



Étude de l'association entre les récepteurs des cannabinoïdes et la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein

Mémoire

Jessica Morin-Buote

Maîtrise en épidémiologie - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada



Étude de l'association entre les récepteurs des cannabinoïdes et la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein

Mémoire

Jessica Morin-Buote

Maîtrise en épidémiologie

Maître ès science (M.Sc.)

Sous la direction de :

Caroline Diorio, directrice de recherche
Francine Durocher, codirectrice de recherche

Résumé

Les récepteurs cannabinoïdes (RCB) sont des récepteurs membranaires qui font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Plusieurs preuves expérimentales appuient l'idée que les cannabinoïdes seraient impliqués dans les voies de signalisation régulant la prolifération, la survie des cellules cancéreuses, l'angiogenèse ainsi que l'invasion tumorale. L'objectif de l'étude était de mesurer l'expression des RCB1 et RCB2 dans les tumeurs mammaires; et leur association avec les facteurs pronostiques connus du cancer du sein; et d'évaluer la survie globale, la survie sans récurrence et la survie sans événement. Cette étude a été réalisée dans une cohorte de 522 femmes provenant de la banque de tissu du Centre des maladies du sein (CMS) diagnostiquées d'un cancer du sein invasif non métastatique et ayant eu une mastectomie entre le 1^{er} décembre 2010 et le 30 avril 2012 au CMS à l'hôpital Saint-Sacrement à Québec, au Canada. L'expression des RCB a été mesurée par immunohistochimie. Des corrélations de Spearman ajustées ont été estimées et des modèles de risques proportionnels de Cox multivariés ont été utilisés pour estimer la survie. Cette étude a permis d'évaluer l'expression des RCB dans le tissu cancéreux mammaire. Plus l'expression du RCB1 était élevée, plus l'atteinte ganglionnaire était sévère ($r_s=0,11$; $p=0,0155$) et plus le statut du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) avait tendance à être positif ($r_s=0,17$; $p=0,0002$). Plus l'expression nucléaire du RCB2 était élevée, plus le statut des récepteurs de l'œstrogène ($r_s=0,17$; $p=0,0002$) et à la progestérone ($r_s=0,12$; $p=0,0084$) avait tendance à être positif, mais le grade tumoral était moins élevé ($r_s=-0,17$; $p=0,0002$). Une expression cytoplasmique élevée du RCB2 était associée à 13% des récurrences locorégionales et distance (HR=1,13 [0,97–1,33]), mais cette association n'était pas statistiquement significative. Ces analyses ont probablement manqué de puissance statistique. Les résultats suggèrent que l'expression des RCB pourrait être un marqueur pronostique pour le cancer du sein.

Abstract

Cannabinoids receptors (CBR) are part of the membrane receptor G protein-coupled receptor family. Experimental evidence supports the idea that cannabinoids, the active components of cannabis and their derivatives are involved in signalling pathways regulating proliferation, cancer cell survival, angiogenesis as well as tumour invasion. In the present project, the objective was to measure the expression of CB1R and CB2R in breast cancer tissue. We then assessed the association between breast cancer prognostic factors and the expression of CBR. In addition, we evaluated the expression of CBR and overall survival, recurrence-free survival and event-free survival. This study was carried out in a cohort of 522 women diagnosed with invasive breast cancer and who had a mastectomy between December 1, 2010, and April 30, 2012, at the *Centre des maladies du sein* (CMS) at Saint-Sacrement Hospital in the City of Québec, in Canada. Clinical and pathological characteristics were retrieved from the CMS database for all women and CBR expression was measured by immunohistochemistry. Adjusted partial Spearman correlations with prognostic factors were estimated and multivariate proportional hazard Cox models were used. This study allowed to evaluate the expression of CBR in breast cancer tissue. High CB1R expression revealed more severe lymph node involvement ($r_s=0.11$; $p=0.0155$) and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) tended to be positive ($r_s=0.17$; $p=0.0002$). High nuclear CB2R expression showed that estrogen ($r_s=0.17$; $p=0.0002$) and progesterone receptors ($r_s=0.12$; $p=0.0084$) tended to be positive but showed a lower tumour grade ($r_s=-0.17$; $p=0.0002$). High cytoplasmic expression of CBR2 was associated, with 13% higher locoregional and distant recurrences (HR=1.13 [0.97-1.33]), but this association did not reach statistical significance. These analyses might have been underpowered to detect associations. These results indicate that CBR expression might be a prognostic marker for breast cancer.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des figures, tableaux, illustrations	vii
Figures et tableaux du chapitre 1 : État des connaissances	vii
Figures et tableaux du chapitre 2: Méthodologie	vii
Figures et tableaux du chapitre 3: Résultats	vii
Figures et tableaux du chapitre 4 : Article	vii
Figures et tableaux de l'annexe	viii
Liste des abréviations, sigles, acronymes.....	ix
Remerciements.....	xi
Avant-propos	xii
Considérations éthiques	xiii
Contribution à l'avancement des connaissances	xiii
Financement	xiii
Introduction.....	1
Chapitre 1 <États des connaissances>.....	3
1.1 Les récepteurs cannabinoïdes	3
1.2 Les récepteurs cannabinoïdes et le cancer.....	5
1.3 Les récepteurs cannabinoïdes et le cancer du sein	6
1.3.1 Cancers du sein positifs aux récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone	6
1.3.2 Cancers du sein avec surexpression de HER2	6
1.3.3 Cancers du sein triple négatifs	7
1.4 Revue de la littérature.....	8

1.5 Objectif de la recherche	10
1.6 Hypothèse.....	11
Chapitre 2 <Méthodologie >	19
2.1 Devis et population de l'étude	19
2.2 Collecte de données	19
2.2.1 Données cliniques et pathologiques.....	19
2.2.2 Évaluation de l'expression de RCB1 et RCB2.....	20
2.2.3 Données de suivi.....	22
2.3 Analyses statistiques	23
Chapitre 3 <Résultats >	44
3.1 Résultats — objectif 1	44
3.1.1 Description de la population	44
3.1.2 Évaluation immunohistochimique de l'expression des récepteurs cannabinoïdes	48
3.2 Résultats — objectif 2	52
3.3 Résultats — objectif 3	55
Chapitre 4 < Article >	56
4.1 Titre et résumé en français	56
4.2 Title and authors	57
4.3 Abstract and keywords.....	57
4.4 Introduction	58
4.5 Materials and Methods.....	59
4.5.1 Study design and population	59
4.5.2 Data collection.....	60
4.5.3 Assessment of CBR expression	60
5.4.4 Survival outcome.....	61

4.5.5 Statistical analyses.....	61
4.6. Results.....	62
4.6.1. Study population.....	62
4.6.2 CBR expression and breast cancer prognostic factors.....	63
4.6.3 CBR expression and breast cancer survival.....	64
4.7 Discussion.....	64
4.8 Conclusions.....	66
4.9 Référence.....	67
Chapitre 5 < Discussion >.....	77
5.1 Discussion.....	77
5.2 Forces et limites.....	79
Conclusion.....	82
Bibliographie.....	83
Annexe A <Stratégie de recherche>.....	88
Annexe B <Modèle statistique de cox>.....	89
Annexe C <Résultats de l'évaluation immunohistochimique de l'expression des RCB>.....	91

Liste des figures, tableaux, illustrations

Figures et tableaux du chapitre 1 : État des connaissances

Figure 1: Exemple de cascades de signalisations activées par les RCPG	4
Figure 2: Diagramme de flux selon la méthode PRISMA.....	9
Figure 3: Hypothèse de recherche.....	11
Tableau 1: Études ayant examiné l'association entre les récepteurs cannabinoïdes et la survie au cancer	12

Figures et tableaux du chapitre 2: Méthodologie

Tableau 2: Sélection des variables d'ajustement pour les facteurs pronostiques	36
Tableau 3: Sélection des variables d'ajustement pour la survie globale (décès de toutes causes) ...	38
Tableau 4: Sélection des variables d'ajustement pour la survie sans récurrence (carcinome invasif seulement, récurrence locale, régionale ou à distance).....	41

Figures et tableaux du chapitre 3: Résultats

Figure 4: Échantillon TMA représentant l'intensité du marquage du RCB1	48
Figure 5: Échantillon TMA représentant l'intensité du marquage du RCB2	49
Tableau 5: Caractéristiques des femmes selon l'expression du RCB1 et RCB2.....	45
Tableau 6: Sous-type moléculaire du cancer du sein et expression du RCB1 et du RCB2	51
Tableau 7: Corrélation entre l'expression du RCB1 et du RCB2 et les facteurs pronostiques du cancer du sein	53

Figures et tableaux du chapitre 4 : Article

Figure 1: Representative immunostaining of tumour cores for CBR1	70
Figure 2: Representative immunostaining of tumour cores for CBR2	70

Table 1: Patients characteristics	71
Table 2: Correlations between CBR1 and CBR2 expression and breast cancer prognostic factors ..	73
Table 3: Hazard ratios for the association between CBR expression and survival in breast cancer patients	74
Table S 1: Hazard ratios for the association between CBR and survival with adjustment for prognostic factors	75

Figures et tableaux de l'annexe

Tableau 8: Évaluation immunohistochimique de l'expression du RCB1 et du RCB2	91
--	----

Liste des abréviations, sigles, acronymes

CB :	Cannabinoïdes
CC :	Cancer du côlon
CBN:	Cannabinol
CMS :	Centre des maladies du sein
CCR :	Cancer colorectal
EC :	Écart-type
EGFR :	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ER :	Récepteurs à l'œstrogène
FRQS :	Fonds de recherche du Québec-Santé
HER2 :	Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain
HR :	Hazard ratio
IC :	Intervalle de confiance
IHC :	Immunohistochimie
IMC :	Indice de masse corporelle
LLC :	Leucémie lymphocytaire chronique
MGL :	Monoacyl glycérol lipase
OMS :	Organisme mondial de la santé
P :	Valeur P
PR :	Récepteurs à la progestérone
RCB :	Récepteur cannabinoïdes
RCB1 :	Récepteur cannabinoïdes 1
RCB2 :	Récepteur cannabinoïdes 2
Rs :	Coefficient de corrélation de Spearman
SNC :	Système nerveux central
SEC :	système endocannabinoïde
THC :	Tétrahydrocannabinol

*À la mémoire de mon grand-père paternel, à
la mémoire de ma grand-mère paternelle qui
ont toujours été dans mon esprit et dans mon
cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite,
sans vous, ma vie aurait été bien différente.*

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier avec toute ma gratitude la directrice de ce mémoire, Dre. Caroline Diorio, pour sa patience, sa rigueur, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils qui ont contribué à la réalisation de ce projet. Elle m'a accueillie dans son équipe sans hésitation. J'ai été surprise par son dévouement envers ses étudiants, sa modestie, ainsi que par sa générosité. Elle a su me guider durant ces 3 années et a permis d'alimenter ma réflexion. Également directrice du programme d'épidémiologie, elle m'a permis d'acquérir des connaissances enrichissantes sur les études épidémiologiques. Je tiens à remercier ma codirectrice, Francine Durocher, pour avoir expliqué des notions importantes en science fondamentale pendant les clubs de lecture. Je tiens également à remercier Kaoutar qui m'a supervisée durant la réalisation de mon projet de recherche et la rédaction de l'article. Elle a su m'encourager, et me partager son expertise et surtout son temps. Je voudrais également exprimer ma reconnaissance envers les équipes de recherche de Caroline et Francine; pour leur appui; Anna, Alisson, Annick, Charu, Daniela, Geneviève, Georgina et Sue-Ling.

Merci également au corps professoral de l'Université Laval qui permet une formation de haute qualité et actualisée. Merci aux organismes subventionnaires; la Fondation du cancer du sein du Québec, la banque de tissus du Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) et la Fondation Canadienne du cancer du sein. Merci également à toutes les femmes qui chaque jour apportent leur contribution à la recherche en participant aux différentes études au Centre des maladies du sein.

Finalement, un grand merci à mon père et ma mère, pour leur amour, qui m'ont apporté leur encouragement et leur soutien à la fois moral et financier. Vous m'avez offert un modèle de persévérance et de détermination.

Avant-propos

L'objectif premier de ce mémoire était d'évaluer la survie des femmes atteintes d'un cancer du sein, en lien avec l'expression protéique des récepteurs CB1 et CB2 sur des prélèvements tumoraux effectués lors d'une chirurgie réalisée au Centre des maladies du sein. La mesure de l'expression protéique des récepteurs a été effectuée par immunohistochimie. La conception de ce projet de recherche a pu être réalisée grâce à la Dre Caroline Diorio qui a mis sur pied une banque de données exhaustive permettant la recherche de qualité en épidémiologie. Accompagnée de ma superviseure, elle m'a également assistée dans la rédaction d'un article scientifique et dans la rédaction de ce mémoire.

Le premier chapitre présente l'état des connaissances. Les études épidémiologiques portant sur l'expression des récepteurs cannabinoïdes et le cancer du sein sont peu nombreuses. C'est pourquoi nous avons élargi la recherche sur le sujet à tous les types de cancers. Le second chapitre correspond à la méthodologie, au processus scientifique de sélection et d'analyse des données. Le troisième chapitre présente les résultats des objectifs secondaires. Puis, le quatrième chapitre correspond à l'article qui porte sur l'association entre les récepteurs cannabinoïdes et la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein.

Durant mes études à la maîtrise, j'ai pu m'impliquer à différentes étapes du processus de recherche épidémiologique. Notamment, à la mise à jour de la banque de données utilisée, à effectuer une revue de la littérature, à l'analyse des données, la présentation des résultats et la rédaction de ce mémoire ainsi que d'un article scientifique. Dans ce projet, j'ai également appris à lire des lames de coloration à l'hématoxyline et à l'éosine et à mesurer les marqueurs immunohistochimiques. Cet apprentissage je le dois à ma superviseure Kaoutar. Dans le présent mémoire, j'ai pu également collaborer avec l'équipe de la Dre Francine Durocher de l'axe endocrinologie et néphrologie au CHUL. Notamment, avec Anna Burguin qui a mis sur pied et optimisé le marquage cytoplasmique des récepteurs pour tous les échantillons. En parallèle à mon projet, j'ai participé au recrutement des patientes pour la banque de tissu, et j'ai participé au suivi des patientes pour le projet de doctorat de Kaoutar Ennour-Idrissi.

Le protocole de recherche a été présenté dans divers événements, lors de la journée de recherche du CHU en 2019 et en 2020, puis lors de la 6^e journée de la recherche des étudiants SP-POS en collaboration avec l'axe oncologie secteur épidémiologique en 2019. Un résumé incluant les résultats a été soumis au réseau de la recherche sur le cancer en janvier 2021.

Considérations éthiques

Le consentement éclairé et écrit a été obtenu pour chaque participante incluse dans l'étude. L'approbation éthique de l'étude a été obtenue par le comité du centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval, Numéro de confirmation : DR-002-938.

Contribution à l'avancement des connaissances

Ce projet a le potentiel d'identifier de nouveaux marqueurs qui pourraient être utilisés comme facteurs pronostiques de l'évolution clinique du cancer du sein. La détermination de l'expression des récepteurs CB1 et CB2 au moment du diagnostic de cancer du sein pourrait nous permettre de détecter précocement les patientes à risque d'avoir une survie défavorable. Ainsi, ces nouveaux marqueurs pourraient être exploités pour améliorer le pronostic en permettant un meilleur ajustement du traitement et suivis. D'autre part, ces marqueurs pourraient être la cible de nouvelles thérapies.

Financement

La Banque de tissu des maladies du sein de Québec, affiliée au Réseau de recherche sur le cancer du Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS), nous a permis d'obtenir des échantillons biologiques. De plus, la Société Canadienne du cancer a attribué un prix de développement de capacité de la Fondation Canadienne du cancer du sein à Dre Diorio (prix #703003) ainsi que d'une bourse de Chercheurs pour les boursiers du FRQS.

Pour ma maîtrise, j'ai obtenu un soutien financier de Dre Caroline Diorio.

Introduction

Classé au premier rang des cancers chez la femme, le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué dans le monde et 571 000 décès sont attribuables à cette maladie (1). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), d'ici 2040, l'incidence est estimée à 3,2 millions de nouveaux cas annuellement (2). Au Canada, environ 27 400 nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués en 2020 et chaque jour, 14 femmes en décèdent (3). Le cancer du sein représente 13 % de tous les décès chez les femmes. Considérant les dernières estimations réalisées en 2019, au Québec, 6000 femmes ont reçu un diagnostic de cancer du sein, et l'on estime que 1350 en sont décédées (4). Par conséquent, le cancer du sein est un problème majeur de santé publique et contribue au fardeau de la maladie au Québec, au Canada et dans le monde.

Dans les 2 dernières décennies, une diminution des taux de mortalité a été observée chez les femmes atteintes du cancer du sein. En grande partie, ces observations sont attribuables à la mise en place de programme de dépistage entraînant la détection précoce de la maladie et à l'avènement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées qui ont permis d'améliorer le pronostic et d'améliorer la survie des femmes. Ainsi, la survie à 5 ans pour le cancer du sein est de 88 % (3). Cependant, malgré l'amélioration de la survie, un nombre considérable de femmes atteintes d'un cancer du sein vont développer de la résistance face aux thérapies conventionnelles et vont récidiver dans les 5 à 10 premières années suivant le diagnostic. De plus, les traitements actuels ont des effets secondaires qui affectent considérablement la qualité de vie de ces patientes(5, 6). Ces traitements sont basés sur les caractéristiques cliniques des patientes, qui prédisent le pronostic de la maladie. Toutefois, il semble de plus en plus évident que les femmes présentant des caractéristiques cliniques similaires ont un risque de récurrence et de décès différents. En effet, cette maladie est hautement hétérogène et présente diverses caractéristiques sur le plan histopathologique et moléculaire. Ces différences expliqueraient les différentes issues cliniques (7). Comme dans d'autres types de cancers, les facteurs pronostiques sont un déterminant majeur dans l'estimation de la survie et dans le choix de traitements. Les facteurs pronostiques sont des paramètres mesurables au moment du diagnostic qui permettent de classer les patientes en différents groupes de pronostic (8). Actuellement, les facteurs pronostiques connus du cancer du sein sont l'âge, le statut de la ménopause, la présence de comorbidité, la taille de la tumeur, le grade histologique, le stade, l'atteinte ganglionnaire, le statut des récepteurs hormonaux et le statut

du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2). Au fil du temps, l'élaboration de ces facteurs pronostiques a permis de cibler les femmes à risque de récurrence locale et à distance pour leur offrir des traitements complémentaires à la chirurgie. Ces facteurs pronostiques étant insuffisants pour prédire et identifier avec précision le pronostic des patientes atteintes d'un cancer du sein, il est donc primordial d'identifier de nouveaux facteurs pronostiques tels que des marqueurs biologiques pour offrir des traitements plus personnalisés.

L'expression de certaines protéines, tels que les récepteurs cannabinoïdes (RCB), par les cellules cancéreuses peut être le reflet du fonctionnement anormal des cellules cancéreuses et être associée à l'évolution clinique de la maladie. Récemment, plusieurs études se sont intéressées à l'expression protéique des récepteurs CB1 (RCB1) et CB2 (RCB2) dans les tumeurs. Celles-ci y ont observé que leur expression serait plus élevée dans les cellules cancéreuses, suggérant que ces récepteurs pourraient être un marqueur biologique d'intérêt pour le cancer. Le mécanisme biologique expliquant l'effet antitumoral des cannabinoïdes sur l'organisme réside principalement dans sa capacité à induire la mort des cellules cancéreuses (par apoptose et autophagie essentiellement), à entraîner l'inhibition de l'angiogenèse, la prolifération et l'invasion cellulaires et la dissémination à distance. Ce phénomène a été démontré dans presque toutes les lignées cellulaires cancéreuses, mais également dans des xénogreffes et chez des souris génétiquement modifiées (9). Avec l'avènement des technologies modernes, l'expression des RCB en combinaison avec les facteurs pronostiques pourrait apporter plus d'information sur l'évolution clinique du cancer du sein et permettre le développement de nouvelles thérapies ciblées.

Dans ce mémoire, l'objectif est donc de décrire l'expression des RCB dans le cancer du sein et déterminer si leur expression est associée aux facteurs pronostiques et à la survie des femmes atteintes d'un cancer du sein.

Chapitre 1 <États des connaissances>

1.1 Les récepteurs cannabinoïdes

Les récepteurs cannabinoïdes (RCB) font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), récepteurs membranaires de type rhodopsine de classe A. Cette famille de récepteurs joue un rôle important dans la transduction de signaux extracellulaires vers une multitude de molécules permettant la signalisation intracellulaire (10). Par exemple, l'inhibition des RCPG permet l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) et active certaines protéines kinases, qui participent à la régulation de la prolifération cellulaire, la survie et la différenciation cellulaire, la réponse inflammatoire, la mort cellulaire, et le remodelage de la matrice extracellulaire, toutes des voies de signalisation impliquées dans le cancer (11) (Figure 1).

Deux sous-types de RCB ont été identifiés : le récepteur cannabinoïde de type 1 (RCB1) et le récepteur cannabinoïde de type 2 (RCB2). Le RCB1 est essentiellement retrouvé au niveau du cerveau et dans certaines terminaisons nerveuses, mais aussi au niveau des organes reproducteurs, de l'endothélium vasculaire, et les yeux (12). Les RCB1 sont parmi les neurotransmetteurs les plus abondants du corps humain (13). Le RCB2 est exprimé au niveau du système immunitaire, principalement. Il est présent dans les membranes des cellules immunitaires et tumorales, de la rate, des os, des amygdales et la glande thyroïde (14-17).

Figure 1: Exemple de cascades de signalisations activées par les RCPG

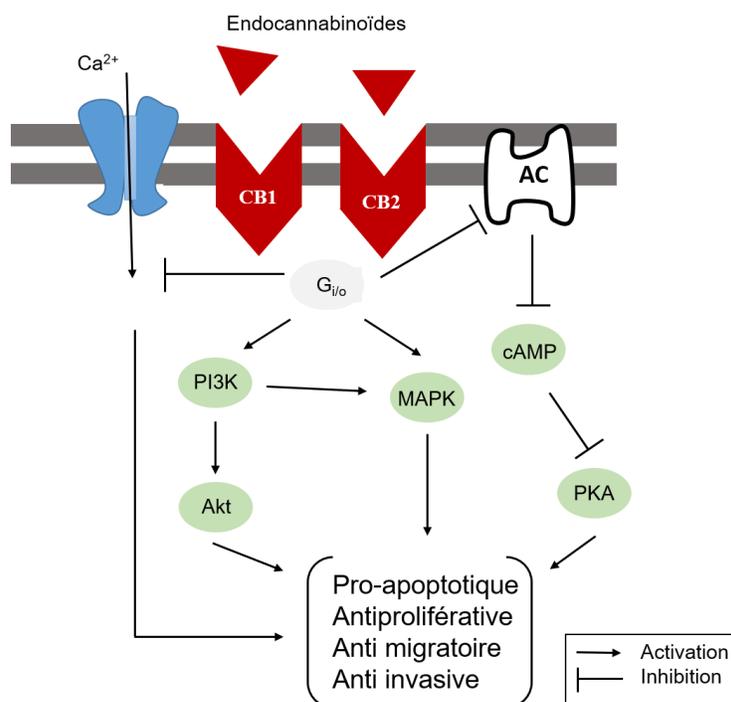


Figure adaptée de Zou, S. and U. Kumar (11). Légende : 1) La voie de PKA : l'activation du RCPG stimule l'adénylate cyclase (AC) qui provoque une augmentation de l'adénosine monophosphate (AMP), qui active à son tour la protéine kinase A (PKA). 2) La voie de PI3/Akt : la phosphatidylinositol 3 phosphate (IP3) entraîne la libération du Ca²⁺ (stocké dans le réticulum endoplasmique) intracellulaire via relargage, et conduit à l'activation d'une protéine kinase (Akt). De ce fait, cette voie joue sur la survie de nombreuses cellules, 3) La voie des MAP Kinase (MAPK): celle-ci comporte plusieurs enzymes qui interagissent sur plusieurs niveaux d'activations. Permet la régulation de : la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire, la réponse inflammatoire, la mort cellulaire, et le remodelage de la matrice extracellulaire (11, 18).

Trois formes de ligands sont capables de se lier aux RCB : les endocannabinoïdes, produits naturellement par le corps tel que l'anandamide et la 2-arachidonoyglycerol, les phytocannabinoïdes, substances extraites de la plante du cannabis (tétrahydrocannabinol [THC]) et les cannabinoïdes synthétiques, produits en laboratoire. Les endocannabinoïdes ont plusieurs fonctions homéostatiques. Par ailleurs, certaines enzymes métaboliques agissent sur les RCB pour assurer leur dégradation et transport entre les différentes cellules impliquées au niveau des cascades de signalisation des endocannabinoïdes (19). Les principaux enzymes identifiés sont l'hydrolase des amides d'acides gras (FAAH) et la monoacylglycérol lipase (MAGL).

Les endocannabinoïdes, les enzymes métaboliques et les récepteurs cannabinoïdes forment ensemble la triade du système endocannabinoïde (SEC) (18). Ces protéines contiennent plusieurs niveaux d'intervention potentielle pour modifier la progression tumorale et pourraient être utilisées comme traitement ciblé pour le cancer et comme biomarqueurs pronostiques. Les différents mécanismes et les processus qui régulent le SEC regroupent plusieurs voies de signalisation

importante pour le cancer. Ainsi, il peut agir en tant qu'immunosuppresseur en supprimant l'activation de diverses cellules immunitaires (20), induire l'apoptose (ou la mort cellulaire programmée), inhiber la carcinogenèse (21-23) et exercer une activité antiproliférative, anti-métastatique, et anti-inflammatoire (11). Une altération du fonctionnement du SEC pourrait induire différentes pathologies et a été documentée intensément (13, 24). Notamment, plusieurs troubles métaboliques/obésité médiés par l'activation des RCB ont été observés dans des études réalisées *in vitro* et *in vivo* (13, 25). Ces troubles métaboliques sont des facteurs de risque associés au cancer du sein.

1.2 Les récepteurs cannabinoïdes et le cancer

On remonte en 1975 avec une étude pionnière à observer l'utilisation du cannabis comme agent anticancéreux inhibant la croissance des cellules cancéreuses du poumon *in vivo* (26), ouvrant ainsi la voie pour l'élucidation des mécanismes régulant les récepteurs cannabinoïdes.

Plusieurs auteurs se sont penchés sur l'utilisation des RCB comme cible thérapeutique ou comme biomarqueur pour le cancer. Comparativement aux tissus non tumoraux, l'expression des RCB et leurs ligands seraient régulés à la hausse dans le tissu tumoral (14, 27, 28). De plus, plusieurs études ont trouvé une association entre l'expression du SEC et l'agressivité clinique de la tumeur (14, 27, 29). Les cellules cancéreuses semblent avoir une expression plus élevée de RCB (23).

Bien que l'on retrouve de plus en plus d'information disponible à ce jour sur le processus principal contrôlant le cycle cellulaire des RCB, son fonctionnement réel reste à élucider (14). Il apparaît que d'un cancer à l'autre les niveaux d'expression des RCB peuvent varier conformément aux sous-types de cancer (30). L'expression du RCB2 a été associée à une moins bonne survie globale et sans maladie chez des patients atteints du cancer du côlon, indiquant que l'expression du RCB2 participe à la progression de la maladie (31). Des résultats similaires ont été observés pour le cancer du pancréas (32), le cancer de la prostate (33), et le cancer épidermoïde de la tête et du cou (34). Alors que certains auteurs ont observé une meilleure survie sans maladie dans le carcinome hépatocellulaire chez des patients ayant une expression plus élevée du RCB1 et du RCB2 (35).

1.3 Les récepteurs cannabinoïdes et le cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie hautement hétérogène. Sur le plan moléculaire, trois types de cancer du sein peuvent être décrits : le cancer du sein positif pour les récepteurs hormonaux, le cancer du sein avec surexpression du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) et le cancer du sein triple négatif.

1.3.1 Cancers du sein positifs aux récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone

Le type de cancer constituant la majorité (70-75 %) des cas de cancer du sein sont hormono-dépendants et sont habituellement associés à un meilleur pronostic (36). Les cellules cancéreuses de ces cancers expriment à leur surface des récepteurs à l'œstrogène (ER) et à la progestérone (PR) (hormones sexuelles chez la femme) qui favorisent la croissance cellulaire et le développement de la tumeur (37, 38). L'un des principaux traitements ciblés utilisés dans le cancer du sein est l'hormonothérapie, qui consiste à priver les cellules cancéreuses de toutes sources endogènes d'œstrogènes par l'utilisation des inhibiteurs de l'aromatase ou à moduler la fonction des récepteurs des œstrogènes par l'utilisation du tamoxifène (4).

Dans les cellules cancéreuses du sein, il a été observé que les RCB modulent les activités cellulaires liées à la progression des cellules tumorales dans le cancer du sein ER+/PR+ (23). Cet effet était principalement médié par l'activation du RCB1 (39). Aussi, certains auteurs ont observé qu'en réponse au THC, la prolifération des cellules cancéreuses du sein ER+/PR+ était diminuée (14). Dans ce cas-ci, cet effet était médié par l'activation du RCB2. Également constatés avec le RCB2, les RCB avaient la capacité d'altérer la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du sein ER+/PR+ en culture (23). C'est donc dire que les RCB ont un rôle important concernant le développement de métastases à distance chez les femmes atteintes d'un cancer du sein de type hormono-dépendant.

1.3.2 Cancers du sein avec surexpression de HER2

Le cancer dit HER2 est un cancer du sein qui surexprime le gène HER2 à la surface des cellules. Lorsqu'il est exprimé normalement, le gène HER2 aide à contrôler la croissance cellulaire, la division et la réparation cellulaire (40). Lorsqu'il est surexprimé, la surproduction de la protéine HER2 s'accompagne d'une prolifération des cellules cancéreuses et de l'augmentation du potentiel

métastatique (3). Ce type de cancer agressif est associé à un pronostic moins favorable et on le retrouve dans 15-20 % des cancers du sein (41). Certains médicaments ciblant le récepteur HER2, tel que le trastuzumab, sont utilisés dans le traitement de ce type de cancer et améliorent la survie (3). Plusieurs évidences du rôle des RCB dans ce type de cancers du sein ont été rapportées dans la littérature. En effet, chez les souris MMTV-neu23, un modèle animal cliniquement compatible pour l'étude du cancer du sein HER2, le THC avait résulté en une activité antitumorale significative (42). Les auteurs ont tenté de traiter des souris ayant été transfectées par des lignées cellulaires de cancer du sein, soit en utilisant du THC ou en activant le RCB2. Une réduction significative de la taille des tumeurs fut observée, mais aussi une diminution de plusieurs molécules participant à l'activation des cascades de signalisations oncogéniques (24, 25). Les auteurs ont également observé que le RCB2 était surexprimé dans les tumeurs ayant un mauvais pronostic et plus précisément dans les tumeurs de haut grade (14).

Une seule étude épidémiologique a évalué l'association entre l'expression du RCB2 et la survie au cancer du sein. Le RCB2 était exprimé dans une grande proportion du tissu tumoral (476 sur 629, soit 75,6 %). Inversement, le tissu non tumoral présentait des niveaux indétectables du RCB2. L'expression du RCB2 était positivement et fortement associée aux tumeurs HER2 ($p < 0,001$) et parmi ces tumeurs HER2, l'expression élevée de RCB2 était associée à une diminution de la survie globale ($p=0,009$) et à une augmentation des récidives locales ($p=0,003$) ou à distance ($p=0,009$) (43). Ces observations renforcent considérablement les théories selon lesquelles les tumeurs HER2 sont sensibles aux RCB et plus spécifiquement via le RCB2.

1.3.3 Cancers du sein triple négatifs

Le cancer du sein dit triple négatif (TN) est un cancer dans lequel on ne détecte pas l'expression de récepteurs ER, PR et HER2. De ce fait, il forme une classe distincte de cancer du sein (3). Il constitue 10 à 20 % des cas diagnostiqués et est associé à un mauvais pronostic. Actuellement, il n'y a pas de traitement ciblé pour les cancers du sein TN.

Plusieurs preuves expérimentales suggèrent que les cannabinoïdes pourraient servir de thérapie pour les cancers du sein TN. Contrairement aux autres types de cancers, l'activité antitumorale des cannabinoïdes dans le cancer du sein TN semble médiée par les deux RCB. En effet, plusieurs

endocannabinoïdes synthétiques ont été utilisés dans des lignées cellulaires de cancer du sein TN. Tous y ont trouvé une inhibition de la prolifération cellulaire (14, 44-46). Ce phénomène est également observable *in vivo* dans des xénogreffes et aussi dans des souris génétiquement modifiées qui sont employées comme modèle pour le cancer du sein TN (45). Dans le même ordre d'idée, l'utilisation d'un traitement sous-cutané à l'aide du cannabidiol, un phytocannabinoïde, sur des xénogreffes était marquée par une réduction de la croissance tumorale (46).

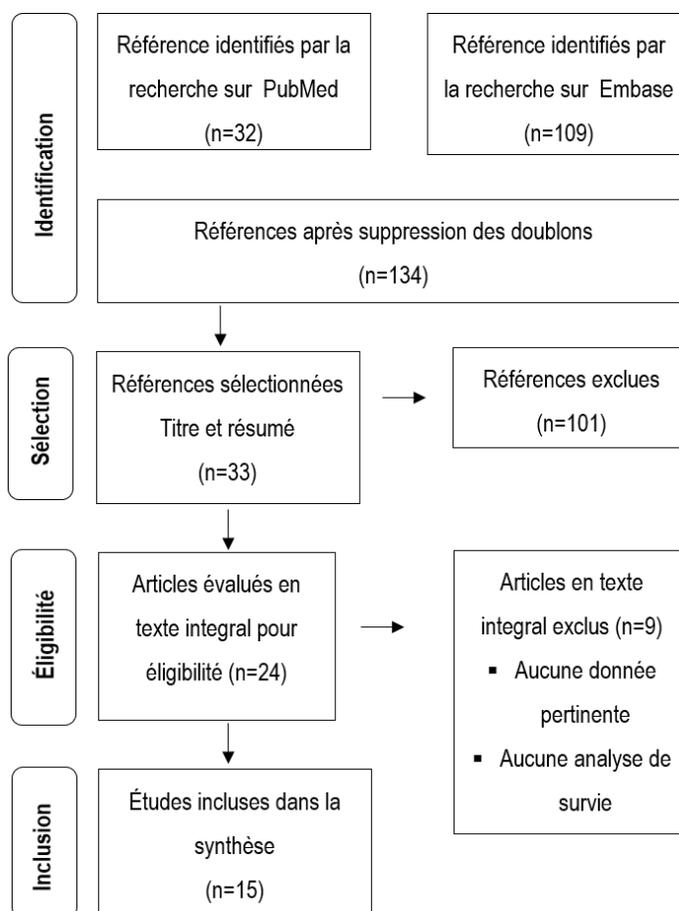
À la lumière de ces observations, les données observées dans les modèles *in vitro* (système cellulaire en culture) et les modèles animaux suggèrent le ciblage simultané des deux récepteurs pour constituer une stratégie thérapeutique de nouvelle génération(23). Ainsi, plutôt que de définir un mécanisme en particulier, il semble que plusieurs possibilités soient envisageables.

1.4 Revue de la littérature

Les études incluses dans la revue de littérature portent sur l'expression des RCB (protéique par immunohistochimie et ARN obtenu par RT-PCR) et la survie des patients diagnostiqués d'un cancer. Les informations ont été recueillies à l'aide des bases de données électroniques (jusqu'à octobre 2020) Medline (via pubmed) et Embase. La stratégie de recherche est présentée dans l'annexe A. De plus, la recherche d'information a été complétée par la consultation des références des études identifiées. La figure 2 présente un diagramme de flux. Les études épidémiologiques concernant l'expression des RCB et le cancer du sein sont peu nombreuses. C'est pourquoi nous avons élargi la recherche sur le sujet à tous les types de cancers. Plusieurs études se sont intéressées au modèle animal, ces modèles ont été exclus. L'expression des récepteurs mesurée dans les lignées cellulaires a été exclue. Les études ne comportant pas d'analyse de survie ont également été exclues. Certaines études ont évalué le RCB1 ou le récepteur RCB2 ou les deux. Le tableau 1 présente les différentes études longitudinales (29, 31-35, 43, 47-54) considérées qui ont évalué l'expression des RCB et la survie au cancer.

La majorité des études ont été réalisées en Europe, soit en Suède (29, 33, 49, 51), en Allemagne (32, 52), en Autriche (50, 54) et en Espagne (31, 43). Les auteurs ont choisi de mesurer le marqueur soit par immunohistochimie (29, 31-34, 43, 47-49, 51, 52, 55), soit par réaction de polymérisation en chaîne

Figure 2: Diagramme de flux selon la méthode PRISMA



par transcriptase inverse (RT-PCR) (50, 53, 54). Cependant, d'une étude à l'autre la façon de regrouper et de catégoriser l'expression des récepteurs est différente. Plusieurs ont observé l'intensité de coloration (29, 35, 36, 46, 52, 54), d'autres le pourcentage de coloration (31, 48) et certaines ont fait une combinaison des deux (32, 33, 47, 52). Alors que d'autres n'ont pas mentionné cette information (50, 53, 54).

Globalement les études ont ajusté pour certains facteurs pronostiques associés aux RCB en lien avec le cancer étudié. Peu d'études ont ajusté pour les principaux facteurs confondants, notamment pour l'âge et/ou le genre (31, 47, 48, 52). Les taux d'incidence et de mortalité varient selon l'âge et représentent un facteur de risque essentiel pour le cancer. De plus, le genre est une covariable importante à prendre en considération. Elle est associée à la fois à la consommation de cannabis (et par conséquent, pourrait être associée au niveau d'expression des récepteurs cannabinoïdes) et au risque de décès. Ainsi, comme ces variables confondantes n'ont pas été prises en considération, les résultats de ces analyses pourraient être biaisés.

Les études étaient également souvent limitées par les biais de sélection, une faible taille d'échantillon et le manque d'information sur les facteurs cliniques et pathologiques. Aussi, plusieurs études n'ont pas bien défini la récurrence locale et la récurrence à distance, ne fournissant que très peu d'information. Pour les analyses de survie, la survie globale a été employée comme critère de survie dans la majorité des cas (31, 32, 34, 35, 43, 47, 48, 50, 52, 56) alors que certains auteurs ont choisi d'utiliser la survie spécifique au cancer (29, 49, 51, 53), d'autres ont sélectionné la survie sans maladie (57).

De ce fait, la grande variation des méthodes et la complexité des liens entre les différents cancers rendent les comparaisons entre les études difficiles. Malgré ces contrastes, certaines observations importantes peuvent être mises en évidence. Par exemple, dans le cancer de la prostate, une même tendance dans les résultats est observée. Une expression élevée du RCB1 était associée à une moindre survie (29, 33, 51). En contrepartie, dans le cancer épidermoïde de la langue mobile et le cancer hépatique, l'expression élevée de RCB1 et RCB2 était associée à une meilleure survie (35, 47). Dans la leucémie lymphocytaire chronique, une expression élevée du RCB1 était associée à une moindre survie (50, 54). Pour ce qui est du cancer colorectal, les résultats étaient contradictoires. L'expression élevée du RCB1 était associée à une moindre survie dans 2 études distinctes (31, 48) alors que l'expression élevée du RCB1 et RCB2 était associée à une meilleure survie pour deux autres études (49, 53).

La méthodologie différait grandement d'une étude à l'autre, et plusieurs paramètres épidémiologiques n'ont pas été pris en considération malgré leur importance. Par ailleurs, la seule étude épidémiologique à avoir étudié le cancer du sein et l'expression du RCB2, décrite dans la section ci-haut, ciblait uniquement les tumeurs surexprimant HER2 et n'a pas ajusté pour les facteurs possiblement confondants pour ces analyses de survie. L'expression du RCB1 n'a pas été investiguée. Il est donc pertinent d'ajouter de l'information à la littérature et d'entériner le bien-fondé de ces observations pour augmenter la validité des connaissances sur le sujet.

1.5 Objectif de la recherche

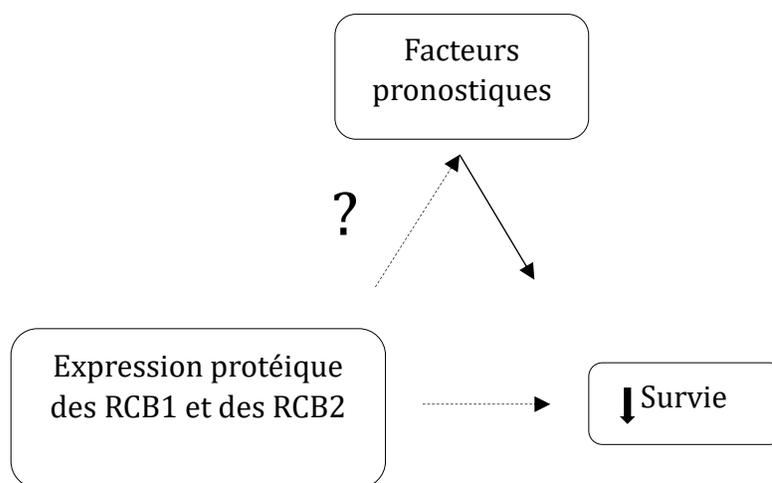
Le travail présenté dans ce mémoire constitue une étude exploratoire dans laquelle nous proposons de décrire l'expression protéique des récepteurs RCB1 et RCB2 par immunohistochimie dans les tumeurs mammaires (chapitre 3). Ensuite, par une analyse transversale, l'association entre les facteurs

pronostiques connus du cancer du sein et l'expression protéique des RCB1 et RCB2 sera étudiée (chapitre 3). Puis, par une analyse longitudinale, l'objectif final est d'évaluer l'association entre l'expression protéique des RCB1 et RCB2 et la survie globale, la survie sans récurrence et la survie sans évènement (chapitre 4).

1.6 Hypothèse

La revue de la littérature exposée dans le chapitre 1 suggère qu'une expression élevée des RCB1 et des RCB2 est associée à un mauvais pronostic dans la majorité des cancers (29, 31-34, 43, 48, 50, 51, 54). En regard de ces observations, nous émettons comme hypothèse que plus l'expression protéique des RCB1 et des RCB2 est élevée dans les tumeurs mammaires, moins bonne sera la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein. La figure 3 présente notre hypothèse de recherche.

Figure 3: Hypothèse de recherche



Légende : Hypothèse du rôle des récepteurs cannabinoïdes sur la survie au cancer du sein. Les facteurs pronostiques sont potentiellement des facteurs intermédiaires. Cependant, ceux-ci pourraient aussi être des facteurs confondants.

Tableau 1: Études ayant examiné l'association entre les récepteurs cannabinoïdes et la survie au cancer

Étude Référence Lieux Type cancer	Population		Exposition	Caractéristiques des récepteurs	Issue	Résultats		
	Caractéristiques des participants	N				Kaplan-Meier	Cox	
							Brut	Ajusté, variables d'ajustement
Étude longitudinale								
(Michalski et al., 2008) Allemagne ACDP	Âge: NR Suivi: NR	50	RCB1 RCB2	Méthode : IHC <i>Intensité de coloration</i> : 0 (absent), 1 (faible à modéré) et 2 (forte) <i>Pourcentage de coloration</i> : 1 (< 33%), 2 (33-66%) et 3 (> 66%), Ces nombres ont ensuite été multipliés ce qui a donné 2 catégories : faible (0-3) et fort (>3)	Survie globale	NR	Faible expression du RCB1 était de 16 mois vs 6 mois pour forte expression (p=0,001 1) RCB2 NS	Envahissement ganglionnaire (p=0,016)
(Xu et al., 2006) Chine CHC	Âge : moyenne 59±10,9 [31-74] ans Suivi : moyenne 4,2±1,8 [1999-2003] ans N : 55 hommes et 9 femmes	64	RCB1 RCB2	Méthode : IHC <i>Intensité de coloration</i> : 0 (absent), 1 (faible), 2 (modéré), and 3 (intense), Ces nombres ont ensuite été divisés en 2 catégories : faible expression (0-1) et forte expression (2-3)	Survie sans maladie Survie globale	Forte expression du RCB1 et RCB2 survie plus longue (p=0,010 et 0,037) RCB1 NS RCB2 NS	NR NR	NR NR

(Chung et al., 2009) Suède CP	Âge : médiane 74 [57-95] ans Suivi : échantillons collectés entre 1975 et 1991 Suivi jusqu'en 2003	269	RCB1	Méthode : IHC <i>Intensité de coloration</i> : 0 (absent) à 3 (forte) <i>Pourcentage de coloration</i> : (0%, 10%, 33%, 50%, et 100%) Les pourcentages ont ensuite été multipliés à l'intensité et divisés en 2 catégories (dichotomisé à partir de la médiane) : faible expression (<2) et forte expression (>2)	Survie spécifique	Forte expression du RCB1 survie plus courte (p<0,001)	RR= 3,2; 95% IC [1,6-6,5] (p=0,001)	Score de Gleason RR= 2,7; 95% IC [1,3-5,5] (p=0,006)
(Klein Nulent et al., 2013) Royaume-Uni CCETC	Âge : médiane 61 [26-87] ans Suivi : échantillons collectés entre 1996 et 2005, N : 150 hommes et 90 femmes	240	RCB1 RCB2	Méthode : IHC <i>Intensité de coloration</i> : absent, faible, modéré, et forte Ces nombres ont ensuite été divisés en 2 catégories : 1 (absent, faible, modéré) et 2 (forte)	Survie globale	RCB1 NS Forte expression du RCB2 survie plus courte (p=0,009)	RCB1 NS RCB2 NS	NR
					Survie spécifique	RCB1 NS Forte expression du RCB2 survie plus courte (p=0,007)	RCB1 NS RCB2 HR: 3,6, 95% IC [1,5-8,7] p=0,004	Profondeur de l'envahissement HR : 2,2, 95% CI [1,2-4,2] p=0,013) Envahissement vasculaire HR: 2,5, 95% IC [1,4-4,5] p=0,001)
(Theocharis et al., 2016) France CCS	Âge : médiane 60 EI 53-72 [33-94] ans Suivi : médiane 41 mois, EI 14-68 [2-116] mois N : 14 hommes et 14 femmes	28	RCB1 RCB2	Méthode : IHC <i>Intensité de coloration</i> : 0 (négatif), 1 (léger), 2 (intermédiaire), 3 (intense) <i>Intensité de pourcentage</i> : 0 (négatif), 1 (0-4%), 1 (5-24%), 2 (25-49%), et 3 (50-100%)	Survie globale	Forte expression du RCB1 survie plus longue (p=0,004) Forte expression du RCB2 survie plus longue (p=0,011)	RCB1 NS RCB2 NS	NR

				Ces nombres ont ensuite été multipliés ce qui a donné 2 catégories: faible expression (0-2), forte expression (≥ 3)	Survie sans maladie	Forte expression du RCB1 survie plus longue ($p=0,003$) Forte expression du RCB2 survie plus longue ($p=0,007$)	RCB1 NR RCB2 NS	Âge Genre Grade tumoral Forme de la tumeur HR: 8,217; 95% IC [1,204-56,064] ($p=0,032$)
(Jung et al., 2013) Corée CCR	Âge : moyen 62,8 ET 11,7 ans Suivi : médiane 42 mois [2-80] mois N : 328 hommes et 104 femmes	534	RCB1	Méthode : IHC <i>Intensité de pourcentage</i> : 0 (0%), 1 (<33%), 2 (33-66%), et 3 (>66%) Ces nombres ont ensuite été divisés en 2 catégories: faible (<3), et forte (=3)	Survie globale	Tumeur stade IV : forte expression du RCB1 survie plus courte ($p=0,025$)	HR: 1,782; 95% IC [1,049-2,988] ($p=0,033$)	Tumeur stade IV : Âge Résection Chimiothérapie Différentiation HR= 1,805; 95% CI [1,042-3,094] ($p=0,035$ 3)
(Gustafsson et al., 2011) Suède CCR	Âge : médiane 71[26-96] ans Suivi : 113 mois N : 269 hommes et 218 femmes	487	RCB1	Méthode : IHC <i>Intensité de coloration</i> : 0 (absent) à 3 (forte) Ces nombres ont ensuite été divisés en 2 catégories : faible (<2), et forte (≥ 2)	Survie spécifique	Forte expression du RCB1 survie plus longue ($p<0,05$) dans les tumeurs du centre de stade II et stade IV ($p<0,05$) Forte expression du RCB1 survie plus longue ($p<0,05$) dans les tumeurs de devant de stade II ($p<0,01$)	Pour les MSS : RCB1 NS Pour les MSI : RCB1 NA	Tumeur du centre MSS : HR= 1,72; 95% IC [1,18-2,53] ($p<0,01$) Stade HR= 1,60; 95% IC [1,08-2,37] ($p<0,05$) Stade Grade HR= 1,85; 95% IC [1,22-2,82] ($p<0,01$)
					Survie sans maladie	Forte expression du RCB1 survie de 5 ans estimés à 66 \pm 8% versus 85 \pm 5%	NR	NR

(Martinez-Martinez et al., 2015) Espagne CCR	Age: NR Suivi: médiane 57 [1-104] mois N:108 men and 67 women	175	RCB2	Méthode : IHC <i>Intensité de pourcentage</i> : 0 (1-20%), 1 (21-70%), 2 (>70%) Les pourcentages ont ensuite été divisés en 2 catégories : négatif (0), et positif (1-2)	Survie globale	CC : Sans expression du RCB2 survie à 5 ans était de 78,98%; 95% IC [69,73%-84,39%] versus 40,07%; 95% IC [21,8%-58,34%] (p<0,001) RC : RCB2 NS	In CC: HR= 13,69; 95% CI [1,9-7,2] (p<0,001) In RC: RCB2 NS	In CC: HR=4,2; 95% CI [2,12-8,2] (p<0,001) Âge Genre Envahissement ganglionnaire Invasion vasculaire Stade Grade In RC: RCB2 NS
					Survie sans maladie	CC : Sans l'expression du RCB2, la survie à 5 ans était de 73,83%; 95% IC [64,15%-83,51%] versus 48,68%; 95% IC [28,81%-68,55%] (p=0,018) RC : RCB2 NS	CC: HR= 2,2; 95% IC [1,07-4,49] (p=0,031) RC: CB ₂ NS	CC : HR=2,77; 95% IC [1,33-5,74] (p=0,006) Âge Genre Envahissement ganglionnaire Invasion vasculaire Stade Grade RC : RCB2 NS
(Freund et al., 2016) Autriche LLC	Âge : médiane 63 [39-82] ans Suivi : NR	107	RCB1 RCB2	Méthode : RT-PCR RCB1 et RCB2 sont présentés selon la médiane, quartiles et intervalle	Survie sans traitement	Forte expression du RCB1 survie de 75 mois versus 150 mois (p<0,0001) RCB2 NS	RCB2 HR=2,770; 95% IC [1,603-4,785] (p<0,0001) RCB2 NS	RCB2 : Expression CD38 Statut mutationnel IGHV Stade clinique B & C LDT

				<p>La médiane a été utilisée comme coupure ce qui a donné 2 catégories :</p> <p>RCB1 : faible 0,23 [0,00-1,41] et forte 7,16 [1,52-140,39]</p> <p>RCB2 : faible 2,35 [0,06-3,72] et forte 5,41 [3,77-26,54]</p>	<p>Survie globale</p> <p>Survie sans progression</p>	<p>Forte expression du RCB1 survie de 153 mois versus 277 mois (p=0,001)</p> <p>RCB2 NS</p> <p>RCB1 NS</p> <p>RCB2 NS</p>	<p>RCB1 HR=8,615; 95% IC [1,947-38,112] (p=0,001)</p> <p>RCB2 NS</p> <p>RCB1 NS</p> <p>RCB2 NS</p>	<p>RCB1 : Expression CD38 Statut mutationnel IGHV Stade clinique B & C LDT</p> <p>NR</p>
(Fowler, Hammarsten et Bergh, 2010) Suède CP	<p>Âge : médiane 74 [57-95] ans</p> <p>Suivi : échantillons collectés entre 1975 et 1991</p> <p>Suivi jusqu'en 2003</p>	419	RCB1	<p>Méthode : IHC</p> <p><i>Intensité de coloration</i> : 0 (absent) à 3 (forte) x distribution de cellule épithéliale (0%, 10%, 50% et 100%), donnant un résultat de 0-3</p> <p>Ces nombres ont été divisés en 2 catégories : faible (<2), et forte (≥2)</p>	Survie spécifique	NR	HR = 4,40; 95% IC [2,69-7,21] (p<0,001)	HR= 2,64; 95% IC [1,53-4,58] (p<0,01) pEGFR Stade de la tumeur Score de Gleason
(Wang et al., 2018) Allemagne CR	<p>Âge: médiane 55,96 [15-85] ans</p> <p>Suivi : 61 [1-44] mois</p> <p>N : 285 hommes et 133 femmes</p>	418	RCB2	<p>Méthode : IHC</p> <p><i>Intensité de coloration</i> : 0 (absent), 1 (faible), 2 (modéré), et 3 (forte)</p> <p><i>Intensité du pourcentage</i> : 1 (0-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%), et 4 (>75%)</p> <p>Ces nombres ont ensuite été multipliés ce qui a donné 2 catégories : faible (<6) et forte (≥6)</p>	Survie globale	Forte expression du RCB2 survie plus courte (p<0,001)	HR= 2,087; 95% IC [1,334-3,265] (p<0,001)	HR= 1,674; 95% IC [1,047-2,676] (p=0,031) Âge Stade TNM Grade pathologique Récidive ou métastase à distance

(Thors et al., 2010) Suède CP	Âge : médiane 74 [57-95] ans Suivi : échantillons collectés entre 1975 et 1991 Suivi jusqu'en 2003	412	RCB1	Méthode : IHC <i>Intensité de coloration</i> : 0 (absent) à 3 (forte) Ces nombres ont ensuite été multipliés ce qui a donné 2 catégories : faible (<2) et forte (≥2)	Survie spécifique (15 ans)	NR	OR=3,244, 95% IC [1,609-6,543], (p<0,001)	OR= 3,354; 95% IC [1,660-6,774] (p<0,001) FAAH-IR
(Zeng and Chen, 2019) Chine CC	Âge : moyenne 67,43 [31-90] ans Suivi : échantillons collectés entre mai 2014 et octobre 2017 N : 243 hommes et 216 femmes	459	RCB2	Méthode : RT-PCR La médiane a été utilisée comme coupure ce qui a donné 2 catégories : Faible et forte (incluant la médiane)	Survie associée aux gènes	Forte expression du RCB2 survie plus longue (p=0,007)	NR	
(Weiss et al., 2012) Autriche CLL	Age: NR Suivi : NR	102	RCB1 RCB2	Méthode : RT-PCR La médiane a été utilisée comme coupure	Survie globale	Forte expression de RCB1 survie médiane non atteinte versus 154,2 mois (p=0,002) RCB2 NR	NR	NR
					Survie sans traitement	Forte expression du RCB1 survie de 53,6 mois versus 141,4 mois (p=0,000) RCB2 NR	NR	NR

(Perez-Gomez et al., 2015) Espagne CS	Age: NR Suivi: NR	649	RCB2	Méthode : IHC <i>Intensité de coloration</i> : 0 (absent), 1 (faible), 2 (modéré), 3 (forte) La médiane a été utilisée comme coupure ce qui a donné 2 catégories : faible (0-1) et forte (≥ 2)	Survie globale	NR	HER2 positif : HR= 0,29, 95% IC [0,09-0,71] ($p = 0,009$)	NR
---	----------------------	-----	------	--	----------------	----	--	----

RCB1 : Récepteurs cannabinoïdes 1; RCB2 : Récepteurs cannabinoïdes 2; ET : écart-type, IC : intervalle de confiance, RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction, HER2 : human epidermal growth factor receptor 2, HR : hazard ratio, n: nombre de participants, mss : micro satellite stable, msi: micro satellite instable, statut mutationnel IGHV : immunoglobulin heavy chain variable, LDT: lymphocyte doubling time, pEGFR: epidermal growth factor, FAAH-IR : fatty acide amide hydrolase, ACDP, adénocarcinome ductal pancréatique, CC : cancer du côlon, IHC : immunohistochimie, NR : non rapporté, NS : non significatif, CHC : carcinome hépatocellulaire, CP : cancer de la prostate, LLC : leucémie lymphocytaire chronique, CCETC : carcinome épidermoïde de la tête et du cou, CCS : carcinome squameux, CR : carcinome rénal, CS : cancer du sein

Chapitre 2 <Méthodologie >

2.1 Devis et population de l'étude

Un devis d'étude de type transversal a été utilisé pour évaluer le lien entre les variables mesurées au moment du recrutement (objectifs 1 et 2). La composante principale de l'étude correspond à un devis longitudinal avec collecte prospective des données (objectif 3). Celle-ci a été réalisée sur une cohorte consécutive de 522 femmes admises entre le 1^{er} décembre 2010 et le 30 avril 2012 au Centre des maladies du sein (CMS) Deschênes-Fabia du CHU de Québec. Le CMS est le centre de référence des cas de cancer du sein de la grande région de Québec. Pour être incluses dans l'étude, les patientes devaient : 1) avoir été diagnostiquées d'un cancer du sein invasif non métastatique, 2) avoir eu une mastectomie, 3) avoir consenti à la banque de données et de tissus du CMS et 4) avoir été suivies au CMS pour leur cancer du sein. Toutes les participantes ont été recrutées au moment de la chirurgie. Pour chaque femme, les caractéristiques cliniques et pathologiques ont été mesurées au moment du recrutement. Les patientes ont été suivies jusqu'en janvier 2020. Les données de suivi ont été recueillies dans la base de données du CMS.

2.2 Collecte de données

2.2.1 Données cliniques et pathologiques

Pour chaque femme, les données cliniques et pathologiques ont été collectées dans la banque de données du CMS. La banque de données regroupe les femmes suivies au CMS et est mise à jour dans un processus continu par des registraires ayant une formation médicale à l'aide du dossier patient électronique (DPE). La collecte des données a été validée par un membre de l'équipe de recherche du Dre. Diorio.

Les patientes ont rempli un formulaire d'admission au CMS au moment du diagnostic. L'information incluait : l'âge au diagnostic (années), le statut ménopausique (préménopausée vs ménopausée), l'historique familial au premier degré de cancer du sein (oui vs non), l'historique personnel de cancer du sein (oui vs non), un second cancer invasif (oui vs non), consommation de tabac (fumeur/déjà fumé vs non), consommation d'alcool (nombre de consommation/semaine) et l'indice de masse corporelle

(IMC; poids [kg]/taille[m²]), calculé à partir du poids et de la taille autorapportés. Les patientes adoptées (n=4) ont été considérées comme n'ayant pas d'antécédent d'historique familial de cancer du sein. Les différents traitements reçus : traitement Herceptin néoadjuvant (oui vs non), traitement antihormonal néoadjuvant (oui vs non), traitement par chimiothérapie néoadjuvante (oui vs non) et adjuvante (oui vs non), traitement Herceptin adjuvant (oui vs non), traitement antihormonal adjuvant (oui vs non) et les traitements de radiothérapie adjuvante (oui vs non) ont été recueillies dans le DPE.

La taille de la tumeur (mm), l'envahissement ganglionnaire (nombre de ganglions atteints), le grade histologique (1— 3) et le stade TNM de la maladie (I à IV) sont des variables indépendantes qui ont un impact important sur la récurrence, et sont reconnues comme facteurs pronostiques (58, 59). Le statut des récepteurs ER (négatif vs positif), le statut des récepteurs PR (négatif vs positif) et le statut du récepteur HER2 (négatif vs positif) affectent le pronostic et la survie liée au cancer du sein. Ces variables ont été collectées au DPE à l'aide des rapports produits par les pathologistes incluant le type de chirurgie réalisée.

2.2.2 Évaluation de l'expression de RCB1 et RCB2

L'évaluation de l'expression des RCB1 et RCB2 a été réalisée sur des échantillons des spécimens de mastectomie. Les spécimens biologiques recueillis lors de la chirurgie ont été fixés avec du formol tamponné à 10 % dans un délai de 30 minutes après le prélèvement, incorporés dans de la paraffine, coupés en coupes de tissu de 4 µm, colorés à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E), et utilisés pour une évaluation pathologique de routine.

Pour évaluer l'expression protéique des RCB, nous avons utilisé des matrices tissulaires (*tissue micro array* [TMA]). La matrice tissulaire consiste à regrouper un grand nombre d'échantillons de tissu tumoral, sur un bloc de paraffine. Pour chaque femme, un bloc représentatif de la tumeur a été sélectionné par un pathologiste en aveugle des données cliniques. Par la suite, quatre carottes de 0,6 mm de tissu tumoral ont été prélevées à l'aide d'un instrument de perforation manuel (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) dans ce bloc et insérées dans un bloc de paraffine vierge.

Des sections du bloc ont ensuite été coupées en fines tranches à l'aide d'un microtome, puis montées sur des lames de microscope pour être colorées par technique d'immunohistochimie. L'utilisation de

TMA permet l'évaluation de plusieurs patientes simultanément, limitant ainsi la variabilité des mesures entre les essais, puisqu'un grand nombre de tumeurs de patientes peuvent être évaluées dans une seule expérience, avec un délai de temps réduits et à faible coût. La fiabilité de l'utilisation du TMA dans l'analyse histologique a déjà été démontrée dans le cancer du sein (60).

Ensuite, l'expression des RCB1 et RCB2 a été évaluée par immunohistochimie (IHC). L'IHC est une méthode de détection d'antigène protéique spécifique à l'intérieur d'une section de tumeur à l'aide d'anticorps spécifique qui permet de localiser ces protéines dans le tissu. Les prélèvements ont été déparaffinés et ensuite réhydratés dans un bain de toluène et d'éthanol selon les méthodes standards. Le tampon Tris-EGTA (pH9) a été utilisé pour le démasquage d'antigène (30 min, 95,6°C). Les peroxydases endogènes et les liaisons non spécifiques ont été bloquées respectivement par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 0,3% (dilué dans du méthanol) et le Super Block (IDetect). Par la suite, les lames ont été incubées avec l'anticorps primaire de RCB1 (CB1-Rb-Af380 [RRID : AB_2571591] from Frontier Institute), dilution 1 :750 et du RCB2 (anticorps polyclonal du RCB2 [101550] de Cayman Chemical), dilution 1 :250 durant une nuit à 4°C dans une chambre humide et ensuite avec l'anticorps secondaire pendant 30 min. Les lames ont été traitées avec la 3,3'-Diaminobenzidine et contre-colorées avec l'hématoxyline Mayers. Des contrôles négatifs, soit des tissus connus pour ne pas exprimer les récepteurs, ont été effectués. Des contrôles positifs ont été validés avec des lignées cellulaires et des tissus avec une expression connue pour les RCB1 et RCB2 (MCF7, BT474, SKBR3, MDA_MB_231). Les lames colorées ont été numérisées avec le scanneur NanoZoomer 2,0— HT (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA).

La lecture des lames a été réalisée sans connaissance des paramètres cliniques et pathologiques par moi-même. L'expression des RCB1 et RCB2 a été évaluée en fonction de l'intensité de la coloration et du pourcentage de coloration de chaque carotte. Le pourcentage de coloration a été estimé en fonction du nombre approximatif de cellules tumorales totales dans les carottes. S'il n'y avait pas de coloration, le résultat était de 0. Les résultats supérieurs ont été divisés en quartiles. De cette façon, on s'assure qu'il y a un nombre suffisant de cas dans chacune des catégories, et cela permet de conserver l'homogénéité à l'intérieur des catégories. Un score a été attribué pour l'intensité ; soit 0 (absent), 1 (coloration faible), 2 (coloration modérée), 3 (forte coloration) et pour le pourcentage 0 (<1 %), 1 (1-24 %), 2 (25-50 %), 3 (50-74 %), 4 (≥75 %). Par la suite, un score combiné (SC) a été calculé en

multipliant le score d'intensité par le score de pourcentage de coloration. Le SC a été dichotomisée en 2 catégories ; faible expression et forte expression, en utilisant la médiane comme seuil (47, 52). Pour la lecture des lames, la procédure a été réalisée à deux reprises. Pour les résultats discordants, une troisième procédure a été pratiquée sans avoir accès aux résultats précédents et la moyenne des trois résultats représente le résultat final. La moyenne des 4 carottes de chaque patiente a été utilisée comme résultat de l'expression du récepteur. Puis, une mesure de reproductibilité a été effectuée ($\kappa= 0,72, 0,72, 0,80$ pour le RCB1, le RCB2 cytoplasmique et le RCB2 nucléaire, respectivement).

2.2.3 Données de suivi

L'issue représente la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein. La survie globale a été définie comme le temps écoulé depuis la date diagnostic du cancer du sein jusqu'à la date du décès de toutes causes. La survie sans récurrence a été définie comme le temps écoulé entre la date de diagnostic du cancer du sein jusqu'à la date de l'apparition d'une première récurrence locorégionale ipsilatérale, ou d'une première récurrence à distance. La survie sans événement a été définie comme le temps écoulé depuis la date de diagnostic du cancer du sein jusqu'à la date de l'apparition d'une première récurrence à distance ipsilatérale, ou d'une première récurrence à distance, d'un cancer du sein invasif controlatéral, ou d'un second cancer primaire invasif ou le décès de toute cause. Les critères acceptables pour identifier la récurrence clinique :

- Patientes ayant décrit un symptôme de récurrence et qui a été confirmé comme une récurrence clinique par le médecin traitant
- Cytologie ou biopsie positive pour une récurrence locorégionale ou à distance
- Tout examen clinique effectué par un médecin confirmant une récurrence par celui-ci
- Tout examen d'imagerie médicale signalant une récurrence locorégionale ou à distance

Advenant le cas où 2 événements surviennent à l'intérieur de 2 mois, soit ; première récurrence locorégionale ipsilatérale, ou d'une première récurrence à distance, ou d'un cancer du sein invasif controlatéral, ou d'un second cancer primaire invasif ou le décès de toutes causes, nous avons analysé l'événement qui avait le moins bon pronostic en ordre de gravité (61).

Chaque femme répondant aux critères d'inclusions a été suivie dans un processus continu à partir du moment du diagnostic pour son cancer du sein invasif jusqu'à ;

- 1) Fin du suivi
- 2) Décès

La fin du suivi représente la date du dernier contact (décembre 2020) avec le système de soin ; incluant la date de la dernière visite au CMS, ou d'un appel téléphonique, ou la date de rapport d'un examen. Les participantes n'ayant pas vécu d'événement et vivantes au dernier suivi ont été traitées comme des observations censurées et les temps de survie ont été calculés à partir de la date de diagnostic jusqu'à la date de dernier contact. Principalement, la présence ou non d'un épisode de récurrence ou le statut de décès.

2.3 Analyses statistiques

Une analyse descriptive a été effectuée incluant toutes les femmes de la cohorte. La description statistique des données est présentée sous forme de moyenne avec écart-type et de la médiane avec comme intervalle l'étendue des valeurs minimales et maximales pour les variables continues. La fréquence et le pourcentage sont présentés pour les variables catégorielles. Les variables d'ajustement ont été choisies *a priori* dans un processus décisionnel élaboré et en utilisant la méthode des causes disjointes de VanderWeele (62).

Dans un premier temps, pour sélectionner les variables nous avons procédé à l'identification de tous les facteurs pronostiques dans la littérature. Précisément, tous les facteurs qui entraînent le décès toute cause, la récurrence et le décès par cancer du sein. Les articles dans la littérature sur les facteurs pronostiques du cancer du sein et les études valides incluant des analyses de survie globale et/ou sur survie spécifique au cancer du sein et/ou récurrence du cancer du sein ont été utilisés comme source. Dans un second temps, nous avons identifié tous les facteurs associés à l'expression des RCB1 et RCB2, c'est-à-dire tous les facteurs qui peuvent influencer et/ou causer le niveau d'expression des RCB. L'information a été recueillie dans la littérature portant sur des études *in vivo* et/ou *in vitro* ou dans des études populationnelles valides sur les facteurs associés à l'expression de RCB1 et RCB2 ou encore sur les facteurs pouvant influencer l'expression tissulaire RCB1 et RCB2 dans des spécimens (principalement les facteurs qui influencent la physiologie de la glande mammaire).

Par la suite, nous avons utilisé un tableau de sélection des facteurs d'ajustement selon la méthode des causes disjointes de VanderWeele (63). Cette méthode permet de minimiser le risque de biais de

confusion tout en évitant d'introduire un biais de sélection (collider). De plus, contrairement aux méthodes basées sur le changement de la mesure d'association avec une méthode de sélection descendante des variables dans un modèle, cette méthode empêche de bloquer une association en incluant à tort un facteur intermédiaire. Aussi, elle permet de contourner le problème de non-collapsibilité de certaines mesures d'association.

Pour chacune des variables, les questions suivantes étaient posées :

- Est-ce que la variable est une cause de l'exposition (RCB)?
- Est-ce que la variable est une cause de l'issue (survie/décès par cancer du sein)?
- Est-ce que la variable est un effet de l'exposition (causée par l'exposition, RCB) ?

Pour les critères de décision, si la variable est une cause de l'exposition et/ou une cause de l'issue et si elle n'est pas sur le chemin causal (n'est pas causée par l'exposition) alors l'ajustement est nécessaire. Si la variable est une cause de l'issue, mais qu'elle a aussi un effet potentiel de l'exposition, l'ajustement risque de bloquer l'association qui passe par cette variable, cette variable devra être considérée comme un facteur intermédiaire potentiel. Un modèle avec et sans ces variables a été réalisé comme analyses de sensibilité..¹

Pour répondre à notre 2^e objectif, l'association entre les facteurs pronostiques et l'expression des RCB1 et RCB2 a été évaluée par des corrélations de Spearman. Nous avons utilisé la méthode de sélection des variables d'ajustement pour les corrélations ajustées entre l'expression de RCB1 et RCB2 (continue) et les facteurs pronostiques du cancer du sein. Les facteurs pronostiques associés au risque de cancer du sein identifiés dans la littérature sont : le type histologique (canalaire, lobulaire, et mixte), la taille de la tumeur (mm), l'envahissement ganglionnaire (nombre atteint), le grade de la tumeur (1-3), le stade TNM (I-IV), le statut du récepteur ER (oui vs non), statut du récepteur PR (oui vs non) et le statut HER2 (oui vs non). Les variables associées aux facteurs pronostiques du cancer du sein identifiés dans la littérature sont l'âge (années), le statut ménopausique (préménopausée vs ménopausée), l'IMC (kg/m²), l'historique familial au premier degré de cancer du sein (oui vs non), les antécédents personnels de cancer du sein (oui vs non), un traitement hormonal substitutif (oui vs non),

¹ Les variables qui sont des causes de l'issue seulement et qui ne sont pas sur le chemin causal peuvent être rajoutées dans le modèle après l'étape de sélection même si elles ne sont pas des causes de l'exposition, car elles peuvent augmenter la précision du modèle.

un traitement par chimiothérapie antérieure (oui vs non) et un traitement par radiothérapie antérieure (oui vs non). Dans les études du cancer du sein d'autres variables ont été utilisées notamment, l'ethnicité, l'état matrimonial et le statut socio-économique. Les facteurs qui peuvent influencer l'expression de RCB1 et RCB2 et/ou la physiologie du tissu mammaire sont : l'âge (années), le statut ménopausique (préménopausée vs ménopausée), l'IMC (kg/m²) ou le tour de taille (cm), la parité (aucun vs au moins un enfant vivant), l'allaitement (oui vs non), un traitement hormonal substitutif (oui vs non), la consommation de tabac (fumeur/déjà fumé vs non) et/ou d'alcool (nombre de consommation/semaine), la consommation de cannabis, la présence d'un antécédent de cancer du sein ipsilatéral (oui vs non), un traitement de chimiothérapie antérieure quel que soit la cause (néoadjuvante ou pour un second cancer invasif) (oui vs non), de la radiothérapie sur le même sein (par exemple : cancer du sein antérieur, cancer du poumon, lymphome thoracique) (oui vs non) (tableau 2).

Pour les corrélations de Spearman entre les RCB et les facteurs pronostiques, les modèles retenus sont les suivants :

1. Brut : sans ajustement
2. Optimal (méthode de VanderWeele)
 - Âge
 - Statut ménopausique
 - Ethnie (si population multiethnique)
 - Statut socio-économique
 - Traitement hormonal substitutif
 - Consommation de tabac
 - Consommation d'alcool
 - Consommation de cannabis
 - Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
 - Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
 - Radiothérapie antérieure sur le même sein

Pour les analyses de sensibilité :

3. Modèle optimal avec les facteurs intermédiaires potentiels (IMC)
 - Âge
 - Statut ménopausique

- Ethnie (si population multiethnique)
- Statut socio-économique
- Traitement hormonal substitutif
- Consommation de tabac
- Consommation d'alcool
- Consommation de cannabis
- Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
- Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
- Radiothérapie antérieure sur le même sein
- IMC/ tour de taille

Pour répondre à notre 3^e objectif, l'association entre l'expression des RCB1 et RCB2 et la survie a été évaluée par les rapports de risque (HR) à l'aide de modèles de risques proportionnels multivariés de Cox. Des analyses de sensibilité ont également été réalisées pour prendre en considération les facteurs intermédiaires potentiels. La méthode de sélection des variables présentée ci-haut doit être appliquée à chacune des issues. Pour la survie globale les facteurs associés au risque de décès de toutes causes identifiées dans la littérature sont : l'âge (années), le statut ménopausique (préménopausée vs ménopausée), la présence de comorbidités (présence de diabète, d'hypertension, maladie cardiaque, maladie respiratoire, insuffisance rénale ou hépatique), la taille de la tumeur (mm), le grade histologique (1-3), l'envahissement ganglionnaire (0, ≤ 3 , 3-10, ≥ 10), la présence de métastases à distance au moment du diagnostic (ou stade TNM) (oui vs non), le statut ER/PR (oui vs non), le statut HER2 (oui vs non), les différents traitements; chimiothérapie (oui vs non), antihormonal (oui vs non), et anti HER2 (Herceptin)²(oui vs non). D'autres variables ont aussi été utilisées dans les études de survie pour le cancer du sein, notamment, l'ethnicité, l'état matrimonial, le statut socio-économique et l'année du diagnostic (lorsque la période de recrutement est supérieure à 5 ans, cela permet de prendre en compte les changements de pratique médicale). Maintenant, les facteurs qui peuvent influencer l'expression des RCB1 et RCB2 (continue) et/ou la physiologie du tissu mammaire sont : l'âge (années), le statut ménopausique (préménopausées vs ménopausées), l'IMC(kg/m²) ou le tour de taille (cm), la parité (aucun vs au moins un enfant vivant), l'allaitement (oui vs non) ou la durée

² La radiothérapie et le type de chirurgie (mastectomie totale vs mastectomie partielle) influencent le risque de récurrence locale, mais pas le risque de décès.

(mois), la présence d'un traitement hormonal substitutif (oui vs non), la consommation de tabac (fumeur/déjà fumé, non), d'alcool (oui vs non) ou de drogue, un antécédent de cancer du sein ipsilatéral (oui vs non), un traitement de chimiothérapie néoadjuvante (oui vs non) ou pour un autre type de cancer, un traitement de radiothérapie sur le même sein (oui vs non), soit pour un cancer du sein antérieur ou pour un autre type de cancer. Le tableau 3 présente la méthode de sélection³. Pour la survie globale, les modèles retenus sont les suivants :

1. Brut : sans ajustement
2. Optimal (méthode de VanderWeele)
 - Âge
 - Ethnie (si population multiethnique)
 - Statut socio-économique
 - Consommation de tabac
 - Consommation d'alcool
 - Consommation de Cannabis
 - Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
 - Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
 - Traitement Herceptin néoadjuvant
 - Traitement antihormonal néoadjuvant
3. Modèle complet : variables nécessaires selon la méthode de VanderWeele et variables associées à l'issue seulement (pour augmenter la précision)
 - Âge
 - *Année du diagnostic (si recrutement sur >5 ans)*
 - *Présence de comorbidités*
 - Ethnie (si population multiethnique)
 - Statut socio-économique
 - Consommation de tabac

³ S'il n'est pas possible de distinguer les traitements néoadjuvants des traitements adjuvants, c. à d. qu'une seule variable dans la base de données pour laquelle la valeur 1 signifie avoir reçu un traitement néoadjuvant ou adjuvant (de chimiothérapie, de radiothérapie, d'hormonothérapie ou de Herceptin), cette variable peut être utilisée comme une combinaison des deux dans un modèle optimal et complet. Dans ce cas, le modèle optimal et le modèle complet seront identiques (sauf pour l'année du diagnostic, et la présence de comorbidité). Ces variables pourront donc être gardées dans le modèle complet.

- Consommation d'alcool
- Consommation de Cannabis
- Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
- Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
- Traitement Herceptin néoadjuvant
- Traitement antihormonal néoadjuvant
- *Traitement par chimiothérapie adjuvante*
- *Traitement Herceptin adjuvant*
- *Traitement antihormonal adjuvant*

Pour les analyses de sensibilité :

4. Modèle optimal avec facteurs intermédiaires potentiels

- Âge
- Ethnie (si population multiethnique)
- Statut socio-économique
- Consommation de tabac
- Consommation d'alcool
- Consommation de Cannabis
- Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
- Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
- Traitement Herceptin néoadjuvant
- Traitement antihormonal néoadjuvant

Facteurs intermédiaires potentiels :

- IMC/tour de taille
- Taille de la tumeur
- Grade histologique
- Atteinte ganglionnaire
- Métastase à distance au moment du diagnostic
- Stade TNM
- Statut ER/PR
- Statut HER2

5. Modèle complet avec facteurs intermédiaires potentiels

- Âge
- Année du diagnostic (si recrutement sur >5 ans)
- Présence de comorbidités
- Ethnie (si population multiethnique)
- Statut socio-économique
- Consommation de tabac
- Consommation d'alcool
- Consommation de Cannabis
- Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
- Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
- Traitement Herceptin néoadjuvant
- Traitement antihormonal néoadjuvant
- Traitement par chimiothérapie adjuvante
- Traitement Herceptin adjuvant
- Traitement antihormonal adjuvant

Facteurs intermédiaires potentiels :

- IMC/tour de taille
- Taille de la tumeur
- Grade histologique
- Atteinte ganglionnaire
- Métastase à distance au moment du diagnostic
- Stade TNM
- Statut ER/PR
- Statut HER2

Pour la survie sans récurrence, les facteurs pronostiques associés au risque de décès de toutes causes identifiées dans la littérature sont : l'âge (années), l'historique familial au premier degré de cancer du sein (oui vs non), le statut ménopausique (préménopausée vs ménopausée), la taille de la tumeur (mm), le grade histologique (1-3), le type histologique (canalaire vs lobulaire), l'envahissement ganglionnaire (nombre de ganglions atteint), la présence de métastases à distance au moment du

diagnostic (ou stade TNM) (I-IV), le statut ER/PR (oui vs non), le statut HER2 (oui vs non), les différents traitements; chimiothérapie (oui vs non), antihormonal (oui vs non), et anti HER2 (Herceptin) (oui vs non), un traitement de radiothérapie sur le même sein, soit pour un cancer du sein antérieur ou pour un autre type de cancer (oui vs non) et radiothérapie adjuvante (oui vs non) ainsi que le type de chirurgie (mastectomie totale vs mastectomie partielle). Parmi les autres variables utilisées dans les études de survie, l'ethnicité, l'état matrimonial, le statut socio-économique et l'année du diagnostic ont été pris en compte. Le tableau 4 présente la méthode de sélection. Pour la survie sans récurrences, les modèles retenus sont les suivants :

1. Brut : sans ajustement
2. Optimal (méthode de VanderWeele)
 - Âge
 - Statut ménopausique
 - Historique familial
 - Ethnie (si population multiethnique)
 - Statut socio-économique
 - Consommation de tabac
 - Consommation d'alcool
 - Consommation de Cannabis
 - Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
 - Radiothérapie sur le même sein antérieure
 - Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
 - Traitement Herceptin néoadjuvant
 - Traitement antihormonal néoadjuvant
3. Modèle complet : variables nécessaires selon la méthode de VanderWeele et variables associées à l'issue seulement (pour augmenter la précision)
 - Âge
 - Statut ménopausique
 - Historique familial de cancer du sein
 - Année du diagnostic (si recrutement sur >5 ans)
 - Présence de comorbidités
 - Ethnie (si population multiethnique)

- Statut socio-économique
- Consommation de tabac
- Consommation d'alcool
- Consommation de Cannabis
- Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
- Radiothérapie sur le même sein antérieure
- Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
- Traitement Herceptin néoadjuvant
- Traitement antihormonal néoadjuvant
- Traitement par chimiothérapie adjuvante
- Traitement Herceptin adjuvant
- Traitement antihormonal adjuvant
- Radiothérapie adjuvante
- Type de chirurgie

Pour les analyses de sensibilité :

4. Modèle optimal avec facteurs intermédiaires potentiels

- Âge
- Statut ménopausique
- Historique familial de cancer du sein
- Ethnie (si population multiethnique)
- Statut socio-économique
- Consommation de tabac
- Consommation d'alcool
- Consommation de Cannabis
- Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
- Radiothérapie sur le même sein antérieure
- Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
- Traitement Herceptin néoadjuvant
- Traitement antihormonal néoadjuvant

Facteurs intermédiaires potentiels :

- IMC/tour de taille
- Taille de la tumeur
- Grade histologique
- Atteinte ganglionnaire
- Métastase à distance au moment du diagnostic
- Stade TNM
- Statut ER/PR
- Statut HER2

5. Modèle complet avec facteurs intermédiaires potentiels

- Âge
- Statut ménopausique
- Historique familial de cancer du sein
- Année du diagnostic (si recrutement sur >5 ans)
- Présence de comorbidités
- Ethnie (si population multiethnique)
- Statut socio-économique
- Consommation de tabac
- Consommation d'alcool
- Consommation de Cannabis
- Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
- Radiothérapie sur le même sein antérieure
- Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
- Traitement Herceptin néoadjuvant
- Traitement antihormonal néoadjuvant
- Traitement par chimiothérapie adjuvante
- Traitement Herceptin adjuvant
- Traitement antihormonal adjuvant
- Radiothérapie adjuvante
- Type de chirurgie

Facteurs intermédiaires potentiels :

- IMC/tour de taille
- Taille de la tumeur
- Grade histologique
- Atteinte ganglionnaire
- Métastase à distance au moment du diagnostic
- Stade TNM
- Statut ER/PR
- Statut HER2

En comparant les modèles pour la survie globale et la survie sans récurrence, 6 variables sont différentes : le statut de ménopause, l'histoire familiale de cancer du sein et la radiothérapie sur le même sein antérieure (nécessaire pour la survie sans récurrence), le type de chirurgie, la radiothérapie adjuvante (optionnelles pour la survie sans récurrence) et la présence de comorbidités (optionnelle pour la survie globale). Ces 6 variables ne se trouvent pas sur le chemin causal entre l'expression de RCB1 et RCB2 et la survie globale. Pour simplifier, on pourrait inclure ces variables dans les modèles de survie globale et ainsi inclure les mêmes variables dans chaque type de modèle pour ces deux issues (survie globale et sans récurrence). La survie sans événement est composée à la fois des décès toutes causes et des récurrences, les mêmes variables d'ajustement, identifiées plus haut, de chacune de ces deux issues vont s'appliquer. Les facteurs associés au décès de toutes causes sont aussi associés à la survenue d'autres cancers, alors que les facteurs associés à la récurrence sont aussi ceux associés au risque d'un second cancer du sein. Finalement, les mêmes variables d'ajustement vont être utilisées pour toutes les issues. Trois modèles ont été construits pour chacune d'elle :

1. Brut : sans ajustement
2. Optimal (méthode de VanderWeele)
 - Âge
 - Statut ménopausique
 - Historique familial de cancer du sein
 - Ethnie (si population multiethnique)
 - Statut socio-économique
 - Consommation de tabac

- Consommation d'alcool
 - Consommation de Cannabis
 - Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
 - Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
 - Traitement Herceptin néoadjuvant
 - Traitement antihormonal néoadjuvant
3. Modèle complet : variables nécessaires selon la méthode de VanderWeele et variables associées à l'issue seulement (pour augmenter la précision)
- Âge
 - Statut ménopausique
 - Historique familial de cancer du sein
 - Année du diagnostic (si recrutement sur >5 ans)
 - Présence de comorbidités
 - Ethnie (si population multiethnique)
 - Statut socio-économique
 - Consommation de tabac
 - Consommation d'alcool
 - Consommation de Cannabis
 - Antécédent de cancer du sein ipsilatéral
 - Radiothérapie sur le même sein antérieure
 - Traitement par chimiothérapie néoadjuvante ou antérieure pour autre cause
 - Traitement Herceptin néoadjuvant
 - Traitement antihormonal néoadjuvant
 - Traitement par chimiothérapie adjuvante
 - Traitement Herceptin adjuvant
 - Traitement antihormonal adjuvant
 - Radiothérapie adjuvante
 - Type de chirurgie

Pour les analyses de sensibilité, nous avons considéré les modèles suivants :

- 1) Modèle optimal incluant les variables intermédiaires potentielles
- 2) Modèle complet incluant les variables intermédiaires potentielles

Les variables de l'issue sont dichotomiques, 1 si l'événement a lieu avant la fin du suivi et 0 si aucun événement n'est survenu. Les intervalles de confiance ont été fixés à 95 %. L'hypothèse de proportionnalité a été testée. Pour les variables qui ne respectaient pas l'hypothèse de proportionnalité, un terme d'interaction en fonction du temps a été utilisé. La forme fonctionnelle des variables continues a été validée ainsi que la multicollinéarité. Puis finalement, nous avons vérifié que les modèles ne comportaient pas de valeurs influentes ou extrêmes (Annexe B). Les valeurs de p sont basées sur le test de Wald. Ce modèle d'analyse statistique est largement utilisé pour analyser des données de survie lorsque l'objectif est d'évaluer l'effet de variables sur la survie. Il est également reconnu pour être robuste.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS (9.4).

Tableau 2: Sélection des variables d'ajustement pour les facteurs pronostiques

Variable	Description	Cause l'expression de CB1/CB2	Cause les facteurs pronostiques	Causé par l'expression de CB1/CB2	Décision
Âge (ans)	Continue	Possible	Oui	Non	Ajustement nécessaire
Statut de ménopause (pré/post)	Dichotomique	Possible	Oui	Non	Ajustement nécessaire
Ethnie	Nominal	Possible	Oui	Non	Ajustement nécessaire si population multiethnique
État matrimonial (couple/seul)	Dichotomique	Non	Possible	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Statut socio-économique	Ordinal	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire
IMC/tour de taille	Continue	Possible	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Parité (oui/non)	Dichotomique	Possible	Non	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Allaitement (oui/non)	Dichotomique	Possible	Non	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Traitement hormonal substitutif (oui/non)	Dichotomique	Possible	Oui	Non	Ajustement nécessaire
Tabac/Alcool (oui/non)	Dichotomique	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire

Consommation de Cannabis (oui/non)	Dichotomique	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire
Antécédent de cancer du sein ipsilatéral (oui/non)	Dichotomique	Possible	Oui	Non	Ajustement nécessaire
Traitement par chimiothérapie antérieure (oui/non)	Dichotomique	Oui si néoadjuvant ou antérieur ; non si adjuvant	Oui	Non	Ajustement nécessaire si néoadjuvant ou antérieur ; Ajustement non nécessaire si adjuvant (si disponible)
Radiothérapie sur le même sein antérieure (oui/non)	Dichotomique	Oui	Oui	Non	Ajustement nécessaire

CB1 : cannabinoïdes 1; CB2 : cannabinoïdes 2; IMC : indice de masse corporel (kg/m²); En gras : facteurs associés à la survie.

Tableau 3: Sélection des variables d'ajustement pour la survie globale (décès de toutes causes)

Variable	Description	Cause l'expression de CB1/CB2	Cause les décès de toute cause	Causé par l'expression de CB1/CB2	Décision
Âge (ans)	Continue	Possible	Oui	Non	Ajustement nécessaire
Année du diagnostic	Nominale	Non	Possible	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Statut de ménopause (pré/post)	Dichotomique	Possible	Non	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Ethnie	Nominal	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire si population multiethnique
État matrimonial (couple/seul)	Dichotomique	Non	Possible	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Statut socio-économique	Ordinal	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire
IMC/tour de taille	Continue	Possible	Possible	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Parité (oui/non)	Dichotomique	Possible	Non	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Allaitement (oui/non)	Dichotomique	Possible	Non	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Traitement hormonal substitutif (oui/non)	Dichotomique	Possible	Non	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Tabac/Alcool (oui/non)	Dichotomique	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire
Consommation de Cannabis (oui/non)	Dichotomique	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire
Antécédent de cancer du sein ipsilatéral (oui/non)	Dichotomique	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire

Présence de comorbidité (oui/non)	Dichotomique	Pas de données	Oui	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Taille de la tumeur (cm)	Continue	Possible	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Grade histologique (1, 2, 3)	Ordinale	Possible	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Atteinte ganglionnaire (oui, non)	Dichotomique	Non	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Métastase à distance au moment du diagnostic (oui/non)	Dichotomique	Non	Oui	Possible	Fc intermédiaire possible Modèles avec et sans
Stade TNM (I, II, III, IV)	Ordinale	Non	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Statut ER/PR (Positif/négatif)	Dichotomique	Possible	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Statut HER2 (positif/négatif)	Dichotomique	Possible	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Traitement par chimiothérapie (oui/non)	Dichotomique	Oui si néoadjuvant ou antérieur ; non si adjuvant	Oui	Non	Ajustement nécessaire si néoadjuvant ou antérieur ; Ajustement non nécessaire si adjuvant (si disponible)
Radiothérapie sur le même sein antérieure (oui/non)	Dichotomique	Oui	Non	Non	Ajustement non nécessaire

Traitement Herceptin (oui/non)	Dichotomique	Oui si néoadjuvant ; non si adjuvant	Oui	Non	Ajustement nécessaire si néoadjuvant; Ajustement non nécessaire si adjuvant (si disponible)
Traitement antihormonal (IA ou tamoxifène) (oui/non)	Dichotomique	Oui si néoadjuvant ; non si adjuvant	Oui	Non	Ajustement nécessaire si néoadjuvant; Ajustement non nécessaire si adjuvant (si disponible)

CB1 : cannabinoïdes 1; CB2 : cannabinoïdes 2; IMC : indice de masse corporel (kg/m²); En gras : facteurs associés à la survie.

Tableau 4: Sélection des variables d'ajustement pour la survie sans récurrence (carcinome invasif seulement, récurrence locale, régionale ou à distance)

Variable	Description	Cause l'expression de CB1/CB2	Cause la récurrence	Causé par l'expression de CB1/CB2	Décision
Âge (ans)	Continue	Possible	Oui	Non	Ajustement nécessaire
Année du diagnostic	Nominale	Non	Possible	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Statut de ménopause (pré/post)	Dichotomique	Possible	Oui	Non	Ajustement nécessaire
Ethnie	Nominal	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire si population multiethnique
État matrimonial (couple/seul)	Dichotomique	Non	Possible	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Statut socio-économique	Ordinal	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire
IMC/tour de taille	Continue	Possible	Possible	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Histoire familiale de cancer du sein (oui/non)	Dichotomique	Possible	Oui	Non	Ajustement nécessaire
Parité (oui/non)	Dichotomique	Possible	Non	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Allaitement (oui/non)	Dichotomique	Possible	Non	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Traitement hormonal substitutif (oui/non)	Dichotomique	Possible	Non	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Tabac/Alcool (oui/non)	Dichotomique	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire
Consommation de Cannabis (oui/non)	Dichotomique	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire

Antécédent de cancer du sein ipsilatéral (oui/non)	Dichotomique	Possible	Possible	Non	Ajustement nécessaire
Présence de comorbidité (oui/non)	Dichotomique	Pas de données	Non	Non	Ajustement non nécessaire (si disponible)
Taille de la tumeur (cm)	Continue	Possible	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Type histologique	Dichotomique	Possible	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Grade histologique (1, 2, 3)	Ordinale	Possible	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Atteinte ganglionnaire (oui, non)	Dichotomique	Non	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Métastase à distance au moment du diagnostic (Oui/non)	Dichotomique	Non	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Stade TNM (I, II, III, IV)	Ordinale	Non	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Statut ER/PR (Positif/négatif)	Dichotomique	Possible	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Statut HER2 (positif/négatif)	Dichotomique	Possible	Oui	Possible	Facteur intermédiaire possible Modèles avec et sans
Traitement par chimiothérapie (oui/non)	Dichotomique	Oui si néoadjuvant ou antérieur ; non si adjuvant	Oui	Non	Ajustement nécessaire si néoadjuvant ou antérieur ; Ajustement non nécessaire si adjuvant (si disponible)

Radiothérapie sur le même sein antérieure (oui/non)	Dichotomique	Oui	Oui	Non	Ajustement nécessaire
Traitement Herceptin (oui/non)	Dichotomique	Oui si néoadjuvant ; non si adjuvant	Oui	Non	Ajustement nécessaire si néoadjuvant; Ajustement non nécessaire si adjuvant (si disponible)
Traitement antihormonal (IA ou tamoxifène) (oui/non)	Dichotomique	Oui si néoadjuvant ; non si adjuvant	Oui	Non	Ajustement nécessaire si néoadjuvant; Ajustement non nécessaire si adjuvant (si disponible)
Radiothérapie adjuvante (oui/non)	Dichotomique	Non	Oui	Non	Ajustement non nécessaire
Type de chirurgie	Dichotomique	Non	Oui	Non	Ajustement non nécessaire

CB1 : cannabinoïdes 1; CB2 : cannabinoïdes 2; IMC : indice de masse corporel (kg/m²); En gras : facteurs associés à la survie.

Chapitre 3 <Résultats >

Dans ce chapitre nous avons répondu à notre premier objectif, celui de décrire l'expression protéique des RCB dans les tumeurs mammaires.

3.1 Résultats — objectif 1

3.1.1 Description de la population

Cette étude a été réalisée sur une série consécutive de 522 femmes diagnostiquées d'un cancer du sein invasif au CMS. Les caractéristiques des patientes incluant les facteurs de risques et les facteurs pronostiques sont décrits dans le tableau 5.

Le suivi médian était de 92,0 mois (moyenne $84,7 \pm 20,7$ mois, intervalle 7,0-114,0). L'âge médian des femmes lors du diagnostic était de 61,0 ans (moyenne $61,2 \pm 12,6$, intervalle 24,0-92,0). Principalement, les femmes étaient âgées entre 24 et 92 ans (médiane=61), et 76,4% d'entre elles étaient ménopausées. La plupart ont reçu un diagnostic de carcinome canalaire infiltrant stades II et III. Les femmes ont rapporté consommer de l'alcool socialement et leur IMC variait de 15,2 à 45,9. Durant l'étude, 143 (27,4%) femmes ont eu un événement incluant l'apparition d'une première récurrence ipsilatérale, ou d'une première récurrence à distance, d'un cancer du sein invasif controlatéral, ou d'un second cancer primaire invasif ou le décès de toutes causes, 74 (14,2%) ont eu une récurrence locorégionale ou à distance alors que 86 (16,5%) sont décédées.

Tableau 5: Caractéristiques des femmes selon l'expression du RCB1 et RCB2

Caractéristiques*	Total (n=522)	RCB1 (n=489)		RCB2 cytoplasmique (n=475)		RCB2 nucléaire (n=475)	
		Faible* (n=235)	Forte* (n=254)	Faible* (n=211)	Forte* (n=264)	Faible* (n=206)	Forte* (n=269)
Age (années)							
Moyenne ± ET	61,2 ± 12,6	62,3 ± 12,6	60,4 ± 12,9	62,9 ± 12,6	60,0 ± 12,8	61,9 ± 13,3	60,8 ± 12,3
Médiane [intervalle]	61,0 [24,0-92,0]	63,0 [32,0-91,0]	61,0 [24,0-92,0]	64,0 [24,0-91,0]	61,0 [25,0-92,0]	63,0 [24,0-91,0]	61,0 [25,0-92,0]
Ménopausé	399 (76,4%)	186 (79,2%)	189 (74,4%)	168 (79,6%)	194 (73,5%)	155 (75,2%)	207 (77,0%)
Historique familial de cancer du sein (oui)	245 (46,9%)	110 (46,8%)	123 (48,4%)	97 (45,9%)	125 (47,4%)	96 (46,6%)	126 (46,8%)
Déjà fumé	254 (48,7%)	119 (50,6%)	118 (46,5%)	112 (53,1%)	120 (45,5%)	95 (46,1%)	137 (50,9%)
Consommation d'alcool (oui)	337 (64,6%)	147 (62,6%)	168 (66,1%)	128 (60,7%)	179 (67,8%)	131 (63,6%)	176 (65,4%)
Indice de masse corporel (kg/m²)							
Moyenne ± ET	26,3 ± 5,2	25,8 ± 5,2	26,6 ± 5,3	26,1 ± 5,0	26,4 ± 5,5	26,3 ± 5,2	26,2 ± 5,3
Médiane [intervalle]	25,5 [15,2-45,9]	24,6 [16,3-44,1]	25,6 [15,2-45,9]	25,0 [17,7-44,1]	25,5 [15,2-45,9]	25,6 [16,3-44,6]	25,3 [15,2-45,9]
Historique personnel de cancer du sein (oui)	63 (12,1%)	25 (10,6%)	32 (12,6%)	26 (12,3%)	29 (11,0%)	23 (11,2%)	32 (11,9%)
Type histologique							
Ductal, invasif	451 (86,4%)	204 (86,8%)	220 (86,6%)	180 (85,3%)	235 (89,0%)	189 (91,8%)	226 (84,0%)
Lobulaire, invasif	56 (10,7%)	27 (11,5%)	24 (9,5%)	24 (11,4%)	23 (8,7%)	12 (5,8%)	35 (13,0%)
Mixte ductal et lobulaire, invasif	15 (2,9%)	4 (1,7%)	10 (3,9%)	7 (3,3%)	6 (2,3%)	5 (2,4%)	8 (3,0%)
Grade tumoral							

1	86 (16,5%)	39 (16,6%)	38 (15,0%)	30 (14,2%)	42 (18,9%)	23 (11,2%)	49 (18,2%)
2	258 (49,4%)	112 (47,7%)	130 (51,2%)	119 (56,4%)	116 (43,9%)	90 (43,7%)	145 (53,9%)
3	178 (34,1%)	84 (35,7%)	86 (33,9%)	62 (29,4%)	106 (40,2%)	93 (45,2%)	75 (27,9%)
Taille de la tumeur							
≤2 cm	293 (56,1%)	130 (55,3%)	140 (55,1%)	114 (54,0%)	148 (56,1%)	110 (53,4%)	152 (56,5%)
>2 and ≤5 cm	209 (40,0%)	101 (43,0%)	99 (39,0%)	89 (42,2%)	106 (40,2%)	93 (45,2%)	102 (37,9%)
>5 cm	20 (3,8%)	4 (1,7%)	15 (5,9%)	8 (3,8%)	10 (3,8%)	3 (1,5%)	15 (5,6%)
Envahissement ganglionnaire							
0	312 (59,8%)	153 (65,1%)	137 (53,9%)	135 (64,0%)	146 (55,3%)	125 (60,7%)	156 (58,0%)
1-3	146 (28,0%)	60 (25,5%)	78 (30,7%)	55 (26,1%)	80 (30,3%)	59 (28,6%)	76 (28,3%)
4-9	42 (8,0%)	17 (7,2%)	22 (8,7%)	14 (6,6%)	26 (9,8%)	18 (8,7%)	22 (8,2%)
≥10	22 (4,2%)	5 (2,1%)	17 (6,7%)	7 (3,3%)	12 (4,6%)	4 (1,9%)	15 (5,6%)
Stade TNM							
I	203 (38,9%)	96 (40,9%)	91 (35,8%)	84 (39,8%)	97 (36,7%)	76 (36,9%)	105 (39,0%)
II	241 (46,2%)	110 (46,8%)	119 (46,9%)	101 (47,9%)	122 (46,2%)	104 (50,5%)	119 (44,2%)
III	71 (13,6%)	28 (11,9%)	38 (18,0%)	25 (11,9%)	39 (14,8%)	24 (11,7%)	40 (14,9%)
IV	7 (1,3%)	1 (0,4%)	6 (2,4%)	1 (0,5%)	6 (2,3%)	2 (1,0%)	5 (1,9%)
Statut ER							
Négatif	64 (12,3%)	29 (12,3%)	30 (11,8%)	35 (16,6%)	25 (9,5%)	37 (18,0%)	23 (8,6%)
Positif	458 (87,7%)	206 (87,7%)	224 (88,2%)	176 (83,4%)	239 (90,5%)	169 (82,0%)	246 (91,5%)
Statut PR							
Négatif	108 (20,7%)	46 (19,6%)	52 (20,5%)	51 (24,1%)	47 (17,8%)	53 (25,7%)	45 (16,7%)
Positif	414 (79,3%)	189 (80,4%)	202 (79,5%)	160 (75,8%)	217 (82,2%)	153 (74,3%)	224 (83,3%)
Statut HER2							
Négatif	455 (87,2%)	215 (91,5%)	210 (82,7%)	191 (90,5%)	222 (84,1%)	180 (87,4%)	233 (86,6%)
Positif	67 (12,8%)	20 (8,5%)	44 (17,3%)	20 (9,5%)	42 (15,9%)	26 (12,6%)	36 (13,4%)

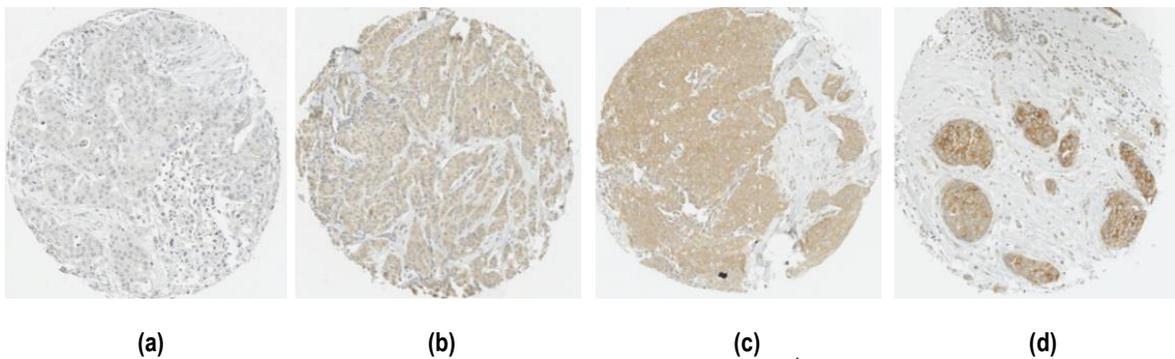
Chirurgie							
Partielle	384 (73,6%)	173 (73,6%)	187 (73,6%)	156 (73,9%)	195 (73,9%)	154 (74,8%)	197 (73,2%)
Totale	138 (26,4%)	62 (26,4%)	67 (26,4%)	55 (26,1%)	69 (26,1%)	52 (25,2%)	72 (26,8%)
Chimiothérapie avant la chirurgie (oui)							
	6 (1,2%)	1 (0,4%)	2 (0,8%)	1 (0,5%)	2 (0,8%)	1 (0,5%)	2 (0,7%)
Hormonothérapie avant la chirurgie (oui)							
	6 (1,2%)	3 (1,3%)	3 (1,2%)	4 (1,9%)	2 (0,8%)	1 (0,5%)	5 (1,9%)
Chimiothérapie après la chirurgie (oui)							
	263 (50,4%)	108 (46,0%)	138 (54,3%)	94 (44,6%)	146 (55,3%)	106 (51,5%)	134 (49,8%)
Radiothérapie après la chirurgie (oui)							
	414 (79,3%)	184 (78,3%)	204 (80,3%)	164 (77,7%)	212 (80,3%)	163 (79,1%)	213 (79,2%)
Hormonothérapie après la chirurgie (oui)							
	433 (83,0%)	189 (80,4%)	217 (85,4%)	164 (77,7%)	229 (86,7%)	157 (76,2%)	236 (87,7%)
Trastuzumab après la chirurgie (oui)							
	59 (11,3%)	20 (8,4%)	36 (14,2%)	15 (7,1%)	39 (14,8%)	23 (11,2%)	31 (11,5%)
Suivi (mois)							
Moyenne ± ET	84,7 ± 20,7	83,0 ± 21,7	86,3 ± 19,6	84,6 ± 20,8	84,4 ± 21,2	84,71 ± 21,2	84,7 ± 20,9
Médiane [intervalle]	92,0 [7,0-114,0]	91,0 [7,0-112,0]	93,0 [11,0-114]	93,0 [7,0-112,0]	92,0 [7,0-114,0]	92,0 [14,0-112,0]	92,0 [7,0-114,0]
Issue							
Décès	86 (16,5%)	41 (17,5%)	40 (15,8%)	39 (18,5%)	43 (16,3%)	42 (20,4%)	40 (14,9%)
Récidives [§]	74 (14,2%)	31 (13,2%)	36 (14,2%)	24 (11,4%)	44 (16,7%)	31 (15,1%)	37 (13,8%)
Événements [†]	143 (27,4%)	65 (27,7%)	69 (27,2%)	60 (28,4%)	74 (28,0%)	65 (31,6%)	69 (25,7%)

RCB1 : récepteurs cannabinoïdes 1; RCB2 : récepteurs cannabinoïdes 2; n= nombre; Intervalle : étendue des valeurs minimales et maximales; ET: écart-type; ER : récepteur à l'œstrogène; PR : récepteur à la progestérone; HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain; [†]Décès, récurrences, second cancer

3.1.2 Évaluation immunohistochimique de l'expression des RCB

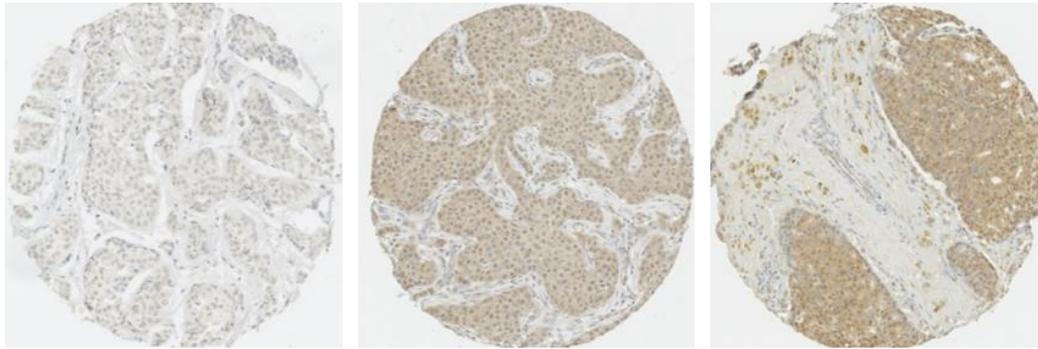
Lors de l'évaluation immunohistochimique, certaines carottes ont été éliminées en raison d'un nombre insuffisant de cellules tumorales ou parce que celles-ci n'étaient pas interprétables. Pour le RCB1, 476 (23,1%) carottes ont été exclues alors que pour le RCB2, 514 (24,6%) ont été exclues (Annexe C). Nous avons observé que le tissu non cancéreux n'exprimait aucun récepteur. Les figures 4 et 5 représentent un échantillon des TMA et le score d'intensité pour les RCB.

Figure 4: Échantillon TMA représentant l'intensité du marquage du RCB1



Score d'intensité pour l'expression du RCB1; (a) 0 (absent); (b) 1 (faible); (c) 2 (modéré); (d) 3 (forte). Échelle: 10X

Figure 5: Échantillon TMA représentant l'intensité du marquage du RCB2



(a) **(b)** **(c)**
Score d'intensité pour l'expression du RCB2; (a) 0 (absent); (b) 1 (faible); (c) 2 (modéré); (d) 3 (forte). Échelle: 10X

Dans les échantillons des biopsies du sein, l'expression du RCB1 était hétérogène, c'est-à-dire que l'expression des récepteurs variait d'une patiente à l'autre, mais aussi à l'intérieur d'une même tumeur et était présente dans le cytoplasme. En tout, nous avons évalué 2056 carottes pour le RCB1 ce qui représente 489 (93,7%) femmes. Enfin, une faible expression était présente chez 235 femmes (48,0%) alors que 254 femmes (51,9%) avaient une expression élevée.

Pour le RCB2, l'expression était hétérogène et a été détectée dans le cytoplasme et dans le noyau. Nous avons évalué 2091 carottes pour un total de 475 (91,0%) femmes. Parmi ces cas, 211 (44,4%) avaient une faible expression cytoplasmique et 264 (55,6%) avaient une forte expression. Alors que 206 (43,4%) avaient une faible expression nucléaire et 269 (56,6%) avaient une forte expression.

Nous avons observé que les femmes ayant une forte expression pour le RCB1 étaient plus souvent préménopausées, avaient en moyenne un IMC de 26,6, étaient moins souvent fumeuses, consommaient de l'alcool socialement, avaient une tumeur de grade histologique II, et un cancer du sein de stade TNM II. On retrouvait aussi un nombre plus élevé de tumeurs de plus de 5 cm et un nombre de ganglions envahis qui dépassait plus souvent 10 chez ces patientes comparativement aux patientes ayant une faible expression.

Pour le RCB2 cytoplasmique, nous avons observé chez les femmes ayant une forte expression qu'elles étaient plus souvent préménopausées, avaient en moyenne un IMC de 26,4, étaient moins souvent fumeuses, consommaient de l'alcool socialement, avaient une tumeur de grade histologique II, et un

cancer du sein de stade TNM II. On retrouvait aussi un nombre plus élevé de tumeurs de moins de 2 cm et la plupart du temps aucun envahissement ganglionnaire comparativement aux patientes ayant une faible expression.

Puis, nous avons observé chez les femmes ayant une forte expression du RCB2 nucléaire qu'elles étaient plus souvent ménopausées, avaient en moyenne un IMC de 26,2, étaient plus souvent fumeuses, consommaient de l'alcool socialement, avaient une tumeur de grade histologique II, et un cancer du sein de stade TNM II. On retrouvait aussi un nombre plus élevé de tumeurs de moins de 2 cm et la plupart du temps aucun envahissement ganglionnaire comparativement aux patientes ayant une faible expression.

En regroupant les résultats par sous-type moléculaire de cancer du sein, on observe que les patientes ayant une expression positive des récepteurs ER/PR avaient une forte expression nucléaire du RCB2. Alors que les patientes ayant un statut HER2 positif avaient une forte expression du RCB1 et RCB2. Tandis que les patientes ayant un sous-type moléculaire triple négatif présentaient une faible expression du RCB1 et RCB2 (tableau 6).

Tableau 6: Sous-type moléculaire du cancer du sein et l'expression du RCB1 et du RCB2

Sous-types	RCB1 (n=489)		RCB2 cytoplasmique (n=475)		RCB2 nucléaire (n=475)	
	Faible* (n=258)	Forte* (n=254)	Faible* (n=253)	Forte* (n=264)	Faible* (n=253)	Forte* (n=269)
Statut ER/PR (oui)	191 (39,0%)	198 (40,5%)	167 (35,2%)	209 (44,0%)	157 (33,1%)	219 (46,1%)
Statut HER2 (oui)	20 (4,1%)	44 (9,0%)	20 (4,2%)	42 (8,8%)	26 (5,5%)	36 (7,6%)
Triple négatif (oui)	24 (4,9%)	12 (2,5%)	24 (5,1%)	13 (2,7%)	23 (4,8%)	14 (2,9%)

RCB1 : récepteurs cannabinoïdes 1; RCB2 : récepteurs cannabinoïdes 2; n= nombre; ER : récepteur à l'œstrogène; PR : récepteur à la progestérone; HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain;*Dichotomisé à partir de la médiane;

3.2 Résultats — objectif 2

Pour répondre au deuxième objectif que nous avons décrit au début de notre projet, nous avons examiné la corrélation entre les facteurs pronostiques connus du cancer du sein et l'expression protéique des RCB1 et RCB2. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Nous avons observé une faible corrélation positive entre l'envahissement ganglionnaire ($r_s=0,107$, $p=0,0194$) et le statut HER2 ($r_s=0,165$, $p=0,0003$) pour le RCB1. Une faible corrélation positive pour le type histologique ($r_s=0,147$, $p=0,0014$) et le statut ER/PR ($r_s=0,173$, $p=0,0002$, $r_s=0,121$, $p=0,0087$, respectivement) pour le RCB2 nucléaire. Nous avons aussi observé une faible corrélation inverse pour le grade tumoral ($r_s=-0,170$, $p=0,0002$). Tandis que nous n'avons observé aucune corrélation pour le RCB2 cytoplasmique.

Tableau 7: Corrélation entre l'expression du RCB1 et du RCB2 et les facteurs pronostiques du cancer du sein

	RCB1 (n=489)			RCB2 cytoplasmique (n=475)			RCB2 nucléaire (n=475)		
	Brut	Partiellement ajusté*	Ajusté§	Brut	Partiellement ajusté*	Ajusté§	Brut	Partiellement ajusté*	Ajusté§
Type histologique									
<i>r_s</i>	-0,019	0,004	0,006	-0,022	-0,004	-0,002	0,144	0,148	0,147
<i>valeur-p</i>	0,8451	0,9316	0,9045	0,6399	0,9301	0,9602	0,0016	0,0013	0,0014
Taille de la tumeur									
<i>r_s</i>	0,017	0,025	0,011	0,030	0,046	0,032	0,013	0,023	0,030
<i>valeur-p</i>	0,7148	0,5795	0,8074	0,5158	0,3207	0,4843	0,7721	0,6163	0,5163
Envahissement ganglionnaire									
<i>r_s</i>	0,116	0,110	0,107	0,072	0,063	0,060	0,060	0,063	0,064
<i>valeur-p</i>	0,0103	0,0155	0,0194	0,1180	0,1767	0,1978	0,2158	0,1770	0,1676
Grade tumoral									
<i>r_s</i>	0,003	-0,006	-0,014	0,052	0,043	0,036	-0,170	-0,171	-0,170
<i>valeur-p</i>	0,9451	0,9008	0,7632	0,2572	0,3577	0,4420	0,0002	0,0002	0,0002
Stade TNM									
<i>r_s</i>	0,073	0,077	0,067	0,050	0,055	0,046	0,020	0,025	0,030
<i>valeur-p</i>	0,1083	0,0898	0,1444	0,2812	0,2310	0,3242	0,6603	0,5929	0,5227
Statut ER									
<i>r_s</i>	0,028	0,021	0,022	0,096	0,089	0,090	0,172	0,173	0,173
<i>valeur-p</i>	0,5448	0,6405	0,6336	0,0358	0,0546	0,0528	0,0002	0,0002	0,0002
Statut PR									
<i>r_s</i>	-0,023	-0,031	-0,029	0,033	0,025	0,026	0,119	0,121	0,121
<i>valeur-p</i>	0,6081	0,5027	0,5287	0,4704	0,5963	0,5755	0,0096	0,0084	0,0087
Statut HER2									

<i>r_s</i>	0,176	0,168	0,165	0,086	0,080	0,076	0,031	0,032	0,034
<i>valeur-p</i>	<0,0001	0,0002	0,0003	0,0623	0,0848	0,0990	0,4989	0,4915	0,4695

RCB1 : récepteurs cannabinoïdes 1; RCB2 : récepteurs cannabinoïdes 2; n= nombre; *r_s* : Corrélation de Spearman ; * Ajusté pour l'âge au diagnostic, le statut ménopausique, déjà fumé, consommation d'alcool, historique personnel de cancer du sein et la présence de traitement de chimiothérapie antérieure; § Modèle partiellement ajusté, avec en plus ajustement pour l'indice de masse corporelle; En gras : les corrélations statistiquement significatives

3.3 Résultats — objectif 3

Les résultats de notre 3^e objectif sont présentés dans l'article scientifique inséré dans le chapitre 4.

Chapitre 4 < Article >

L'article présenté dans ce chapitre sera soumis à la revue « Journal of Personalized Medicine – Special Issue Personalized Approaches for the Prevention and Treatment of Breast Cancer » en juin 2021.

4.1 Titre et résumé en français

Titre. Association entre l'expression tumorale des RCB1 et RCB2 avec les facteurs pronostiques et à la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein.

Introduction. Les RCB1 et RCB2 pourraient être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer du sein. L'objectif est de mesurer l'expression des RCB dans les tumeurs mammaires et leur association avec les facteurs pronostiques et la survie au cancer du sein.

Méthodes. Le niveau d'expression des RCB a été évalué par immunohistochimie dans une cohorte de 522 patientes atteintes d'un cancer du sein invasif entre 2010 et 2012 au Centre des maladies du sein de Québec à l'hôpital Saint-Sacrement à Québec, au Canada. Des corrélations partielles de Spearman et des modèles de régression multivariés de Cox ont été utilisés.

Résultats. L'expression du RCB1 était positivement corrélée à l'envahissement ganglionnaire ($rs=0,110$; $p=0,0155$) et au statut HER2 ($rs=0,168$; $p=0,0002$). L'expression nucléaire du RCB2 était positivement corrélée aux récepteurs de l'œstrogène ($rs=0,173$; $p=0,0002$) et des récepteurs à la progestérone ($rs=0,121$; $p=0,0084$) et négativement corrélée au grade tumoral ($rs=-0,171$; $p=0,0002$). Une expression cytoplasmique élevée du RCB2 était associée à 13% de plus de récurrences locorégionales et distantes ($HR=1,13$ [$0,97-1,33$]), mais cette association n'était pas statistiquement significative.

Conclusion. Bien que les événements survenus au cours du suivi puissent avoir limité la détection d'associations significatives, davantage d'exploration est nécessaire pour approfondir le sujet.

4.2 Title and authors

Title. Association of breast tumour expression of CBR1 and CBR2 with prognostic factors and survival in breast cancer patients

Authors. Morin-Buote Jessica ^{1,2,3}, Ennour-Idrissi Kaoutar ^{1,2,3,4}, Poirier Éric ^{2,6}, Julie Lemieux ^{2,6,7}, Furrer Daniela ², Burguin Anna ^{2,3,5}, Durocher Francine ^{2,3,5}, Diorio Caroline^{1,2,3,6}

1 Department of Social and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada

2 CHU de Québec-Université Laval Research Center, Quebec, QC, Canada

3 CHU de Québec-Université Laval Cancer Research Center, Quebec, QC, Canada

4 Department of Molecular Biology, Medical Chemistry and Pathology, Cancer Research Center, Laval University, Quebec, Qc, Canada

5 Department of Surgery, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada

6 Centre des maladies du sein, Cancer Research Center, Laval University, Quebec, QC, Canada

7 Department of Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, QC, Canada

8 Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec, QC, Canada

Corresponding author: Caroline Diorio, Axe Oncologie, Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval, 1050 chemin Sainte-Foy, Quebec city, QC G1S 4L8, Canada; email : caroline.diorio@crchudequebec.ulaval.ca; Tel 1 418-682-7511 #84726.

4.3 Abstract and keywords

Introduction. Cannabinoid receptors (CBR) are potential therapeutic targets for breast cancer. However, the role of CBR in breast cancer survival remains poorly understood.

Methods. Data from a prospective cohort of 522 women diagnosed with invasive breast cancer between 2010 and 2012 were analysed. Clinical and pathological features were retrieved from electronic medical records for all women. CBR expression was measured by immunohistochemistry. Adjusted partial Spearman correlations and multivariate Cox models were used to estimate associations with breast cancer prognostic factors and survival respectively.

Results. The median follow-up was 92.0 months (range 7.0-114.0). CBR expression was heterogenous in tumours. Cytoplasmic expression of CBR1 was positively correlated with lymph node invasion ($r_s=0.110$; $p=0.0155$) and positive status of the human epidermal growth factor receptor 2 ($r_s=0.168$; $p=0.0002$) while nuclear CBR2 was negatively correlated with grade ($r_s=-0.171$; $p=0.0002$) and positively correlated with estrogen receptor and progesterone receptor positive status ($r_s=0.173$; $p=0.0002$ and $r_s=0.121$; $p=0.0084$ respectively). High cytoplasmic expression of CBR2 was associated with 13% higher locoregional and distant recurrences (HR=1.13 [0.97-1.33]), though this association did not reach statistical significance.

Conclusion. Although the few events occurring during the follow-up may have limited the detection of significant associations, these results indicate that CBR expression in breast cancer deserves further investigation.

Keywords. Breast cancer, cohort study, cannabinoid receptor, immunohistochemistry, survival, prognostic factors

4.4 Introduction

Cannabinoids receptors (CBR) have been suggested as potential therapeutic targets for breast cancer (1-6). These receptors are part of the family of membrane receptor G protein-coupled receptor and have been shown to be involved in signaling pathways regulating proliferation, cancer cell survival, angiogenesis as well as tumour invasion (7, 8). So far, two subtypes of CBR have been identified: CBR1, which is found in the brain and in certain nerve endings but also in reproductive organs, vascular endothelium, and eyes (9) and CBR2, which is expressed mainly in the immune system, membranes of immune and tumour cells, spleen, bones, tonsils, and thyroid gland (4, 10, 11).

Previous studies have shown that CBR1 and CBR2 are involved in reducing the progression of tumours in animal models, and have antitumoral action in vivo (12-15) mainly by inducing apoptosis and cell cycle arrest (2). Indeed, high CBR1 and/or CBR2 expression has been shown to be associated with survival in prostate cancer (16-18) and colorectal cancer (19, 20). However, divergent results regarding the direction of these associations were reported (21, 22). These differences might be explained by methodological biases (selection bias, lack of clinical and pathological information, small sample size). Regarding breast cancer, evidence suggests that CBR alter the migration and invasion of the estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) - positive breast cancer cells in culture (23). Likewise, inhibition of cell proliferation has been observed in other breast cancer cell lines (4, 24-26). Thus far, a single epidemiological study has evaluated the relationship between CBR2 expression and breast cancer survival and reported that high CBR2 expression was associated with decreased overall survival, increased local recurrence and development of distant metastases (27). However, possible confounding factors were not considered in the study which could have led to biased results and CBR1 has not been investigated.

Therefore, in the present study we aim to evaluate CBR1 and CBR2 expression in breast tumours and their association with breast cancer prognostic factors and survival.

4.5 Materials and Methods

4.5.1 Study design and population

A longitudinal study was carried out at the Centre des maladies du sein (CMS) of Quebec City, Canada, a reference center for breast diseases. Women diagnosed with invasive breast cancers were recruited prospectively between December 1st, 2010, and April 30th, 2012. Detailed information on recruitment has been described elsewhere (28). Women were included if they 1) had a mastectomy or a segmental mastectomy 2) agreed to donate tissue specimens to the biobank of the CMS; 3) had their clinical follow-up at the CMS. Follow-up data were collected until December 2020. The end date of the study period was defined as the date of last contact (the last CMS appointment, last phone communication documented, or last clinical reports). The present study was approved by research ethics of the CHU de Québec—Laval University Research Center (DR-002-938) and all patients gave their written consent.

4.5.2 Data collection

All patient characteristics were collected at diagnosis and included age at diagnosis (years), parity (yes vs. no), first-degree family history of breast cancer (yes vs. no), personal history of breast cancer (yes vs. no), smoking status (former or current smokers vs. never smoked), alcohol consumption (yes vs. no), menopausal status (premenopausal vs. postmenopausal), and body mass index (BMI, kg/m², calculated from self-reported weight and height). All clinical and pathological characteristics were collected by trained nurses from electronic patient records (EPR) and included : tumour size (mm), lymph node involvement (number), grade (1 vs. 2 vs. 3), stage (I vs. II vs. III vs. IV), ER/PR receptor status (negative vs. positive), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status (negative vs. positive), surgery (mastectomy vs. partial mastectomy), endocrine therapy (yes vs. no), chemotherapy (yes vs. no), radiotherapy (yes vs. no), and follow-up events (occurring at least 1 year after diagnosis) - locoregional recurrence (yes vs. no), distant recurrence (yes vs. no) , second invasive cancer (yes vs. no), or death (yes or no). Locoregional and distant recurrence was defined as a recurrence symptom confirmed by clinical examination, a positive cytology or biopsy or a positive medical imaging result (29).

4.5.3 Assessment of CBR expression

All mastectomy specimens were collected during surgery, fixed with 10% buffered formalin within 30 minutes, then embedded in paraffin and cut into 4 µm tissue sections stained with hematoxylin and eosin (H&E). Invasive breast cancers were confirmed by histological examination by senior pathologists and recorded in pathology reports. For each woman, a representative tumour block was selected by a pathologist blinded to clinical data. Subsequently, four cores (0.6 mm in diameter each) of tumour tissue were extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks and used to build a tissue micro array (TMA). The reliability of using TMAs in histological analysis has already been demonstrated in breast cancer (30).

CBR1 and CBR2 expression were evaluated by immunohistochemistry (IHC). Deparaffinization and rehydration were respectively performed in toluene and ethanol baths according to standard protocols. Tris-EGTA buffer (pH9) was used for antigen retrieval (30 min, 95.6 °C). Endogenous peroxidase and non-specific antibody binding were blocked respectively by 0.3% hydrogen peroxide (H₂O₂) (diluted in methanol) and Super Block (IDetect). Tissues were then incubated with the primary antibody for CBR1 (CB1-Rb-Af380 [RRID: AB_2571591] from Frontier Institute) or CBR2 (CB2 receptor polyclonal

antibody [101550] from Cayman Chemical) overnight at 4° C in a wet chamber, and then with the secondary antibody (Advance HRP Link, Dako) during 30 min. Tissues were treated with 3, 3'-diaminobenzidine and counterstained with Mayer's hematoxylin. Breast cancer cell lines were present on our cohort blocks (MCF-7, SK-BR3, MDA-MB-175 and MDA-MB-231), and control blocks known to express positive and negative control tissues and cell lines for CBR1 and CBR2 were also used before proceeding the IHC. Stained slides were scanned with the NanoZoomer 2.0-HT scanner (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA).

Samples were interpreted if the number of tumour cells was greater than 20 cancer cells on each core. Staining was scored semi-quantitatively according to intensity and proportion. Staining intensity was visually evaluated and scored either 0 (absent), 1 (weak staining), 2 (moderate staining) or 3 (strong staining). Proportion of stained cells were scored 0 (<1%), 1 (1–24%), 2 (25–50%), 3 (51–75%), 4 (>75%) (31). A composite score (CS) was calculated by multiplying the intensity and percentage scores for each core. For each patient, the mean CS was generated from 1 to 4 cores judged interpretable. The CS was then dichotomized into low and high expression, using the median as the cut-off (32, 33). Immunostaining assessment was performed twice by two independent readers for 10% randomly selected patients, and substantial agreements were observed (kappas = 0.72, 0.80 and 0.72 for CBR1, CBR2 nuclear and CBR2 cytoplasmic respectively). Figures 1 and 2 show representative immunostaining of tumour cores.

5.4.4 Survival outcome

Overall survival (OS) was defined as the time between breast cancer diagnosis and death from any cause. Recurrence-free survival (RFS) was defined as the time between breast cancer diagnosis and first ipsilateral locoregional recurrence, or first distant recurrence whichever occurred first. Event-free survival (EFS) was defined as the time between breast cancer diagnosis to first ipsilateral locoregional recurrence, or first distant recurrence, or contralateral invasive breast cancer, or the development of any second invasive cancer, or death from any cause, whichever occurred first.

4.5.5 Statistical analyses

Means with standard deviations and medians are reported for continuous data. Categorical variables are reported as frequencies and percentages. CBR expression was treated as a continuous variable for all analyses. Adjustment variables were selected *a priori* based on literature review. The decision

to include or not each factor as an adjustment variable for a specific analysis was based on the disjunctive causes criterion (34).

Correlations between breast cancer prognostic factors and CBR expression were estimated using Spearman rank-based correlations adjusted for age at diagnosis (years), menopausal status (premenopausal vs. postmenopausal), smoking status (former or current smokers vs. never smoked), alcohol consumption (yes vs. no), personal history of breast cancer (yes vs. no), and chemotherapy prior to surgery (yes vs. no). Further adjustment for BMI (kg/m²) was considered in a sensitivity analysis.

Univariate and multivariate Cox proportional-hazard models were used to estimate hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs) for OS, RFS, and EFS. Participants who did not experience any event and were alive at the date of last contact were censored at time of last contact. The proportional hazards assumption was assessed for each covariate with Schoenfeld residual plots. Interaction terms with time were added for variables that did not meet this hypothesis. Partially adjusted models included age at diagnosis (years), menopausal status (premenopausal vs. postmenopausal), first degree family history of breast cancer (yes vs. no), smoking status (former or current smokers vs. never smoked), alcohol consumption (yes vs. no), personal history of breast cancer (yes vs. no), chemotherapy prior to surgery (yes vs. no) and endocrine therapy prior to surgery (yes vs. no). Fully adjusted models were further adjusted for years from diagnosis (years), trastuzumab treatment (yes vs. no), endocrine therapy (yes vs. no), radiotherapy (yes vs. no), and type of surgery (mastectomy vs. partial mastectomy). All models were further adjusted for prognostic factors - tumour size (mm), lymph node involvement (number), grade (1 vs. 2 vs. 3), stage (I vs. II vs. III vs. IV), ER/PR receptor status (negative vs. positive), and HER2 status (negative vs. positive) - in sensitivity analyses. These factors are potentially intermediate factors between CBR expression and survival.

All statistical tests were two-sided with significance p-value of 5%. Analyses were conducted using SAS 9.4 software (SAS Institute Inc.).

4.6. Results

4.6.1. Study population

Of the 522 women meeting the inclusion criteria, 489 (93.7%) and 475 (91.0%) had interpretable CBR1 and CBR2 samples respectively. The median time between diagnosis and surgery was 42 days and

the median follow-up time was 92.0 months (mean 84.7 ± 20.7 , range 7.0-114.0). The median age at diagnosis was 61.0 years (mean 61.2 ± 12.6 years, range 24.0-92.0). Most patients were postmenopausal and about half of them had a family history of breast cancer. Most of them had an invasive ductal carcinoma stage I or II. During the follow-up period, 74 (14.2%) women developed a recurrence and 86 (16.5%) deaths occurred. Characteristics of the study population are described in Table 1.

CBR1 immunoreactivity was observed in the cytoplasm and was heterogeneous within and between evaluated tumours. High expression of CBR1 was observed in 254 (51.9%) patients. Women with high CBR1 tumour expressions were slightly more likely to have positive lymph nodes, stage III and IV disease, HER2 positive status, and to have received adjuvant chemotherapy, hormone therapy and trastuzumab therapy (Table 1).

CBR2 immunoreactivity was observed in the cytoplasm and in the nucleus and was heterogeneous within and between evaluated tumours. High CBR2 expression in the cytoplasm was observed in 264 (55.6%) patients. These patients were slightly more likely to have positive lymph nodes, stage IV disease, positive HER2 status and to have received adjuvant chemotherapy and trastuzumab therapy (Table 1). High CBR2 expression in the nucleus was observed in 269 (56.6%) patients. These patients were less likely to have grade 3 tumours, negative ER status and more likely to have received adjuvant hormone therapy (Table 1).

4.6.2 CBR expression and breast cancer prognostic factors

CBR1 expression was positively correlated with positive lymph nodes ($r_s=0.107$, $p=0.0194$) and HER2 positive status ($r_s=0.165$, $p=0.0003$). No correlation was observed between CBR1 and histological type, tumour size, grade, disease stage, and ER/PR status.

No correlation was observed between CBR2 cytoplasmic expression and histological type, tumour size, positive lymph nodes, grade, disease stage, ER/PR status and HER2 status.

CBR2 nuclear expression was positively correlated with histological type ($r_s=0.147$, $p=0.0014$) and ER/PR status ($r_s=0.173$, $p=0.0002$, $r_s=0.121$, $p=0.0087$) and negatively correlated with tumour grade ($r_s=-0.170$, $p=0.0002$). No correlation was observed between CBR2 nuclear expression and tumour size, positive lymph nodes, disease stage and HER2 status (Table 2).

4.6.3 CBR expression and breast cancer survival

Associations of CBR expression and survival are shown in Table 3.

Patients with high CBR1 expression had a median overall survival of 93.0 months (mean 86.3±19.6, range 11.0-114.0). No association was observed between CBR1 expression and survival in our cohort.

Patients with high CBR2 cytoplasmic expression had a median overall survival of 92.0 months (mean 84.4±21.2, range 7.0-114.0). Each one unit increase of cytoplasmic expression of CBR2 was associated with 13 % higher locoregional and distant recurrences, though this association did not reach statistical significance (HR=1.13 [0.97-1.33]).

Patients with high CBR2 nuclear expression had a median overall survival of 92.0 months (mean 84.7±20.9, range 7.0-114.0). No association was observed between nuclear expression of CBR2 and survival outcomes.

Subsequent sensitivity analyses with adjustment for prognostic factors yielded similar results (supplementary Table S1).

4.7 Discussion

In the present study, we aimed to evaluate CBR1 and CBR2 expression in breast tumours and its association with breast cancer prognostic factors and survival. CBR1 and CBR2 expression in breast tumours were detectable by IHC. CBR1 had a cytoplasmic expression whereas CBR2 had both a cytoplasmic and nuclear expression. While CBR1 expression was positively correlated with lymph node metastases and HER2 status, nuclear CBR2 expression was positively correlated with histologic type, ER/PR positive status and negatively correlated with tumour grade. Although not statistically significant, cytoplasmic CBR2 expression was associated with higher locoregional and distant recurrences.

Our results indicate that CBR1 and CBR2 may have different involvement in breast cancer progression. In fact, CBR1 expression was correlated with poor prognostic markers while nuclear expression of CBR2 was correlated with good prognostic markers. In addition, the cellular compartment harbouring CBR expression may have a different functional significance, as we observed that nuclear expression of CBR2 had an opposite direction of association with prognosis than cytoplasmic expression of CBR2. In comparison, other studies observed in prostate cancer that CBR1 expression was positively correlated with the epidermal growth factor receptor (EGFR) ($r_s = 0.316$, $p < 0.001$) (18). Other

similarities have been observed where CBR1 expression was positively correlated with Gleason score ($r_s = 0.21$, $p < 0.001$), tumour stage ($r_s = 0.11$, $p < 0.05$), percentage of the specimen that contains tumours ($r_s = 0.17$, $p = 0.01$) and EGFR ($r_s = 0.18$, $p = 0.01$) (16). Thus, making CBR1 an indicator of poor prognosis. While no previous study has examined the expression of CBR1 in breast cancer, the single previous study that evaluated CBR2 expression in breast cancer reported that high CBR2 expression in HER2 positive tumours was associated with poor prognosis (27). However, in this study, only staining intensity was recorded (proportion of positive cells was not considered) and no distinction between nuclear or cytoplasmic expression was reported. Furthermore, the results from this study might have suffered from confounding biases (no adjustment for any confounders) and selection biases (analyses restricted to HER2 positive breast cancers). In fact, they reported that the expression pattern of CBR2 varies by breast cancer subtypes and that the majority of positive tumours are HER2 positive. This indicates that CBR2 might be linked to HER2 receptor expression. Nevertheless, our observation of higher recurrences in tumours with high cytoplasmic expression of CBR2 is consistent with their results.

Our study has several strengths. Our large sample size obtained from consecutive inclusion of eligible patients is representative of breast cancer patients, as reflected by the distribution of patients characteristics, which reduced the risk of selection bias. Of note, our study population includes all subtypes of breast cancer, in the same proportion as in the target population of breast cancer patients. Furthermore, we used prospectively collected data from a reliable clinical database, such as more than 90% of our eligible population was included in the analyses, also preventing from selection bias due to missing values. We used data collected from medical records by trained nurses and measures of CBR expression evaluated twice by two independent readers blinded to patients characteristics and outcomes, thus preventing from the risk of information bias. Finally, we used a robust method for selecting and adjusting for potential confounders to minimize confounding bias while preventing from collider bias and adjustment for potential intermediate factors. All of which ensure the internal validity of our analyses.

The main limitation to our study was the few events that occurred during the follow-up, despite the large sample size and the long follow-up period. Indeed, the proportion of patients with locoregional recurrence, distant recurrence and death may have limited our statistical power to detect genuine associations. We did not adjust for key variables such as economic status and cannabis consumption

as these variables were not collected and thus were not available in our database. In fact, economic status has been identified as a predictor of survival in breast cancer patients (35-37) and has been shown to be associated with cannabis consumption (38, 39). However, regular cannabis consumption rates in Canada are very low (40) and the link between cannabis consumption and CBR expression is yet to be established. Although these limitations should be addressed in future studies, our findings make an important contribution to the emerging body of knowledge on the role of CBR in breast cancer survival.

4.8 Conclusions

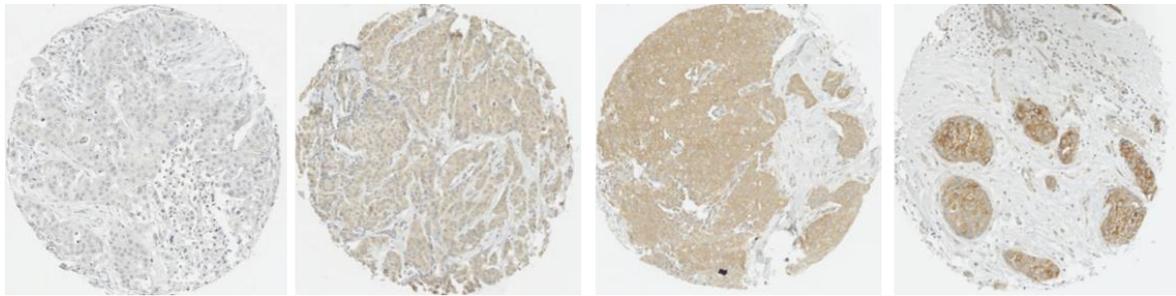
This is the first study to evaluate both CBR1 and CBR2 expression in association with breast cancer prognostic factors and survival. We evaluated CBR expression in breast cancer tissue. CBR1 cytoplasmic expression seemed to be associated with poor prognostic factors while CBR2 nuclear expression seemed to be associated with better prognostic factors. The cytoplasmic expression of CBR2 may be involved in the occurrence of locoregional and distant recurrences. Although the few events occurring during the follow-up may have limited the detection of significant associations, these results indicate that CBR expression in breast cancer needs further investigation.

4.9 Référence

1. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):389-462.
2. Blazquez C, Casanova ML, Planas A, Gomez Del Pulgar T, Villanueva C, Fernandez-Acenero MJ, et al. Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J.* 2003;17(3):529-31.
3. Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol.* 2008;20 Suppl 1:10-4.
4. Caffarel MM, Sarrio D, Palacios J, Guzman M, Sanchez C. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res.* 2006;66(13):6615-21.
5. Moreno E, Cavic M, Krivokuca A, Casadó V, Canela E. The Endocannabinoid System as a Target in Cancer Diseases: Are We There Yet? *Front Pharmacol.* 2019;10:339.
6. Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Anticancer mechanisms of cannabinoids. *Current Oncology.* 2016;23:S23-S32.
7. Guzman M, Sanchez C, Galve-Roperh I. Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol Ther.* 2002;95(2):175-84.
8. Velasco G, Galve-Roperh I, Sanchez C, Blazquez C, Guzman M. Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas? *Neuropharmacology.* 2004;47(3):315-23.
9. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346(6284):561-4.
10. Alexander A, Smith PF, Rosengren RJ. Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Lett.* 2009;285(1):6-12.
11. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993;365(6441):61-5.
12. Munson AE, Harris LS, Friedman MA. Antineoplastic activity of cannabinoids. *J Natl Cancer Inst.* 1975;55(3):597-602.
13. Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M. Antitumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med.* 2000;6(3):313-9.
14. Sánchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, et al. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res.* 2001;61(15):5784-9.
15. Bifulco M, Laezza C, Portella G, Vitale M, Orlando P, De Petrocellis L, et al. Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene-dependent tumor growth. *FASEB J.* 2001;15(14):2745-7.
16. Thors L, Bergh A, Persson E, Hammarsten P, Stattin P, Egevad L, et al. Fatty acid amide hydrolase in prostate cancer: association with disease severity and outcome, CB1 receptor expression and regulation by IL-4. *PLoS One.* 2010;5(8):e12275.
17. Chung SC, Hammarsten P, Josefsson A, Stattin P, Granfors T, Egevad L, et al. A high cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer.* 2009;45(1):174-82.
18. Fowler CJ, Hammarsten P, Bergh A. Tumour Cannabinoid CB(1) receptor and phosphorylated epidermal growth factor receptor expression are additive prognostic markers for prostate cancer. *PLoS One.* 2010;5(12):e15205.

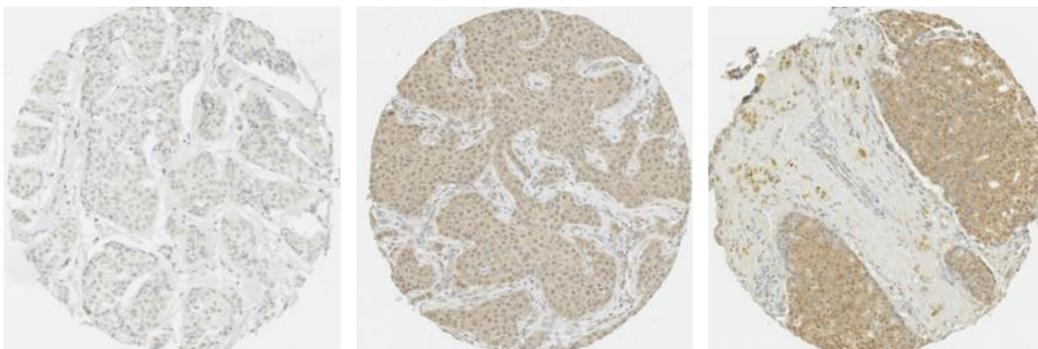
19. Martinez-Martinez E, Gomez I, Martin P, Sanchez A, Roman L, Tejerina E, et al. Cannabinoids receptor type 2, CB2, expression correlates with human colon cancer progression and predicts patient survival. *Oncoscience*. 2015;2(2):131-41.
20. Jung CK, Kang WK, Park JM, Ahn HJ, Kim SW, Oh ST, et al. Expression of the cannabinoid type 1 receptor and prognosis following surgery in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2013;5(3):870-6.
21. Gustafsson SB, Palmqvist R, Henriksson ML, Dahlin AM, Edin S, Jacobsson SO, et al. High tumour cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity negatively impacts disease-specific survival in stage II microsatellite stable colorectal cancer. *PLoS One*. 2011;6(8):e23003.
22. Zeng C, Chen Y. HTR1D, TIMP1, SERPINE1, MMP3 and CNR2 affect the survival of patients with colon adenocarcinoma. *Oncol Lett*. 2019;18(3):2448-54.
23. Caffarel MM, Andradas C, Perez-Gomez E, Guzman M, Sanchez C. Cannabinoids: a new hope for breast cancer therapy? *Cancer Treat Rev*. 2012;38(7):911-8.
24. Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(7):1161-72.
25. Qamri Z, Preet A, Nasser MW, Bass CE, Leone G, Barsky SH, et al. Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(11):3117-29.
26. Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, et al. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318(3):1375-87.
27. Perez-Gomez E, Andradas C, Blasco-Benito S, Caffarel MM, Garcia-Taboada E, Villa-Morales M, et al. Role of cannabinoid receptor CB2 in HER2 pro-oncogenic signaling in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(6):djv077.
28. Furrer D, Jacob S, Caron C, Sanschagrín F, Provencher L, Diorio C. Tissue Microarray Is a Reliable Tool for the Evaluation of HER2 Amplification in Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2016;36(9):4661-6.
29. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE, Jr., et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol*. 2014;32(33):3744-52.
30. Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond MEH, Allred DC, Valenstein PN. Recommendations for Validating Estrogen and Progesterone Receptor Immunohistochemistry Assays. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(6):930-5.
31. American Joint Committee on Cancer. Breast 8th ed. New-York, NY: Springer: 2018.
32. Wang C, Li Y, Chen H, Huang K, Liu X, Qiu M, et al. CYP4X1 Inhibition by Flavonoid CH625 Normalizes Glioma Vasculature through Reprogramming TAMs via CB2 and EGFR-STAT3 Axis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018;365(1):72-83.
33. Theocharis S, Giaginis C, Alexandrou P, Rodriguez J, Tasoulas J, Danas E, et al. Evaluation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients' survival. *Tumour Biol*. 2016;37(3):3647-56.
34. VanderWeele TJ, Shpitser I. A new criterion for confounder selection. *Biometrics*. 2011;67(4):1406-13.
35. Lagerlund M, Bellocco R, Karlsson P, Tejler G, Lambe M. Socio-economic factors and breast cancer survival--a population-based cohort study (Sweden). *Cancer Causes Control*. 2005;16(4):419-30.

36. Herndon JE, 2nd, Kornblith AB, Holland JC, Paskett ED. Effect of socioeconomic status as measured by education level on survival in breast cancer clinical trials. *Psychooncology*. 2013;22(2):315-23.
37. Ji P, Gong Y, Jiang CC, Hu X, Di GH, Shao ZM. Association between socioeconomic factors at diagnosis and survival in breast cancer: A population-based study. *Cancer Med*. 2020;9(5):1922-36.
38. Patrick ME, Wightman P, Schoeni RF, Schulenberg JE. Socioeconomic status and substance use among young adults: a comparison across constructs and drugs. *J Stud Alcohol Drugs*. 2012;73(5):772-82.
39. Chan GCK, Leung J, Quinn C, Weier M, Hall W. Socio-economic differentials in cannabis use trends in Australia. *Addiction*. 2018;113(3):454-61.
40. S. HDaL-C. Association between the frequency of cannabis use and selected social indicators. *Insights on Canadian Society*. May 2018 Statistics Canada Catalogue no(75-006-X).



(a) (b) (c) (d)
Figure 1: Representative immunostaining of tumour cores for CBR1

Cannabinoid receptor 1 expression intensity scores; (a) 0 (none); (b) 1 (weak); (c) 2 (moderate); (d) 3 (strong). Scale: 10X



(a) (b) (c)
Figure 2: Representative immunostaining of tumour cores for CBR2

Cannabinoid receptor 2 expression intensity scores; (a) 0 (none); (b) 1 (weak); (c) 2 (moderate). Scale: 10X

Table 1: Patients characteristics

Characteristics*	All (n=522)	CBR1 (n=489)		CBR2 in cytoplasm (n=475)		CBR2 in nuclear (n=475)	
		Low* (n= 235)	High* (n=254)	Low* (n= 211)	High* (n=264)	Low* (n=206)	High* (n=269)
Age (years)							
Mean ± SD	61.2 ± 12.6	62.3 ± 12.6	60.4 ± 12.99	62.9 ± 12.6	60.0 ± 12.8	61.9 ± 13.3	60.8 ± 12.3
Median [range]	61.0 [24.0-92.0]	63.0 [32.0-91.0]	61.0 [24.0-92.0]	64.0 [24.0-91.0]	61.0 [25.0-92.0]	63.0 [24.0-91.0]	61.0 [25.0-92.0]
Postmenopausal	399 (76.4%)	186 (79.2%)	189 (74.4%)	168 (79.6%)	194 (73.5%)	155 (75.2%)	207 (77.0%)
Familial history of breast cancer (yes)	245 (46.9%)	110 (46.8%)	123 (48.4%)	97 (45.9%)	125 (47.4%)	96 (46.6%)	126 (46.8%)
Ever smokers	254 (48.7%)	119 (50.6%)	118 (46.5%)	112 (53.1%)	120 (45.5%)	95 (46.1%)	137 (50.9%)
Alcohol consumption (yes)	337 (64.6%)	147 (62.6%)	168 (66.1%)	128 (60.7%)	179 (67.8%)	131 (63.6%)	176 (65.4%)
Body mass index (kg/m²)							
Mean ± SD	26.3 ± 5.2	25.8 ± 5.2	26.6 ± 5.3	26.1 ± 5.0	26.4 ± 5.5	26.3 ± 5.2	26.2 ± 5.3
Median [range]	25.5 [15.2-45.9]	24.6 [16.3-44.1]	25.6 [15.2-45.9]	25.0 [17.7-44.1]	25.5 [15.2-45.9]	25.6 [16.3-44.6]	25.3 [15.2-45.9]
Personal history of breast cancer (yes)	63 (12.1%)	25 (10.6%)	32 (12.6%)	26 (12.3%)	29 (11.0%)	23 (11.2%)	32 (11.9%)
Histologic type							
Ductal, invasive	451 (86.4%)	204 (86.8%)	220 (86.6%)	180 (85.3%)	235 (89.0%)	189 (91.8%)	226 (84.0%)
Lobular, invasive	56 (10.7%)	27 (11.5%)	24 (9.5%)	24 (11.4%)	23 (8.7%)	12 (5.8%)	35 (13.0%)
Mixed ductal and lobular, invasive	15 (2.9%)	4 (1.7%)	10 (3.9%)	7 (3.3%)	6 (2.3%)	5 (2.4%)	8 (3.0%)
Tumour grade							
1	86 (16.5%)	39 (16.6%)	38 (15.0%)	30 (14.2%)	42 (18.9%)	23 (11.2%)	49 (18.2%)
2	258 (49.4%)	112 (47.7%)	130 (51.2%)	119 (56.4%)	116 (43.9%)	90 (43.7%)	145 (53.9%)
3	178 (34.1%)	84 (35.7%)	86 (33.9%)	62 (29.4%)	106 (40.2%)	93 (45.2%)	75 (27.9%)
Tumour size							
≤2 cm	293 (56.1%)	130 (55.3%)	140 (55.1%)	114 (54.0%)	148 (56.1%)	110 (53.4%)	152 (56.5%)
>2 and ≤5 cm	209 (40.0%)	101 (43.0%)	99 (39.0%)	89 (42.2%)	106 (40.2%)	93 (45.2%)	102 (37.9%)
>5 cm	20 (3.8%)	4 (1.7%)	15 (5.9%)	8 (3.8%)	10 (3.8%)	3 (1.5%)	15 (5.6%)
Positive lymph nodes							
0	312 (59.8%)	153 (65.1%)	137 (53.9%)	135 (64.0%)	146 (55.3%)	125 (60.7%)	156 (58.0%)
1-3	146 (28.0%)	60 (25.5%)	78 (30.7%)	55 (26.1%)	80 (30.3%)	59 (28.6%)	76 (28.3%)
4-9	42 (8.0%)	17 (7.2%)	22 (8.7%)	14 (6.6%)	26 (9.8%)	18 (8.7%)	22 (8.2%)
≥10	22 (4.2%)	5 (2.1%)	17 (6.7%)	7 (3.3%)	12 (4.6%)	4 (1.9%)	15 (5.6%)
Disease stage							
I	203 (38.9%)	96 (40.9%)	91 (35.8%)	84 (39.8%)	97 (36.7%)	76 (36.9%)	105 (39.0%)
II	241 (46.2%)	110 (46.8%)	119 (46.9%)	101 (47.9%)	122 (46.2%)	104 (50.5%)	119 (44.2%)
III	71 (13.6%)	28 (11.9%)	38 (18.0%)	25 (11.9%)	39 (14.8%)	24 (11.7%)	40 (14.9%)
IV	7 (1.3%)	1 (0.4%)	6 (2.4%)	1 (0.5%)	6 (2.3%)	2 (1.0%)	5 (1.9%)

ER status							
Negative	64 (12.3%)	29 (12.3%)	30 (11.8%)	35 (16.6%)	25 (9.5%)	37 (18.0%)	23 (8.6%)
Positive	458 (87.7%)	206 (87.7%)	224 (88.2%)	176 (83.4%)	239 (90.5%)	169 (82.0%)	246 (91.5%)
PR status							
Negative	108 (20.7%)	46 (19.6%)	52 (20.5%)	51 (24.1%)	47 (17.8%)	53 (25.7%)	45 (16.7%)
Positive	414 (79.3%)	189 (80.4%)	202 (79.5%)	160 (75.8%)	217 (82.2%)	153 (74.3%)	224 (83.3%)
HER2 status							
Negative	455 (87.2%)	215 (91.5%)	210 (82.7%)	191 (90.5%)	222 (84.1%)	180 (87.4%)	233 (86.6%)
Positive	67 (12.8%)	20 (8.5%)	44 (17.3%)	20 (9.5%)	42 (15.9%)	26 (12.6%)	36 (13.4%)
Surgery							
Partial	384 (73.6%)	173 (73.6%)	187 (73.6%)	156 (73.9%)	195 (73.9%)	154 (74.8%)	197 (73.2%)
Total	138 (26.4%)	62 (26.4%)	67 (26.4%)	55 (26.1%)	69 (26.1%)	52 (25.2%)	72 (26.8%)
Chemotherapy prior to surgery (yes)	6 (1.2%)	1 (0.4%)	2 (0.8%)	1 (0.5%)	2 (0.8%)	1 (0.5%)	2 (0.7%)
Hormone therapy prior to surgery (yes)	6 (1.2%)	3 (1.3%)	3 (1.2%)	4 (1.9%)	2 (0.8%)	1 (0.5%)	5 (1.9%)
Chemotherapy after surgery (yes)	263 (50.4%)	108 (46.0%)	138 (54.3%)	94 (44.6%)	146 (55.3%)	106 (51.5%)	134 (49.8%)
Radiotherapy after surgery (yes)	414 (79.3%)	184 (78.3%)	204 (80.3%)	164 (77.7%)	212 (80.3%)	163 (79.1%)	213 (79.2%)
Hormone therapy after surgery (yes)	433 (83.0%)	189 (80.4%)	217 (85.4%)	164 (77.7%)	229 (86.7%)	157 (76.2%)	236 (87.7%)
Trastuzumab after surgery (yes)	59 (11.3%)	20 (8.4%)	36 (14.2%)	15 (7.1%)	39 (14.8%)	23 (11.2%)	31 (11.5%)
Follow-up (months)							
Mean ± SD	84.7 ± 20.7	83.0 ± 21.7	86.3 ± 19.6	84.6 ± 20.8	84.4 ± 21.2	84.71 ± 21.2	84.7 ± 20.9
Median [range]	92.0 [7.0-114.0]	91.0 [7.0-112.0]	93.0 [11.0-114]	93.0 [7.0-112.0]	92.0 [7.0-114.0]	92.0 [14.0-112.0]	92.0 [7.0-114.0]
Survival outcomes							
Deaths	86 (16.5%)	41 (17.5%)	40 (15.8%)	39 (18.5%)	43 (16.3%)	42 (20.4%)	40 (14.9%)
Recurrences [§]	74 (14.2%)	31 (13.2%)	36 (14.2%)	24 (11.4%)	44 (16.7%)	31 (15.1%)	37 (13.8%)
Events [†]	143 (27.4%)	65 (27.7%)	69 (27.2%)	60 (28.4%)	74 (28.0%)	65 (31.6%)	69 (25.7%)

CBR1: cannabinoid receptor 1; CBR2: cannabinoid receptor 2; n= number; mean ± standard deviation; SD: standard deviation; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; †Dichotomized at the median; § Locoregional and distant recurrences; †deaths, recurrences, any second cancer

Table 2: Correlations between CBR1 and CBR2 expression and breast cancer prognostic factors

	CBR1 (n=489)			CBR2 in cytoplasm (n=475)			CBR2 in nuclear (n=475)		
	Unadjusted	Adjusted*	Fully adjusted [§]	Unadjusted	Adjusted*	Fully adjusted [§]	Unadjusted	Adjusted*	Fully adjusted [§]
Histologic type									
<i>r_s</i>	-0.009	0.004	0.006	-0.022	-0.004	-0.002	0.144	0.148	0.147
<i>p-value</i>	0.8451	0.9316	0.9045	0.6399	0.9301	0.9602	0.0016	0.0013	0.0014
Tumour size									
<i>r_s</i>	0.017	0.025	0.011	0.030	0.046	0.032	0.013	0.023	0.030
<i>p-value</i>	0.7148	0.5795	0.8074	0.5158	0.3207	0.4843	0.7721	0.6163	0.5163
Positive lymph nodes									
<i>r_s</i>	0.116	0.110	0.107	0.072	0.063	0.060	0.060	0.063	0.064
<i>p-value</i>	0.0103	0.0155	0.0194	0.1180	0.1767	0.1978	0.2158	0.1770	0.1676
Tumour grade									
<i>r_s</i>	0.003	-0.006	-0.014	0.052	0.043	0.036	-0.170	-0.171	-0.170
<i>p-value</i>	0.9451	0.9008	0.7632	0.2572	0.3577	0.4420	0.0002	0.0002	0.0002
Disease stage									
<i>r_s</i>	0.073	0.077	0.067	0.050	0.055	0.046	0.020	0.025	0.030
<i>p-value</i>	0.1083	0.0898	0.1444	0.2812	0.2310	0.3242	0.6603	0.5929	0.5227
ER status									
<i>r_s</i>	0.028	0.021	0.022	0.096	0.089	0.090	0.172	0.173	0.173
<i>p-value</i>	0.5448	0.6405	0.6336	0.0358	0.0546	0.0528	0.0002	0.0002	0.0002
PR status									
<i>r_s</i>	-0.023	-0.031	-0.029	0.033	0.025	0.026	0.119	0.121	0.121
<i>p-value</i>	0.6081	0.5027	0.5287	0.4704	0.5963	0.5755	0.0096	0.0084	0.0087
HER2 status									
<i>r_s</i>	0.176	0.168	0.165	0.086	0.080	0.076	0.031	0.032	0.034
<i>p-value</i>	<.0001	0.0002	0.0003	0.0623	0.0848	0.0990	0.4989	0.4915	0.4695

CBR1: cannabinoid receptor 1; CBR2: cannabinoid receptor 2; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2; n= number; *r_s*: Spearman correlation coefficient; * Adjusted for age at diagnosis, menopausal status, smoking status, alcohol consumption, personal history of breast cancer and prior chemotherapy; [§] Further adjusted for body mass index; In bold: statistically significant correlation.

Table 3: Hazard ratios for the association between CBR expression and survival in breast cancer patients

CBR	Events/total	Crude		Adjusted [§]		Fully adjusted [†]				
		HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value			
Overall survival										
CBR1	81/489	0.98	[0.88-1.09]	0.70	1.01	[0.90-1.13]	0.86	1.02	[0.91-1.14]	0.74
CBR2 cytoplasmic	82/475	0.95	[0.82-1.09]	0.46	1.03	[0.88-1.20]	0.74	1.02	[0.87-1.19]	0.84
CBR2 nuclear	82/475	0.99	[0.90-1.09]	0.76	1.01	[0.90-1.11]	0.91	1.01	[0.92-1.12]	0.81
Recurrence-free survival										
CBR1	67/489	1.04	[0.93-1.17]	0.49	1.02	[0.92-1.14]	0.71	1.04	[0.93-1.18]	0.49
CBR2 cytoplasmic	68/475	0.96	[0.83-1.11]	0.59	1.13	[0.97-1.33]	0.13	1.09	[0.93-1.28]	0.28
CBR2 nuclear	68/475	0.99	[0.90-1.09]	0.77	1.01	[0.90-1.13]	0.86	1.01	[0.90-1.13]	0.86
Event-free survival										
CBR1	134/489	1.00	[0.92-1.09]	0.97	1.01	[0.93-1.10]	0.75	1.01	[0.93-1.10]	0.81
CBR2 cytoplasmic	134/475	0.98	[0.87-1.10]	0.71	1.01	[0.90-1.14]	0.81	1.01	[0.90-1.14]	0.82
CBR2 nuclear	134/475	0.98	[0.91-1.06]	0.69	1.00	[1.00-1.00]	0.22	1.00	[1.00-1.00]	0.25

CBR: cannabinoid receptor; CBR1: cannabinoid receptor 1; CBR2: cannabinoid receptor 2; HR: hazard ratio; CI: confident interval; [§] Models included age, menopausal status, family history of breast cancer, smoking status, alcohol consumption, personal history of breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, neoadjuvant endocrine therapy; [†] Models included age, menopausal status, family history of breast cancer, smoking status, alcohol consumption, personal history of breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, neoadjuvant endocrine therapy, year diagnosis, adjuvant chemotherapy, adjuvant radiotherapy, adjuvant endocrine therapy, anti-HER2 therapy, type of surgery.

Table S 1: Hazard ratios for the association between CBR and survival with adjustment for prognostic factors

CBR	Events/total	Crude		p-value	Adjusted [§]		p-value	Fully adjusted [†]		p-value
		HR (95% CI)			HR (95% CI)			HR (95% CI)		
Overall survival										
CBR1	81/489	0.98	[0.88-1.09]	0.70	1.00	[0.89-1.12]	1.00	1.01	[0.90-1.12]	0.87
CBR2 cytoplasmic	82/475	0.95	[0.82-1.09]	0.46	1.02	[0.87-1.19]	0.82	1.03	[0.87-1.21]	0.76
CBR2 nuclear	82/475	0.99	[0.90-1.09]	0.76	1.04	[0.94-1.16]	0.44	1.03	[0.93-1.15]	0.54
Recurrence-free survival										
CBR1	67/489	1.04	[0.93-1.17]	0.49	0.95	[0.83-1.08]	0.42	0.98	[0.86-1.12]	0.77
CBR2 cytoplasmic	82/475	0.96	[0.83-1.11]	0.59	1.12	[0.95-1.33]	0.19	1.16	[0.96-1.39]	0.12
CBR2 nuclear	82/475	0.99	[0.90-1.09]	0.77	1.04	[0.92-1.16]	0.62	1.04	[0.92-1.17]	0.56
Event-free survival										
CBR1	134/489	1.00	[0.92-1.09]	0.97	0.97	[0.88-1.06]	0.46	0.97	[0.89-1.06]	0.50
CBR2 cytoplasmic	134/475	0.98	[0.87-1.10]	0.71	1.01	[0.89-1.14]	0.90	0.99	[0.87-1.12]	0.88
CBR2 nuclear	134/475	0.98	[0.91-1.06]	0.69	1.00	[1.00-1.00]	0.44	1.00	[1.00-1.00]	0.24

CBR: cannabinoid receptor, CBR1: cannabinoid receptor 1; CBR2: cannabinoid receptor 2; HR: hazard ratio; CI: confident interval; § Model included age, menopausal status, family history of breast cancer, smoking status, alcohol consumption, personal history of breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, neoadjuvant endocrine therapy, tumour size, stage, tumour grade, lymph node involment, ER/PR status, HER2 status; † Model included age, menopausal status, family history of breast cancer, smoking status, alcohol consumption, personal history of breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, neoadjuvant endocrine therapy, tumour size, stage, tumour grade, lymph node involment, ER/PR status, HER2 status, year diagnosis, adjuvant radiotherapy, adjuvant endocrine therapy, anti-HER2 therapy,type of surgery.

Chapitre 5 < Discussion >

5.1 Discussion

La revue de la littérature indique une altération du SEC dans les tumeurs selon le type de cancer (47). Son mécanisme d'action est encore mal compris. L'expression de ces récepteurs a été étudiée dans plusieurs types de cancer différents, mais l'on retrouve encore trop peu d'information sur le cancer du sein. À cet égard, notre recherche visait à évaluer pour la première fois si l'expression protéique des RCB1 et RCB2 influençait la gravité et l'issue de la maladie.

Il semble qu'à ce jour il n'y ait pas de portrait spécifique de marquage pour le RCB dans les tissus tumoraux (34, 50). Comme mentionné, une expression hétérogène a été détectée par IHC dans le cytoplasme et dans le noyau. Cette observation a été décrite dans certaines études. Notamment, dans les études sur les cancers épidermoïdes de la tête et du cou où une expression dans le cytoplasme et dans le noyau pour le RCB1 et RCB2 a été observée (34) alors que d'autres auteurs ont observé une coloration dans la membrane du RCB1 et une prédominance de marquage au niveau du cytoplasme pour le carcinome épidermoïde de la langue (47). En contrepartie dans les études réalisées sur le cancer colorectal, certaines ont observé une expression nucléaire uniquement pour le RCB2 (31) et d'autres ont observé une expression dans le cytoplasme et dans le noyau pour le RCB1 seulement, mais en raison d'un nombre insuffisant de marquages au niveau du noyau ont décidé de considérer l'expression cytoplasmique (49). Quoi qu'il en soit, les deux récepteurs démontraient des caractéristiques similaires. Concernant la seule étude épidémiologique sur le cancer du sein, seule l'intensité de la coloration a été évaluée (la proportion de cellules positives n'a pas été prise en compte) et aucune distinction entre l'expression nucléaire ou cytoplasmique n'a été signalée. Nos observations semblent révéler de nouvelles informations concernant l'étude de l'expression des RCB dans les tumeurs mammaires. Nos résultats restent cohérents avec d'autres études ayant étudié l'expression des RCB dans d'autres types de cancer où un marquage cytoplasmique et nucléaire a été observé pour le RCB2.

Nous avons observé plusieurs corrélations entre les facteurs pronostiques du cancer du sein et l'expression des RCB. L'expression du RCB1 était positivement corrélée avec l'envahissement

ganglionnaire et le statut HER2 lors des analyses après ajustement. RCB1 serait ainsi corrélé à des facteurs de mauvais pronostic. En comparaison à d'autres études, l'expression du RCB1 était positivement corrélée avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) ($r_s=0,316$, $p<0,001$) pour le cancer de la prostate (51). Une autre étude a observé des similitudes où l'expression du RCB1 était positivement corrélée avec le score de Gleason ($r_s=0,21$, $p<0,001$), le stade tumoral ($r_s=0,11$, $p<0,05$), le pourcentage du spécimen contenant des cellules tumorales ($r_s=0,17$, $p=0,01$) et le EGFR ($r_s=0,18$, $p=0,01$) faisant ainsi du RCB1 un indicateur de mauvais pronostic (29). Pour l'expression nucléaire du RCB2, une corrélation positive avec le statut ER/PR a été observée avant et après ajustement. Une corrélation inverse a été observée avec le grade histologique. Le grade histologique reflète la différenciation cellulaire et une expression élevée de RCB2 nucléaire indiquerait une tumeur de bas grade et serait donc corrélée à un bon pronostic. Ainsi, le RCB1 et le RCB2 pourraient avoir une implication différente dans la progression du cancer du sein. En fait, l'expression du RCB1 était corrélée à de mauvais marqueurs pronostiques tandis que l'expression nucléaire du RCB2 était corrélée à de bons marqueurs pronostiques. En outre, le compartiment cellulaire abritant l'expression des RCB peut avoir une signification fonctionnelle différente, car nous avons observé que l'expression nucléaire de RCB2 avait une direction opposée d'association avec le pronostic que l'expression cytoplasmique de RCB2.

Par la suite, nous avons tenté d'évaluer l'association entre l'expression protéique des RCB et la survie. Bien que non statistiquement significative, l'expression cytoplasmique du RCB2 était associée à la survenue de récurrences locorégionales et à des récurrences à distance plus élevée. Par ailleurs, nos observations de récurrences plus élevées dans les tumeurs à forte expression cytoplasmique du RCB2 est cohérente avec les résultats de la seule étude précédente ayant examiné l'expression de RCB2 dans le cancer du sein (43) qui a rapporté une association entre l'expression du RCB2 et la survie chez les patientes avec un statut HER2 positif. Dans les études présentées dans la revue de la littérature, certaines ont rapporté des observations similaires pour le RCB1 dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou et la survie globale (34), pour le carcinome épidermoïde de la langue et la survie globale (47), et dans le cancer colorectal et la survie sans maladie (49). Ces mêmes observations étaient présentes pour le RCB2 dans le cancer rectal et la survie globale et sans maladie (31) et la leucémie lymphocytaire chronique et la survie globale et la survie sans traitement (50). Bien qu'il soit difficile de se prononcer puisque plusieurs n'ont pas utilisé des analyses de survie avec ajustement des variables,

ces observations suggèrent que le RCB2 pourrait contribuer à prédire la survie des patientes et principalement comme marqueur pour la récurrence. Durant le processus de différenciation, il semble que les RCB agissent à différents moments et semblent dépendants du type de cancer (33). Quoiqu'il en soit, il semble que les cannabinoïdes soient capables de médier leur effet par plusieurs voies de signalisation alternatives (10). Il pourrait être intéressant de vérifier ces autres voies et à différents niveaux du SEC.

5.2 Forces et limites

Notre étude a plusieurs forces.

Nous avons tenté de réduire au maximum le risque de biais de sélection. Les caractéristiques de notre population reflètent les caractéristiques de la population cible, soit les patientes atteintes d'un cancer du sein au Canada. De plus, la banque de données ne contient aucune valeur manquante en raison d'une mise à jour continue des valeurs et l'échantillon de patientes constitue une série consécutive. Même si lors de la lecture du marquage des récepteurs sur les TMA, certaines carottes n'ont pu être évaluées en raison du décollement du tissu ou par l'absence de cellules cancéreuses, pour les deux récepteurs, le nombre de valeurs manquantes était réduit. Cette perte était aléatoire et représente moins de 10%, le risque de biais de sélection est donc négligeable.

Les risques de biais d'information ont été pris en considération. Ainsi, la banque de données a été colligée par deux personnes formées pour réduire des erreurs de saisie de données. Également, nous avons mesuré l'expression des RCB avec la méthode d'IHC, cette méthode est appropriée pour localiser des protéines dans un tissu donné (64). Le travail des techniciens du laboratoire et le contrôle des instruments utilisés assurent la qualité de l'IHC (65). Le marquage des anticorps a été validé dans notre laboratoire de recherche pour garantir la spécificité. Bien que certains auteurs aient utilisé la RT-PCR, une méthode basée sur la détection et la quantification de l'ARNm dans un tissu donné (66), celle-ci ne permet pas de localiser l'expression protéique contrairement à l'IHC. Cette méthode est aussi reconnue pour entraîner plusieurs faux positifs en clinique (66). Puis, dans le but de réduire encore une fois des biais d'information, l'expression des RCB a été évaluée à deux reprises par deux lecteurs indépendants et une mesure de reproductibilité a été effectuée.

Grâce à une méthode robuste pour la sélection des variables d'ajustement, nous avons tenté de réduire au maximum le risque de biais de confusion. En plus des analyses de sensibilité ont été effectuées. Cependant, nous n'avons pas pu ajuster pour tous les facteurs identifiés comme pertinents par notre méthode de sélection. Ces variables sont : l'ethnicité, le statut socio-économique, la consommation de drogue (cannabis), les comorbidités et le traitement de radiothérapie antérieur. Pour ce qui est de l'ethnicité, comme la population au CMS est une population homogène sur le plan ethnique, aucun ajustement n'était nécessaire. Le statut socio-économique et la consommation de cannabis sont des variables très importantes en regard de notre objectif de recherche. Ces variables n'étaient pas disponibles et sont difficiles à obtenir dans les banques de données. En effet, le statut économique a été identifié comme un prédicteur de survie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (67-69) et il a été démontré qu'il est associé à la consommation de cannabis (70, 71). Cependant, les taux de consommation régulière de cannabis au Canada sont très faibles (72) et le lien entre la consommation de cannabis et l'expression des RCB reste à établir. Toutefois, nous pensons avoir cerné indirectement cette variable, de façon imparfaite évidemment, car celle-ci est parfois associée à la consommation d'alcool et de tabac, tout comme pour les comorbidités que nous n'avons pas pu obtenir. De plus, nous n'avons pas pu obtenir d'information concernant l'exposition à la radiothérapie antérieurement et la consommation de drogue. Le risque de confusion résiduelle est donc présent, mais n'est pas différent de celui rencontré dans les études sur la survie du cancer du sein.

Par ailleurs, nous avons fixé *a priori* la définition de notre issue. Nous avons décidé de ne pas utiliser la survie spécifique au cancer du sein, car celle-ci peut parfois entraîner des biais d'information. En effet, à mesure que l'âge des patientes augmente, il y a présence d'un risque important de décès concurrents et le décès pourrait être attribuable à d'autres causes. De plus, les causes de décès peuvent parfois être difficiles à attribuer au cancer du sein ou à une autre cause (63).

Dans notre étude certaines limites ont été observées. Les TMA ne permettent pas d'évaluer de petites tumeurs (<1 mm), occasionnent des pertes d'échantillons, peuvent parfois ne pas être représentatifs de la tumeur complète et ne pas refléter les caractéristiques histologiques d'une analyse effectuée sur la tumeur complète (73, 74). Malgré cela, les études antérieures indiquent qu'une erreur d'échantillonnage est réduite lorsque plusieurs poinçons sont réalisés pour chaque tumeur de patiente

(75) et que l'échantillonnage aléatoire donne tout de même un résultat acceptable pour les tumeurs hétérogènes (76, 77).

Le peu d'évènements survenus durant le suivi a pu être une limite importante de l'étude en dépit de la grande taille échantillon et de la longue période de suivi. En effet, la proportion de patientes ayant présenté une récurrence locorégionale, une récurrence à distance et un décès était faible et peut avoir entraîné une faible puissance pour détecter des associations. Cependant, notre étude se place dans un contexte exploratoire, et les résultats observés méritent d'être explorés davantage.

Conclusion

Dans cette étude exploratoire, nous avons évalué l'expression protéique des RCB1 et RCB2 dans les tumeurs mammaires et son influence sur la gravité et l'issue de la maladie.

Les RCB ont pu être détectés dans les tumeurs mammaires. Le RCB1 et le RCB2 nucléaire semblent être associés au pronostic du cancer du sein. L'expression cytoplasmique du RCB1 semblait être associée aux facteurs de mauvais pronostic (plus d'envahissement ganglionnaire, plus de statut HER2 positif) alors que l'expression nucléaire du RCB2 semblait être associée aux facteurs de bon pronostic (grade tumoral plus faible). Dans notre cohorte, un faible nombre d'événements est survenu durant le suivi ce qui pourrait expliquer que nous n'ayons pas détecté d'associations statistiquement significatives. Les résultats obtenus indiquent tout de même que l'expression des RCB dans le cancer du sein nécessite d'être exploré davantage. Notamment, la prochaine étape serait de réaliser une étude de cohorte avec un plus grand nombre de patientes et de s'assurer d'avoir plus d'évènements pour avoir la puissance suffisante pour détecter des associations. Les prochaines études pourront prendre en considération plusieurs éléments importants, notamment le processus de sélection des variables confondantes.

Bibliographie

1. Ferlay J EM, Lam F, Colombert M, Mery L, Pineros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow Lyon, France: International Agency For Research on Cancer; 2018 [Available from: Internet.
2. santé Omdl. Cancer du sein: prévention et lutte contre la maladie.
3. cancer Scd. Statistiques sur le cancer du sein Canada: Société canadienne du cancer; 2020 [Available from: Internet.
4. Québec Fcdsd. Statistiques Québec, Canada: Fondation cancer du sein du Québec; 2019 [Available from: <https://rubanrose.org/cancer-du-sein/comprendre/statistiques>.
5. Bergqvist J, Strang P. The will to live - breast cancer patients' perceptions of palliative chemotherapy. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 2017;56(9):1168-74.
6. Tao JJ, Visvanathan K, Wolff AC. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2015;24 Suppl 2:S149-53.
7. Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis HV, Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. *Updates in surgery*. 2017;69(3):313-7.
8. Riley RD, Hayden JA, Steyerberg EW, Moons KG, Abrams K, Kyzas PA, et al. Prognosis Research Strategy (PROGRESS) 2: prognostic factor research. *PLoS Med*. 2013;10(2):e1001380.
9. Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(6):436-44.
10. Moreno E, Cavic M, Krivokuca A, Casadó V, Canela E. The Endocannabinoid System as a Target in Cancer Diseases: Are We There Yet? *Front Pharmacol*. 2019;10:339.
11. Zou S, Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(3).
12. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346(6284):561-4.
13. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*. 2006;58(3):389-462.
14. Caffarel MM, Sarrio D, Palacios J, Guzman M, Sanchez C. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res*. 2006;66(13):6615-21.
15. Newsweed. Le système endocannabinoïde : qu'est-ce que c'est ? Comment fonctionne-t-il ? *Newsweed*. 2016.
16. Alexander A, Smith PF, Rosengren RJ. Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Letters*. 2009;285(1):6-12.
17. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
18. Angelika Amon AB, Anthony Bretscher, Chris A Kaiser, Monty Krieger, Harvey Lodish, Hidde Ploegh, Matthew P Scott. *Biologie moléculaire de la cellule*. 4e édition ed: de boeck; 2014 Juillet 2014. 1240 p.
19. Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *Journal of neuroendocrinology*. 2008;20 Suppl 1:10-4.
20. Nichols JM, Kaplan BLF. Immune Responses Regulated by Cannabidiol. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2020;5(1):12-31.

21. Pacher P, Kunos G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease-- successes and failures. *The FEBS journal*. 2013;280(9):1918-43.
22. McPartland JM, Guy GW, Di Marzo V. Care and feeding of the endocannabinoid system: a systematic review of potential clinical interventions that upregulate the endocannabinoid system. *PLoS one*. 2014;9(3):e89566.
23. Caffarel MM, Andradas C, Perez-Gomez E, Guzman M, Sanchez C. Cannabinoids: a new hope for breast cancer therapy? *Cancer treatment reviews*. 2012;38(7):911-8.
24. Caffarel MM, Andradas C, Mira E, Perez-Gomez E, Cerutti C, Moreno-Bueno G, et al. Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Molecular cancer*. 2010;9:196.
25. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1298-305.
26. Munson AE, Harris LS, Friedman MA. Antineoplastic activity of cannabinoids. *Journal of the National Cancer Institute*. 1975;55(3):597-602.
27. Malfitano AM, Laezza C, Galgani M, Matarese G, D'Alessandro A, Gazzero P, et al. The CB1 receptor antagonist rimonabant controls cell viability and ascitic tumour growth in mice. *Pharmacological research*. 2012;65(3):365-71.
28. Guzman M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(10):745-55.
29. Thors L, Bergh A, Persson E, Hammarsten P, Stattin P, Egevad L, et al. Fatty acid amide hydrolase in prostate cancer: association with disease severity and outcome, CB1 receptor expression and regulation by IL-4. *PLoS one*. 2010;5(8):e12275.
30. Zhang J, Medina-Cleghorn D, Bernal-Mizrachi L, Bracci PM, Hubbard A, Conde L, et al. The potential relevance of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol, in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncoscience*. 2016;3(1):31-41.
31. Martinez-Martinez E, Gomez I, Martin P, Sanchez A, Roman L, Tejerina E, et al. Cannabinoids receptor type 2, CB2, expression correlates with human colon cancer progression and predicts patient survival. *Oncoscience*. 2015;2(2):131-41.
32. Michalski CW, Oti FE, Erkan M, Sauliunaite D, Bergmann F, Pacher P, et al. Cannabinoids in pancreatic cancer: correlation with survival and pain. *International journal of cancer*. 2008;122(4):742-50.
33. Chung SC, Hammarsten P, Josefsson A, Stattin P, Granfors T, Egevad L, et al. A high cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. *European Journal of Cancer*. 2009;45(1):174-82.
34. Klein Nulent TJ, Van Diest PJ, van der Groep P, Leusink FK, Kruitwagen CL, Koole R, et al. Cannabinoid receptor-2 immunoreactivity is associated with survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2013;51(7):604-9.
35. Xu X, Liu Y, Huang S, Liu G, Xie C, Zhou J, et al. Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2006;171(1):31-8.
36. Matthews SB, Sartorius CA. Steroid Hormone Receptor Positive Breast Cancer Patient-Derived Xenografts. *Hormones & cancer*. 2017;8(1):4-15.
37. sein RCdcd. Notion de base sur le cancer 2019.
38. Pascale This VG. Qu'est-ce qu'un cancer hormono dépendant ? Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. 2018.

39. De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, et al. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(14):8375-80.
40. cancer.org B. Hormone receptor status. 2019.
41. Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10087):2415-29.
42. Ursini-Siegel J, Schade B, Cardiff RD, Muller WJ. Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(5):389-97.
43. Perez-Gomez E, Andradas C, Blasco-Benito S, Caffarel MM, Garcia-Taboada E, Villa-Morales M, et al. Role of cannabinoid receptor CB2 in HER2 pro-oncogenic signaling in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(6):djv077.
44. Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(7):1161-72.
45. Qamri Z, Preet A, Nasser MW, Bass CE, Leone G, Barsky SH, et al. Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(11):3117-29.
46. Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, et al. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;318(3):1375-87.
47. Theocharis S, Giaginis C, Alexandrou P, Rodriguez J, Tasoulas J, Danas E, et al. Evaluation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients' survival. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(3):3647-56.
48. Jung CK, Kang WK, Park JM, Ahn HJ, Kim SW, Oh ST, et al. Expression of the cannabinoid type I receptor and prognosis following surgery in colorectal cancer. *Oncology letters*. 2013;5(3):870-6.
49. Gustafsson SB, Palmqvist R, Henriksson ML, Dahlin AM, Edin S, Jacobsson SO, et al. High tumour cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity negatively impacts disease-specific survival in stage II microsatellite stable colorectal cancer. *PloS one*. 2011;6(8):e23003.
50. Freund P, Porpaczy EA, Le T, Gruber M, Pausz C, Staber P, et al. Cannabinoid Receptors Are Overexpressed in CLL but of Limited Potential for Therapeutic Exploitation. *PloS one*. 2016;11(6):e0156693.
51. Fowler CJ, Hammarsten P, Bergh A. Tumour Cannabinoid CB(1) receptor and phosphorylated epidermal growth factor receptor expression are additive prognostic markers for prostate cancer. *PloS one*. 2010;5(12):e15205.
52. Wang J, Xu Y, Zhu L, Zou Y, Kong W, Dong B, et al. Cannabinoid receptor 2 as a novel target for promotion of renal cell carcinoma prognosis and progression. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2018;144(1):39-52.
53. Zeng C, Chen Y. HTR1D, TIMP1, SERPINE1, MMP3 and CNR2 affect the survival of patients with colon adenocarcinoma. *Oncology letters*. 2019;18(3):2448-54.
54. Weiss P, Porpaczy EA, Le T, Skrabcs C, Gruber M, Pausz C, et al. Cannabinoid receptor 1 in chronic lymphocytic leukemia: A strong prognostic marker with limited therapeutic use. *Blood*. 2012;120(21).

55. Xu XD, Liu GX, Xie CZ, Zhong DW, Miao XY. Overexpression of cannabinoid receptors, CB1 and CB2, correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*. 2009;3(1):78.
56. Weiss P, Porpacz E, Le T, Skrabs C, Gruber M, Pausz C, et al. Exploring the role and use of cannabinoid receptors and cannabinoids in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98:290-1.
57. Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, et al. Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(52):19115-20.
58. Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, et al. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *The New England journal of medicine*. 2017;377(19):1836-46.
59. Untch M, von Minckwitz G, Gerber B, Schem C, Rezai M, Fasching PA, et al. Survival Analysis After Neoadjuvant Chemotherapy With Trastuzumab or Lapatinib in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer in the GeparQuinto (G5) Study (GBG 44). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018;36(13):1308-16.
60. Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond MEH, Allred DC, Valenstein PN. Recommendations for Validating Estrogen and Progesterone Receptor Immunohistochemistry Assays. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2010;134(6):930-5.
61. Hudis CA, Barlow WE, Costantino JP, Gray RJ, Pritchard KI, Chapman JA, et al. Proposal for standardized definitions for efficacy end points in adjuvant breast cancer trials: the STEEP system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(15):2127-32.
62. VanderWeele TJ, Shpitser I. A new criterion for confounder selection. *Biometrics*. 2011;67(4):1406-13.
63. Sarfati D, Blakely T, Pearce N. Measuring cancer survival in populations: relative survival vs cancer-specific survival. *Int J Epidemiol*. 2010;39(2):598-610.
64. Furrer D, Jacob S, Caron C, Sanschagrin F, Provencher L, Diorio C. Tissue Microarray Is a Reliable Tool for the Evaluation of HER2 Amplification in Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2016;36(9):4661-6.
65. Sukswai N, Khoury JD. Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Current hematologic malignancy reports*. 2019;14(5):368-75.
66. Furrer D, Sanschagrin F, Jacob S, Diorio C. Advantages and disadvantages of technologies for HER2 testing in breast cancer specimens. *American journal of clinical pathology*. 2015;144(5):686-703.
67. Lagerlund M, Bellocco R, Karlsson P, Tejler G, Lambe M. Socio-economic factors and breast cancer survival--a population-based cohort study (Sweden). *Cancer Causes Control*. 2005;16(4):419-30.
68. Herndon JE, 2nd, Kornblith AB, Holland JC, Paskett ED. Effect of socioeconomic status as measured by education level on survival in breast cancer clinical trials. *Psychooncology*. 2013;22(2):315-23.
69. Ji P, Gong Y, Jiang CC, Hu X, Di GH, Shao ZM. Association between socioeconomic factors at diagnosis and survival in breast cancer: A population-based study. *Cancer Med*. 2020;9(5):1922-36.

70. Patrick ME, Wightman P, Schoeni RF, Schulenberg JE. Socioeconomic status and substance use among young adults: a comparison across constructs and drugs. *J Stud Alcohol Drugs*. 2012;73(5):772-82.
71. Chan GCK, Leung J, Quinn C, Weier M, Hall W. Socio-economic differentials in cannabis use trends in Australia. *Addiction*. 2018;113(3):454-61.
72. S. HDaL-C. Association between the frequency of cannabis use and selected social indicators. *Insights on Canadian Society*. May 2018 Statistics Canada Catalogue no(75-006-X).
73. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000;80(12):1943-9.
74. Conway C, Dobson L, O'Grady A, Kay E, Costello S, O'Shea D. Virtual microscopy as an enabler of automated/quantitative assessment of protein expression in TMAs. *Histochemistry and cell biology*. 2008;130(3):447-63.
75. Zhang D, Salto-Tellez M, Putti TC, Do E, Koay ES. Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2003;16(1):79-84.
76. Giltnane JM, Rimm DL. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nature clinical practice Oncology*. 2004;1(2):104-11.
77. Goma W, Ke Y, Fujii H, Helliwell T. Tissue microarray of head and neck squamous carcinoma: validation of the methodology for the study of cutaneous fatty acid-binding protein, vascular endothelial growth factor, involucrin and Ki-67. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2005;447(4):701-9.

Annexe A <Stratégie de recherche>

Stratégie de recherche spécifique au cancer

MEDLINE (via PubMed)

"Neoplasms"[Mesh] OR Neoplasm*[TIAB]
"Receptors, Cannabinoid"[Mesh] OR Cannabinoid Receptor*[TIAB]
"Analysis, survival"[Mesh] OR "survival"[Mesh] OR survival*[TIAB]
1 AND 2 AND 3

EMBASE

'cancer*':ab,ti OR 'carcinoma*':ab,ti OR 'malignant neoplasm*':ab,ti OR 'malignant tumour*':ab,ti OR
'malignant tumour*':ab,ti OR 'cancer'/exp
'survival*':ab,ti OR 'survival rate*':ab,ti OR 'survival time*':ab,ti OR 'mortality*':ab,ti OR 'mortality
risk*':ab,ti OR 'survival analysis*':ab,ti OR 'survival'/exp
'cannabinoid receptor*':ab,ti OR 'cannabinoid receptor'/exp
1 AND 2 AND 3

Stratégie de recherche spécifique au cancer du sein

MEDLINE (via PubMed)

"Breast Neoplasms"[Mesh] OR Breast Neoplasm*[TIAB] OR Breast Cancer[TIAB] OR Breast
Tumor*[TIAB]
"Receptors, Cannabinoid"[Mesh] OR Cannabinoid Receptor*[TIAB]
"Analysis, survival"[Mesh] OR "survival"[Mesh] OR survival*[TIAB]
1 AND 2 AND 3

EMBASE

'breast cancer'/exp OR 'breast neoplasm*':ti,ab OR 'breast cancer*':ti,ab OR 'breast tumour*':ti,ab
'survival*':ab,ti OR 'survival rate*':ab,ti OR 'survival time*':ab,ti OR 'mortality*':ab,ti OR 'mortality
risk*':ab,ti OR 'survival analysis*':ab,ti OR 'survival'/exp
'cannabinoid receptor*':ab,ti OR 'cannabinoid receptor'/exp
1 AND 2 AND 3

Annexe B <Modèle statistique de cox>

Survie globale

1. Construction du modèle de base de Cox

Les variables d'ajustements ont été déterminées a priori.

2. Vérification des hypothèses

2.1 Indépendances des observations

Les données sont indépendantes par devis.

2.2 Hypothèse de proportionnalité

Nous avons choisi d'utiliser les résidus de Schoenfeld standardisés pour tester l'hypothèse de proportionnalité. Comme cette méthode peut parfois être subjective, c'est pourquoi nous avons eu recours au processus du score standardisé pour valider l'hypothèse.

2.3 Forme fonctionnelle des variables continues

La forme fonctionnelle des variables continues (âge au diagnostic, IMC, taille de la tumeur) a été vérifiée à l'aide des résidus de martingales ainsi que des résidus cumulatifs, les graphiques et les valeurs obtenues nous ont permis de déduire qu'il n'était pas nécessaire de transformer les variables continues.

2.4 Multicolinéarité

Lorsqu'ajusté avec le modèle optimal, le RCB1 (vif=1) présentait une faible multicolinéarité pour les variables d'ajustement de l'âge (vif= 2,197 78) et du statut ménopausique (vif= 2,143 26). Dans notre contexte, il est tout à fait normal de retrouver une corrélation entre l'âge et le statut ménopausique. Dans un contexte explicatif, il n'est pas nécessaire de prendre en considération cette observation. Cependant, ces variables sont aussi des facteurs de risque important pour le cancer du sein et son retrait induirait un biais de confusion résiduel important. En effet, dans la littérature un facteur d'inflation de variance⁴ (vif) inférieur à 5 et 10 est un résultat acceptable (Kim, J, H.,2019). Pour le modèle complet, la variable d'ajustement concernant les traitements de radiothérapie présentait également une faible multicolinéarité (2,13). Nous avons donc décidé de

⁴ VIF= facteur d'inflation de la variance

conserver cette variable. Des résultats similaires sont retrouvés pour le cytoplasme et le noyau du RCB2.

2.5 Données extrêmes

Il n'y a pas de valeurs extrêmes retrouvées dans les analyses.

2.6 Séparation quasi complète

Le logiciel n'a pas produit de message d'erreur ou d'avertissement. Les modèles convergeaient et les intervalles de confiances sont étroits.

Annexe C <Résultats de l'évaluation immunohistochimique de l'expression des RCB>

Tableau 8: Évaluation immunohistochimique de l'expression du RCB1 et du RCB2

Variables	RCB1 n=2056	RCB2 n=2091
Nombre de carottes (%)		
interprétable	1580 (76,9)	1577 (75,4)
absence de tissu tumoral /Absence de carotte	306 (14,9)	420 (20,1)
non réalisé	170 (8,3)	94 (4,5)
Moyenne de l'intensité de coloration du cytoplasme /femme		
absent	42 (8,5)	81 (16,3)
faible	240 (48,8)	346 (69,5)
modéré	201 (40,9)	71 (14,3)
forte	9 (1,8)	0 (0,0)
Moyenne du pourcentage de coloration du cytoplasme/ femme		
<1%	45 (9,2)	57 (11,4)
1-24%	51 (10,4)	46 (9,2)
25-50%	109 (22,2)	56 (11,2)
51-74%	139 (28,3)	100 (20,1)
≥75%	148 (30,1)	239 (48,0)
Moyenne de l'intensité de coloration du noyau /femme		
absent		38 (7,6)
faible		187 (37,6)
modéré		272 (54,6)
forte		1 (0,2)
Moyenne du pourcentage de coloration du noyau/ femme		
<1%		35 (7,0)
1-24%		73 (14,7)
25-50%		142 (28,5)
51-74%		131 (26,3)
≥75%		117 (23,5)

Score composite du cytoplasme		
moyenne ± ET,	3,5±2,1	3,3±1,9
médiane [intervalle]	3,5 [0,0-10,7]	4,0 [0,0-8,0]
Score composite du noyau		
moyenne ± ET,		3,7±2,2
médiane [intervalle]		3,5 [0,0-9,3]
Nombre de carotte / femme		
1	38 (7,7)	40 (8,0)
2	78 (15,9)	84 (16,8)
3	122 (24,8)	131 (26,3)
4	254 (51,6)	244 (48,9)
RCB1 : récepteur cannabinoïde type 1; RCB2 : récepteur cannabinoïde type 2; n = nombre; % = pourcentage		