widely described in the literature as an anti-tumor miRNA that regulates cell cycle progression and the proliferation status of cells [25–27].

Endothelial miR-503 impairs tumor growth *in vitro*

To investigate the impact of miR-503 on tumor growth, we performed gain- and loss-of-function studies. MDA-MB-231 cells were transfected with either pre- or anti-miR-503, and the transfection efficiency was monitored using qRT-PCR (Fig. S3A). We used MDA-MB-231 constitutively expressing luciferase to quantify the proliferation in a coculture system by measuring the luminescence. Moreover, tumor cell invasion was assessed by quantifying the sprouting of tumor spheroids in a 3D collagen matrix. Increasing miR-503 levels

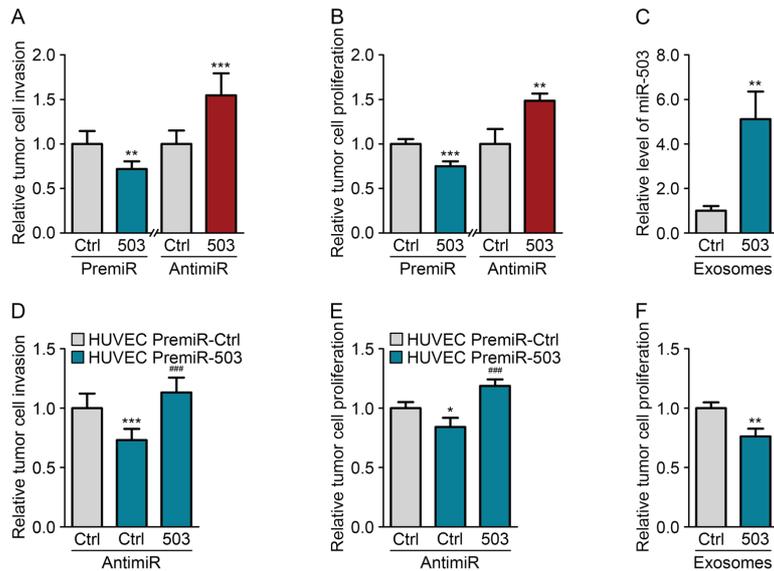


Figure 3: Endothelial miR-503 impairs tumor growth *in vitro*. (A) Invasion level of MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-control or pre-miR-503 and with anti-miR-control or anti-miR-503. (B) Luminescence quantification of MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-control or pre-miR-503 and with anti-miR-control or anti-miR-503. (C) MiR-503 levels, measured by qRT-PCR in MDA-MB-231 cells incubated with 5 μ g of HUVEC exosomes for 24 h. (D) Invasion level of MDA-MB-231 cells transfected with anti-miR-control or anti-miR-503 and cocultured with HUVECs transfected with pre-miR-control or pre-miR-503. (E) Luminescence quantification of MDA-MB-231 cells transfected with anti-miR-control or anti-miR-503 and cocultured with HUVECs transfected with pre-miR-control or pre-miR-503. (F) Luminescence quantification of MDA-MB-231 cells incubated with exosomes from HUVECs transfected with pre-miR-control or pre-miR-503. Additionally, see Fig. S3.

via the transfection of miRNA mimics (pre-miRs) in MDA-MB-231 cells decreased both cell proliferation and invasion. Conversely, inhibition of miR-503 via the transfection of miR-503 antisense LNAs (anti-miRs) resulted in increased levels both of these processes compared with those of the control (Fig. 3A-B). Moreover, the effects of modulating miR-503 on tumor proliferation and invasion were confirmed by measuring BrdU incorporation and performing Boyden chamber assays, respectively (Fig. S3B-C).

We next sought to explore the effect of endothelial-derived miR-503 on MDA-MB-231 cells. For this purpose, HUVECs were transfected with pre-miR-503, and the transfection efficiency was monitored using qRT-PCR (Fig. S3D). The effective transfer of the miRNA was then assessed using endothelial exosomes loaded with miR-503. Upon incubation of miR-503-loaded exosomes with MDA-MB-231 cells, we observed increased miRNA levels in the cells using qRT-PCR (Fig. 3C). We next investigated whether miR-503 secreted from endothelial cells could modify the phenotype of MDA-MB-231 cells. HUVECs overexpressing miR-503 were cocultured with MDA-MB-231 cells, which led to reduced tumor cell proliferation and invasion compared with those under

control conditions (Fig. 3D-E). Importantly, the addition of anti-miR-503 into tumor cells rescued the effects of endothelial miR-503 in both functional assays. This observation suggests that miR-503 is the main effector of tumor cell proliferation and invasion inhibition in endothelial exosomes. To confirm that these effects were caused by the transfer of endothelial miR-503 via exosomes, we treated MDA-MB-231 cells with miRNA-loaded HUVEC exosomes. This treatment also resulted in reduced MDA-MB-231 proliferation compared with the cells treated with mock HUVEC exosomes (Fig. 3F).

MiR-503 inhibits CCND2 and CCND3 expression of MDA-MB-231

To explore the molecular mechanism responsible for the inhibition of tumor cell proliferation and invasion by miR-503, we searched for target genes of the miRNA involved in those mechanisms. We used a computational approach involving the Targetscan algorithm (<http://www.targetscan.org/>) to obtain a list of genes predicted to be targets of miR-503. We then used the STRING algorithm (<http://string-db.org/>), which creates a network between

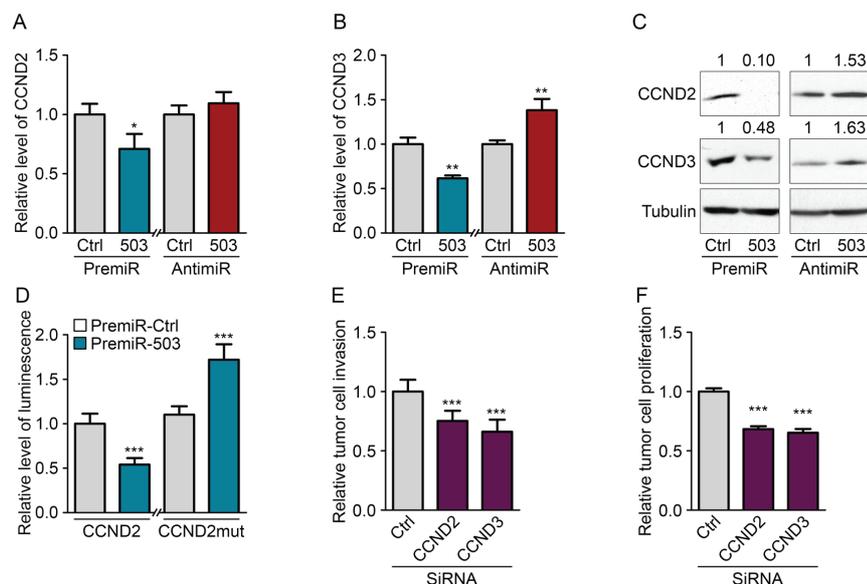


Figure 4: MiR-503 inhibits CCND2 and CCND3 expression of MDA-MB-231. Quantification of mRNA levels according to qRT-PCR of (A) CCND2 and (B) CCND3 in MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-503 or pre-miR-control and with anti-miR-control or anti-miR-503 and starved for 36 h. (C) Western blotting of CCND2 and CCND3 in MDA-MB-231 cells transfected with pre-miR-503 or pre-miR-control and with anti-miR-control or anti-miR-503 and starved for 36 h. (D) Luciferase activity from the CCND2 3'-UTR WT reporter plasmid and mutated NRAS 3'-UTR reporter plasmid cotransfected into MDA-MB-231 cells with pre-miR-control or pre-miR-503 after 24 hours. (E) Invasion levels of MDA-MB-231 cells transfected with siRNAs targeting CCND2 and CCND3. (F) Luminescence quantification of MDA-MB-231 cells transfected with siRNAs targeting CCND2 and CCND3. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. the respective control. ### $P < 0.001$ vs. miR-503-exosomes with anti-miR-control. Additionally, see Fig. S4.

proteins that have functional or physical interactions, to identify associations between predicted targets of miR-503. We observed the presence of a large cluster of proteins that influence cell cycle progression and pathways that regulate the proliferation/apoptosis status of cells (Fig. S4C). Using qRT-PCR, we tested a subset of miR-503 target genes that displayed many links with each other to identify the genes responsible for the observed anti-tumor phenotype. From this subset of genes, we identified two targets of miR-503, CCND2 and CCND3, which are downregulated at the RNA and protein levels upon overexpression of the miRNA (Fig. 4A-C). Importantly, inhibiting endogenous miR-503 using anti-miR transfection led to increased CCND2 and CCND3 protein levels. The interaction sites of miR-503 and the CCND2 and CCND3 3'-UTRs are pictured in Fig S4D. Notably, expression of the homologue CCND1 was not affected by miR-503 even though this gene is a validated target of miR-503 (Fig. S4A-B). Because CCND2 has never been described as a target of miR-503, we analyzed whether the miRNA directly interacts with its 3'-UTR. Indeed, there are 3 binding sites for miR-503 in the CCND2 3'-UTR: one 8-mer site and two 7-mer-1A sites. We therefore constructed a luciferase reporter vector that encoded the 3'-UTR of CCND2 downstream of the luciferase coding sequence. Reduced luciferase activity was observed in MDA-MB-231 cells transfected with the vector; these cells were also observed to overexpress miR-503 compared with that of the control (Fig. 4D). Moreover, when the sequences that bind the seed region of miR-503 were mutated in the CCND2 3'-UTR, the miRNA was no longer able to inhibit translation of the luciferase mRNA, leading to normalized luminescence levels.

We next determined whether the inhibition of CCND2 and CCND3 was responsible for the inhibition of tumor cell proliferation and invasion observed upon miR-503 modulation. Indeed, silencing CCND2 and CCND3 in MDA-MB-231 cells with siRNA led to decreased proliferation and invasion (Fig. 4E-F). Taken together, these results demonstrate that endothelial-derived miR-503 induces the inhibition of tumor cell proliferation and invasion via inhibition of CCND2 and CCND3.

Neoadjuvant chemotherapy increases circulating miR-503 levels

To study the potential endothelial release of miR-503 during cancer, we analyzed the plasmatic miR-503 levels in breast cancer patients subjected to various therapies. Interestingly, we observed increased miR-503 levels in patients receiving neoadjuvant chemotherapy treatment, whereas no changes were observed in patients treated only with surgery (Fig. 4A-B and D-E). To more deeply investigate the influence of neoadjuvant chemotherapy, miR-503 levels were analyzed in tumor

biopsies and in residual tumors of patients subjected to this treatment and presenting an incomplete pathological response. Surprisingly, no changes in the miR-503 levels were observed before treatment or after post-chemotherapy surgery (Fig. 4C and F). This observation favors the view that the increased miR-503 levels in the circulation after chemotherapy do not come from the tumor. Thus, we decided to investigate whether endothelial cells could be responsible for the increased miR-503 levels upon neoadjuvant chemotherapy. We treated endothelial cells with both chemotherapeutic agents (epirubicin and paclitaxel) used in the treatment and analyzed the consequences on miR-503 expression and exosome secretion using qRT-PCR. We first observed a drastic increase in exosome production in endothelial cells treated with the chemotherapeutic agents; this effect was more pronounced with paclitaxel than with epirubicin treatment (Fig. 4G). Moreover, we observed increased miR-503 levels in exosomes following epirubicin and paclitaxel treatments compared with control conditions, whereas decreased levels were observed in exosome-producing HUVECs (Fig. 4H-I). These data suggest that the elevated circulating miR-503 levels observed in patients after neoadjuvant chemotherapy could originate in part from exosome modification and miR-503 secretion by endothelial cells.

DISCUSSION

Over the past few years, exosomes have emerged as important players in intercellular communication. Notably, several studies have demonstrated the role of tumor exosomes in regulating major processes of tumor progression, such as angiogenesis, immune modulation and metastasis dissemination. However, until now, the effects of exosomes secreted from endothelial cells on tumor cells has not been explored. Endothelial exosomes have been shown to induce several mechanisms, such as the regulation of angiogenesis in other endothelial cells [28,29] and the atheroprotective stimulation of smooth muscle cells [15]. It is well known that cells within the tumor microenvironment can act on tumor cells. In this context, a role for exosomes has emerged in the recent literature. For example, exosomes secreted from mesenchymal stem cells can regulate tumor growth, whereas exosomes from dendritic cells can induce tumor regression [30–32]. In this study, we demonstrate that endothelial cells, which are also important players in the tumor environment, produce exosomes that are able to transfer miRNAs to tumor cells. Our data reveal that this transfer involves endocytosis because incorporated exosomes are observed in endocytic vesicles inside tumor cells.

An important finding of our work is the observation that the miRNA content of endothelial exosomes differs from that of the producing cells. This phenomenon has

been described in other studies and demonstrates that, at least in part, miRNAs can be selectively packaged into exosomes [9,23]. In addition, our profiling experiment also revealed that the miRNA content of exosomes is altered by the culture conditions. This experiment led to the identification of miR-503, the exosome levels of which are decreased under tumor conditions despite cellular levels being unaffected. Notably, miR-424, which belongs to the same cluster as miR-503, also showed reduced levels

under the same conditions. MiR-503 is known to inhibit proliferation, migration and tube formation in endothelial cells under high-glucose stress conditions [33]. Moreover, miR-503 has been widely described in the literature as an anti-tumor miRNA that regulates the expression of key cell cycle proteins, such as CDC25A and cyclins D1 and E1, as well as cell proliferation via E2F3 and PI3K regulation and the apoptosis status via BCL-2 inhibition [6,25–27,33,34]. Notably, miR-503 also prevents tumor

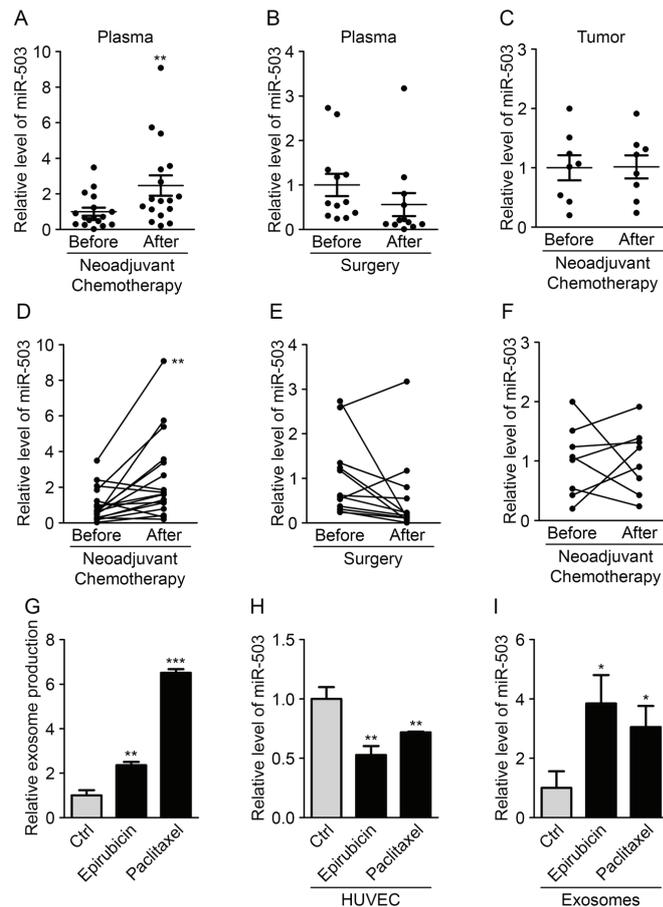


Figure 5: Neoadjuvant chemotherapy increases circulating miR-503 levels. (A) The miR-503 ratio according to qRT-PCR in blood samples of breast cancer patients before and after neoadjuvant chemotherapy. (B) The miR-503 ratio according to qRT-PCR in blood samples of breast cancer patients before and after surgery. (C) The miR-503 ratio according to qRT-PCR in tumor biopsies and residual tumors of breast cancer patients. (D) Individual follow-up of miR-503 levels, evaluated by qRT-PCR, in blood samples of breast cancer patients before and after neoadjuvant chemotherapy. (E) Individual follow-up of miR-503 levels, evaluated by qRT-PCR, in blood samples of breast cancer patients before and after surgery. (F) Individual follow-up of miR-503 levels, evaluated by qRT-PCR, in tumor biopsies and residual tumors of breast cancer patients. (G) Exosome levels, measured by protein quantification, from the conditioned medium of HUVECs treated with paclitaxel and epirubicin for 24 h. (H) The miR-503 levels, evaluated by qRT-PCR, in HUVECs treated with paclitaxel and epirubicin for 24 h. (I) The miR-503 levels, evaluated by qRT-PCR, in exosomes from HUVECs treated with paclitaxel and epirubicin for 24 h. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. the respective control.

growth by interacting with the tumor microenvironment and reducing secretion of the proangiogenic factors FGF2 and VEGF by tumor cells [35]. We obtained similar results by modulating the expression of miRNA in MDA-MB-231 cells. The overexpression of miR-503 led to decreased tumor cell proliferation and invasion in multiple assays, whereas its inhibition presented opposite results. The role of endothelial miR-503 contained in exosomes has also been investigated by coculturing HUVECs overexpressing miR-503 with tumor cells. This manipulation also led to reduced proliferative and invasive properties, which could be reversed by adding anti-miR-503 to MDA-MB-231 cells. During investigation of the mRNA targets of miR-503 to explain these effects, we identified that miR-503 regulated cyclins D2 and D3. Cyclin D3 is already a validated target of miR-503; however, the regulation of the cyclin D2 had not yet been demonstrated [26]. Overall, these data showed that endothelial cells cultured under tumoral conditions released miR-503, which can have antitumoral effects, into the medium.

Our human studies revealed a role for miR-503 in response to neoadjuvant therapy. Plasmatic miR-503 levels were elevated in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. As suggested by our *in vitro* data, the elevation of miR-503 in the blood after chemotherapy could originate, at least in part, from the increased secretion of miR-503 by endothelial cells following paclitaxel and epirubicin treatment. Because decreased miR-503 expression was observed in exosome-producing endothelial cells, it is likely that the chemotherapeutic agent promotes the transfer of miR-503 to exosomes rather than the induction of its expression.

A similar effect has been reported in endothelial cells submitted to ionizing radiation [36]. On the other hand, plasmatic levels of miR-503 of patients treated only with surgery, and tumor levels of miR-503 of patients under chemotherapy were not affected. Therefore, it is likely that endothelial circulating miR-503 would originate from the entire endothelium. As previously described by other studies, anthracyclines and taxanes induce an endothelial toxicity which also affects endothelial cells outside of the tumor [37]. Therefore, miR-503 might act as a stress-induced miRNA that is essential for cell cycle regulation. Its expression is increased upon serum starvation of mesenchymal stem cells and is modulated according to cell cycle progression [38,39]. Thus, we propose a model in which endothelial cells, in response to unfavorable conditions, such as chemotherapy or radiation treatment, release circulating miR-503 into the surrounding environment (Fig. 5). Endothelial exosomes loaded with miR-503 might then inhibit tumor growth by acting directly on tumor cells, thereby contributing to the direct effect of these therapies. To the best of our knowledge, this is the first report of a miRNA transferred from endothelial cells to tumor cells via exosomes. Our data also reveal the involvement of the endothelium in the modulation of tumor development upon chemotherapy treatment. In this context, miR-503 appears to be an antitumor miRNA secreted by endothelial cells that is able to regulate tumor cell proliferation and invasion via the inhibition of CCND2 and CCND3. This process might complement the direct effects of chemotherapy and thereby help the host fight the tumor.

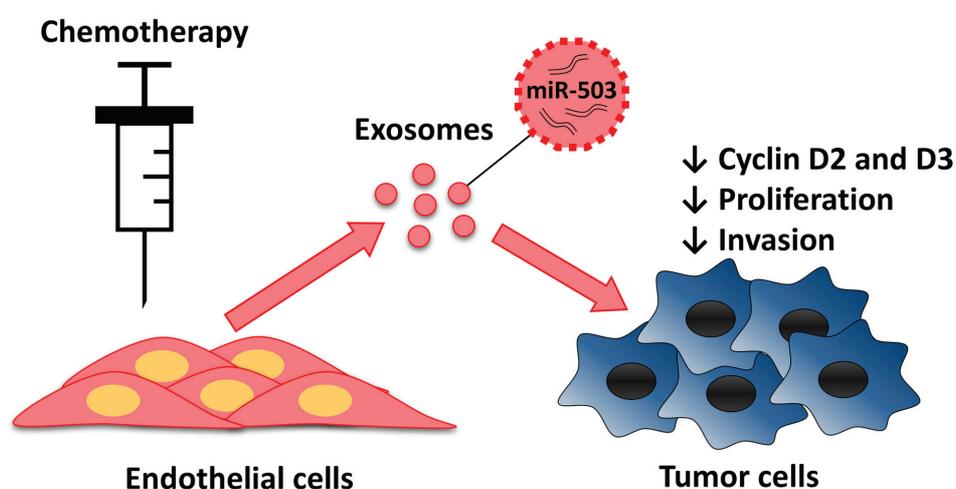


Figure 6: Endothelial transfer of miR-503 elicit antitumor response during neoadjuvant chemotherapy. Endothelial cells treated with chemotherapeutic agents release more exosomes that contain more miR-503. MiR-503 loaded exosomes induce a reduction of breast cancer cells proliferation and invasion caused by the inhibition of CCND2 and CCND3.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The isolation and culture of HUVECs (passages 6–11) were previously described [40]. A549 and U87 cells were cultured in EMEM supplemented with 10% FBS. HCT116 cells were cultured in McCoy's 5A medium supplemented with 10% FBS. MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM 4500 supplemented with 10% FBS.

Cell transfections and treatments

Pre-miRs (25 nM; Ambion) and anti-miRs (25 nM; Exiqon) were transfected into HUVECs and MDA-MB-231 cells using Dharmafect-4 (Dharmacon Research Inc.) according to the manufacturer's instructions. CCND2, CCND3 and control siRNAs (20 nM) were transfected based on the calcium phosphate transfection method. Transfected HUVECs and MDA-MB-231 cells were plated in EGM2 or complete DMEM, respectively. After a 24-hour transfection, the cells were washed and kept in their media for an additional 48 or 72 hours. Functional assays were performed as described above.

Exosome purification

Exosomes were isolated and purified from the supernatants of HUVEC cultures using the differential centrifugations. HUVECs were cultured in EGM2 medium containing exosome-depleted serum. After 72 h, the medium was collected and centrifuged at 2000 g for 15 min at 4°C and then again at 12,000 g for 45 min at 4°C. Supernatants were then passed through a 0.22- μ m filter (Millipore) and ultracentrifuged at 110,000 g for 90 min at 4°C. The pellets were then washed with phosphate buffer saline (PBS), followed by a second ultracentrifugation at 110,000 g for 90 min at 4°C, then resuspended in PBS. The protein levels of the exosome preparations were measured using the BCA Protein Assay kit (Pierce) following the manufacturer's instructions.

PKH67 labeling of exosomes

Exosomes were labeled with PKH67 dye (Sigma) according to the manufacturer's instructions, and incubated with cells for 24 h. The cells were then washed 2 times with PBS and mounted on a slide for observation under a fluorescence microscope.

Dynamic light scattering

Exosomes were suspended in PBS at a concentration of 50 μ g/mL, and analyses were performed with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd.). Intensity, volume and distribution data for each sample were collected on a continuous basis for 4 min in sets of 3.

Flow cytometry

Cells were first saturated for 30 min in PBS containing 5% BSA and incubated for 1 h at 4°C with the following antibodies: anti- α v β 3 integrin (Chemicon), anti-CD9 (Santa Cruz), anti-CD31 (Dako), anti-CD63 (BD-Biosciences), anti-CD105 (Dako), anti-E-selectin (Abcam), anti-ICAM-1 (Abcam), anti-V-CAM1 (Abcam), anti-VE-Cadherin (Enzo Life Sciences) and anti-VEGFR2 (Cell Signaling). Cells were then incubated with a biotin-coupled secondary antibody for 30 min and then incubated with streptavidin-PE for 30 min before being analyzed on the FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Exosomes were incubated for 30 min with latex beads (Invitrogen), then the exosome-coated beads were subjected to the same steps.

Patients

Ethical approval was obtained from the Institutional Review Board (Ethical Committee of the Faculty of Medicine of the University of Liège) in compliance with the Declaration of Helsinki. Patients with newly diagnosed primary breast cancer were prospectively recruited at CHU of Liège (Liège, Belgium) from July 2011 to July 2013. All patients signed a written informed consent form. This work consisted of a prospective study and did not influence the treatment of the enrolled patients; 29 patients were included in this study. Blood samples were collected into 9-mL EDTA-containing tubes. Plasma was prepared within 1 h by retaining the supernatant after double centrifugation at 4°C (10 min at 815 g and 10 min at 2500 g), then stored at -80°C.

Seventeen patients with primary locally advanced breast cancer received neoadjuvant chemotherapy (NAC) with 3 or 4 courses of alkylating agents (cyclophosphamide or fluorouracil) and anthracycline-based chemotherapy (epirubicin) followed by 3 or 12 courses of tubulin-binding agents (docetaxel or paclitaxel). Eight of these patients did not achieved pathological complete response (ypT0N0, following the AJCC-UICC classification)

For those 8 non responders, 4- μ m tumor slices from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues samples were obtained from diagnostic core-needle biopsies (2 to 3 passes in the primary tumor) and the corresponding remaining tumor. The histological statuses of all 8 tissues

samples were established with hematoxylin and eosin staining of the FFPE sections by a pathologist.

Circulating miR-503 levels were also analyzed in a cohort of twelve primary breast cancer patients that did not receive any chemotherapy, and their plasma was collected 8 days before and 3 months after surgery.

Electron microscopy of whole-mounted immunolabelled exosomes

Exosome were placed on Formvar-carbon coated nickel grids for 1 h, washed 3 times with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min. After 3 washes, grids were then incubated for 2 h with the following antibodies: anti-CD63 or anti-CD105. Exosomes were then washed 5 times and incubated with a 10 nm-gold labeled secondary antibody. They were washed 5 more times and post-fixed with 2.5% glutaraldehyde for 10 min. Samples were contrasted using 2.5% uranyl acetate for 10 min followed by 4 washes and an incubation of 10 min in lead citrate. Grids were finally washed 4 times in deionized water and examined with a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope at 80 kV.

Electron microscopy of exosome uptake in MDA-MB-231

MDA-MB-231 cells were treated with exosomes (final concentration, 20 µg/mL) dissolved in PBS. After 0, 2, 8 and 24 h pre-incubation, the MDA-MB-231 cells were washed with PBS and fixed in 2.5% glutaraldehyde/1% paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 2 h at 4°C. Then, the cells were washed 3 times in PBS for 10 min at 4°C and post-fixed for 30 min with 2% osmium tetroxide. After dehydration in graded ethanol, samples were embedded in Epon. Ultrathin sections were obtained with a Reichert Ultratuc S ultramicrotome then contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Observations were made with a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope at 80 kV.

MicroRNA profiling

Total RNA was extracted with the miRNeasy kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol, and cel-miR-39 and cel-miR-238 were spiked into the exosome samples. Reverse transcription was then performed using the miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, polyadenylation and cDNA synthesis kit (Exiqon, Denmark). Quantitative PCR was performed according to the manufacturer's instructions on microRNA Ready-to-Use PCR panel 1. The controls included reference genes, inter-plate calibrators run in triplicate (Sp3) and negative controls.

Cell coculture and functional assays

For cocultures, endothelial donor cells were seeded onto 6-well plates. After 8 hours, transwells were added, and tumor cells were seeded onto the inner part of the transwell membranes. After 48 h of incubation, tumor cells were collected and analyzed.

Proliferation assays

For the luminescence proliferation assay, MDA-MB-231 cells were transfected or incubated with transfected HUVECs on a 24-well plate. After 48 h, 150 µg/mL of luciferin was added per well, and the luminescence was quantified using the bioluminescent IVIS imaging system (Xenogen-Caliper).

For the BrdU incorporation assay, MDA-MB-231 cells were transfected and seeded into 96-well plates for 40 h. BrdU was added for 8 h, and proliferation was assessed using the Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) kit (Roche) following the manufacturer's instructions.

Spheroid invasion assay

Spheroids were prepared as previously described [41]. Briefly, spheroids composed of transfected MDA-MB-231 alone or with transfected HUVECs were allowed to form in 96-U-well suspension plates for 48 h. Spheroids were then collected and seeded for 48 h inside a 3D collagen matrix with culture medium. Pictures were taken to quantify the invasion level by measuring the area of invasion using ImageJ software.

Boyden chamber assay

Transfected MDA-MB-231 cells were seeded into 8-µm 24-well Boyden chambers (Transwell; Costar Corp) and subjected to cell invasion assays. The lower chamber was filled with 600 µL of complete DMEM, and transfected MDA-MB-231 cells were placed in 300 µL of free DMEM in the upper chamber and allowed to migrate for 4 h at 37°C. After fixation, cells were stained with 4% Giemsa and counted on the lower side of the membrane using ImageJ software.

Chemotherapy treatment of endothelial cells

HUVECs were cultured in EGM2 supplemented with 1 µg/mL epirubicin or 20 ng/mL paclitaxel. After 24 h, the medium was swapped with exosome-depleted medium, and the cells were cultured for 72 additional hours before being collected for exosome purification.

Preparation of cell extracts and Western blot analysis

Cells were washed with PBS and scraped into lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH = 7.5); 1% NP40; 0.5% sodium desoxycholate; 1 mM EDTA; protease inhibitor cocktail cOmplete Mini, EDTA free (Roche)] on ice. Insoluble cell debris was removed by centrifugation at 10,000 g for 15 min. Aliquots of protein-containing supernatant were stored at -20°C, and protein concentrations were measured using the BCA Protein Assay kit (Pierce) following the manufacturer's instructions.

Soluble cell lysates (50 µg) were resolved using SDS-PAGE (12%) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Millipore). Blots were blocked overnight with 8% milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 and probed for 1 h with the following primary antibodies: anti-CCND1 (Cell Signaling), anti-CCND2 (Cell Signaling), anti-CCND3 (Cell Signaling), and anti-beta-tubulin (ab6046, Abcam). After 3 washes with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20, antigen-antibody complexes were detected with a peroxidase-conjugated secondary antibody and the enhanced fluoro-chemiluminescent system (ECL; Pierce Biotechnology). Quantifications were performed using ImageJ software and are presented in bar graphs normalized to the levels of the corresponding loading control (β-tubulin).

RNA extraction, miRNA and mRNA expression analysis using the TaqMan microRNA assay and quantitative real-time PCR analysis.

Total RNA was extracted using the miRNeasy kit (Qiagen) following manufacturer's protocol, and cel-miR-39 and cel-miR-238 were spiked into exosome and plasma samples.

TaqMan assays were used to assess miRNA expression. Briefly, 10 ng RNA was reverse transcribed into cDNA using the TaqMan microRNA Reverse Transcription kit and the TaqMan microRNA assay

stem loop primers (Applied Biosystems). The resulting cDNAs were used for quantitative real-time PCR using the TaqMan microRNA assay and TaqMan universal PCR master mix reagents (Applied Biosystems). Thermal cycling was performed on an Applied Biosystems 7900 HT detection system (Applied Biosystems). For the cells, the relative miRNA levels were normalized to 2 internal controls, RNU-44 or RNU-48. For the plasma and exosomes, the relative miRNA levels were normalized to the 2 spiked-in miRNAs: cel-miR-39 and cel-miR-238 (Applied Biosystems).

For mRNA expression analysis, RNA was extracted using the miRNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was performed with 1 µg of total RNA and the iScript cDNA Synthesis kit (BioRad), according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA transcripts (20 ng) served as the template for quantitative real-time PCR using the SYBR green method (Roche Applied Sciences). Thermal cycling was performed on an ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). For all reactions, no-template controls were run, and random RNA preparations were also subjected to sham reverse transcription to verify the absence of genomic DNA amplification. Quantitative real-time PCR was performed using the SYBR green method (Bioline and Thermo Fisher Scientific). Thermal cycling was performed on an Applied Biosystems 7900 HT detection system (Applied Biosystems). The relative transcript level of each gene was normalized to the housekeeping genes cyclophilin-A (PPIA) and/or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Primers were designed using Primer Express software and selected to span exon-exon junctions to avoid the detection of genomic DNA (primer sequences are provided below).

Sequences of qRT-PCR primers, siRNAs and antagomir

All primers, siRNAs and control siRNAs were synthesized by IDT-DNA

Table 1: Primer sequences.

Gene	Forward primer	Reverse primer
hsa CCND1	CAATGACCCCGCACGATTTC	CATGGAGGGCGGATGGAA
hsa CCND2	CTCGAGGGATGCCAGTTGGGCC	GCGGCCGCCAAAAGCGTGAATCATTGCC
has CCND3	TACCCGCCATCCATGATCG	AGGCAGTCCACTTCAGTGC
has GAPDH	GCATCTTCTTTTGCCTCGC	CCAAATGCGTTGACTCCGA
has PPIA	CCAACACAAATGGTTCCCAGT	CCATGGCCTCCACAATATCA
Name	Sense strand	Antisense strand
siRNA CCND2	GGCAUGAUUAGAUUGCAAAGCAATG	CAUUGCUUUGCAAUCUAAUCAUGCCAU
siRNA CCND3	CUUACUGUAAUAAAAGAUGAUUGUGA	UCACAAUCAUCUUUAAUACAGUAGGAU

Luciferase assay (3'-UTR reporter assays)

MDA-MB-231 cells were transfected with 30 pmol of pre-miR-Ctrl or pre-miR-503 with 0.6 μ L of DharmaFECT-4 (Dharmacon Research, Inc.). The next day, the cells were transfected with 0.1 μ g of the psiCHECK2 vector (Promega) expressing the 3'-UTR of the human *CCND2* mRNA (nucleotides 1-2040) or the mutated 3'-UTR of the human *CCND2* mRNA (QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent) with JET-PEI (Polyplus transfection) according to the manufacturer's instructions. The wild-type region of the 3'-UTR human *CCND2* mRNA miR-503 binding seed sequences were 1: 5'-GCUGCUA-3', 2: 5'-CGUGCUA-3' and 3: 5'-GCUGCUA-3'. The mutated region of the 3'-UTR human *CCND2* mRNA miR-503 binding seed sequence were 1: 5'-AAUAAUA-3', 2: 5'-CAAUUUUA-3' and 3: 5'-AAUAAUA-3'. After 24 h, the luciferase assay was performed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Renilla luciferase activity was normalized to firefly luciferase activity.

Data analysis

All values are expressed as the mean \pm SD (*in vitro* experiments) or the mean \pm SEM (patient analyses). Comparisons between various conditions were assessed using two-tailed Student's t tests. Analyses of patients before and after treatments (Fig 4) were performed using two-tailed paired t tests. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Patricia Piscicelli for technical assistance. We thank Marie Dehuy and Christine Gilles for their help with luminescence analysis. We thank Julie Halkein, Stephanie Herkenne and Khalid Bajou for their expertise and Ngoc-Quynh-Nhu Nguyen for revising the manuscript. We would like to thank the platform support staff from the Giga Research Center, Rafaat Stephan and Sandra Ormonese (GIGA-imaging). This study was supported by the University of Liège, the FRIA (Fonds pour la Recherche Industrielle et Agricole, Belgium), the FNRS (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium), the Belgian Science Policy, the Neoangio program #616476 of the "Service Public de Wallonie", the Fonds Léon Frédéricq and the fondation belge contre le cancer.

REFERENCES

1. Suzuki HI, Katsura A, Matsuyama H, Miyazono K. MicroRNA regulons in tumor microenvironment. *Oncogene*. 2014.

2. Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J, Emara ME, Burnouf T. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer Growth Metastasis*. 2014; 7: 9–18.
3. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005; 438: 932–936.
4. Ebos JM, Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8: 210–221.
5. Li M, Li J, Ding X, He M, Cheng SY. microRNA and cancer. *AAPS J*. 2010; 12: 309–317.
6. Zhang C. MicroRNAs in vascular biology and vascular disease. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010; 3: 235–240.
7. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136: 215–233.
8. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116: 281–297.
9. Taylor DD, Gerceel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008; 110: 13–21.
10. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9: 654–659.
11. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2010; 73: 1907–1920.
12. Kharaziha P, Ceder S, Li Q, Panaretakis T. Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826: 103–111.
13. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, Bernad A, Sanchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011; 2: 282.
14. Halkein J, Tabruyn SP, Ricke-Hoch M, Haghikia A, Nguyen NQ, Scherr M, Castermans K, Malvaux L, Lambert V, Thiry M, Sliwa K, Noel A, Martial JA, et al. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2013; 123: 2143–2154.
15. Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2012; 14: 249–256.
16. Wang J, Huang SK, Zhao M, Yang M, Zhong JL, Gu YY, Peng H, Che YQ, Huang CZ. Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection. *PLoS One*. 2014; 9: e87451.
17. Freres P, Josse C, Bovy N, Boukerroucha M, Struman I, Bours V, Jerusalem G. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces miR-34a and miR-122 expression. *J*

- Cell Physiol. 2014.
18. Fu Z, Qian F, Yang X, Jiang H, Chen Y, Liu S. Circulating miR-222 in plasma and its potential diagnostic and prognostic value in gastric cancer. *Med Oncol*. 2014; 31: 164.
 19. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)*. 2013; 91: 431–437.
 20. Kucharzewska P, Belting M. Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2.
 21. Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res*. 2010; 70: 9621–9630.
 22. Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, Guan Y, Oeh J, Modrusan Z, Bais C, Sampath D, Ferrara N. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J*. 2012; 31: 3513–3523.
 23. Hessvik NP, Phuyal S, Brech A, Sandvig K, Llorente A. Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1819: 1154–1163.
 24. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011; 473: 298–307.
 25. Qiu T, Zhou L, Wang T, Xu J, Wang J, Chen W, Zhou X, Huang Z, Zhu W, Shu Y, Liu P. miR-503 regulates the resistance of non-small cell lung cancer cells to cisplatin by targeting Bcl-2. *Int J Mol Med*. 2013; 32: 593–598.
 26. Xiao F, Zhang W, Chen L, Chen F, Xie H, Xing C, Yu X, Ding S, Chen K, Guo H, Cheng J, Zheng S, Zhou L. MicroRNA-503 inhibits the G1/S transition by downregulating cyclin D3 and E2F3 in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*. 2013; 11: 195.
 27. Yang Y, Liu L, Zhang Y, Guan H, Wu J, Zhu X, Yuan J, Li M. MiR-503 targets PI3K p85 and IKK-beta and suppresses progression of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2014; 135: 1531–1542.
 28. Van Balkom BW, de Jong OG, Smits M, Brummelman J, den Ouden K, de Bree PM, van Eijndhoven MA, Pegtel DM, Stoorvogel W, Wurdinger T, Verhaar MC. Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. *Blood*. 2013; 121: 3997–4006, S1–15.
 29. Sharghi-Namini S, Tan E, Ong LL, Ge R, Asada HH. Dll4-containing exosomes induce capillary sprout retraction in a 3D microenvironment. *Sci Rep*. 2014; 4: 4031.
 30. Lee JK, Park SR, Jung BK, Jeon YK, Lee YS, Kim MK, Kim YG, Jang JY, Kim CW. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by downregulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS One*. 2013; 8: e84256.
 31. Zhu W, Huang L, Li Y, Zhang X, Gu J, Yan Y, Xu X, Wang M, Qian H, Xu W. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett*. 2012; 315: 28–37.
 32. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*. 1998; 4: 594–600.
 33. Caporali A, Meloni M, Vollenkle C, Bonci D, Sala-Newby GB, Addis R, Spinetti G, Losa S, Masson R, Baker AH, Agami R, le Sage C, Condorelli G, et al. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation*. 2011; 123: 282–291.
 34. Sarkar S, Dey BK, Dutta A. MiR-322/424 and -503 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by down-regulation of Cdc25A. *Mol Biol Cell*. 2010; 21: 2138–2149.
 35. Zhou B, Ma R, Si W, Li S, Xu Y, Tu X, Wang Q. MicroRNA-503 targets FGF2 and VEGFA and inhibits tumor angiogenesis and growth. *Cancer Lett*. 2013; 333: 159–169.
 36. Wagner-Ecker M, Schwager C, Wirkner U, Abdollahi A, Huber PE. MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells. *Radiat Oncol*. 2010; 5: 25.
 37. Soultati A, Mountzios G, Avgerinou C, Papaxoinis G, Pectasides D, Dimopoulos M-A, Papadimitriou C. Endothelial vascular toxicity from chemotherapeutic agents: preclinical evidence and clinical implications. *Cancer Treatment Reviews*. 2012; 38: 473–83.
 38. Nie Y, Han BM, Liu XB, Yang JJ, Wang F, Cong XF, Chen X. Identification of MicroRNAs involved in hypoxia- and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Int J Biol Sci*. 2011; 7: 762–768.
 39. Rissland OS, Hong SJ, Bartel DP. MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes. *Mol Cell*. 2011; 43: 993–1004.
 40. Tabruyn SP, Memet S, Ave P, Verhaeghe C, Mayo KH, Struman I, Martial JA, Griffioen AW. NF-kappaB activation in endothelial cells is critical for the activity of angiostatic agents. *Mol Cancer Ther*. 2009; 8: 2645–2654.
 41. Correa de Sampaio P, Auslaender D, Krubasik D, Fajila A V, Skepper JN, Murphy G, English WR. A heterogeneous *in vitro* three dimensional model of tumour-stroma interactions regulating sprouting angiogenesis. *PLoS One*. 2012; 7: e30753.