

Valeur prédictive et pronostique de l'infiltrat lymphocytaire chez les patientes ayant une chimiothérapie néoadjuvante dans les cancers du sein HER2 positif

Anne Sabaila Ollier

▶ **To cite this version:**

Anne Sabaila Ollier. Valeur prédictive et pronostique de l'infiltrat lymphocytaire chez les patientes ayant une chimiothérapie néoadjuvante dans les cancers du sein HER2 positif. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01636307

HAL Id: dumas-01636307

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01636307

Submitted on 16 Nov 2017

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

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

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt toute poursuite pénale.

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4

Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2016 N° 94

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT

DE

DOCTEUR EN MÉDECINE

Valeur prédictive et pronostique de l'infiltrat lymphocytaire chez les patientes ayant une chimiothérapie néoadjuvante dans les cancers du sein HER2 positif

Présentée et soutenue publiquement
le 24 juin 2016

Par

Anne SABAILA OLLIER

Née le 28 octobre 1985 à Levallois-Perret (92)

Dirigée par M. Le Docteur Fabien Reyal, Praticien de Centre anti-cancéreux

Jury :

M. Le Professeur Jean-Yves Pierga, PU-PH ..... Président
M. Le Professeur Roman Rouzier, PU-PH
M. Le Professeur Joseph Gligorov, PU-PH
Mme Le Docteur Anne-Sophie Hamy-Petit, PH

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Remerciements

À Monsieur le Professeur Pierga, vous me faites l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.

À Monsieur le Docteur Fabien Reyal, Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail, de votre disponibilité, votre aide et soutien tout au long de cette expérience. Merci pour votre enseignement théorique et pratique, et de tout ce que vous avez déjà fait pour moi.

Monsieur le Professeur Rouzier, Monsieur le Professeur Gliogorov, vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Anne Sophie Hamy Petit, je te remercie d'avoir partagé cette épreuve avec moi et de m'avoir aidé tout au long de ce travail. Merci pour les nombreuses relectures nocturnes et diurnes, pour ta disponibilité et tes conseils dans les moments de doute, et pour toutes les versions de stat même a quelques jours du rendu!

Merci à tous les chirurgiens et obstétriciens que j'ai croisés tout au long de mon internat, qui m'ont appris tant de chose ; en particulier au professeur Ballester, au professeur Lécuru, au professeur Darai, au professeur Carbone et au docteur Bonvalot, à Cherazade, Jean Guillaume, Virginie, Vincent, Charlotte, Cyrille, Guillaume D, Denis, Guillaume M, Caroline, Enora, Anne Cécile, Delphine, Hélène, Myriam et tous les autres

Merci à tous mes incroyables co internes, on a vécu tant de moments incroyables ensemble, et l'internat n'aurait vraiment pas été pareil sans vous ! Merci à Chacha, Sophie, Elise, Constance, Cécile, Marion, Chiara, Laure, Isa, Jen, Marie Emmanuelle, Morgane, Clotilde, Annabelle, Babin, Clairette, Claire, Chloé et Huyen Thu

Merci à Annabelle, Elsa, Patou, Vladimir et Mathilde, vous êtes ma dream team !

Merci à toute ma famille, pour tout le soutient que vous m'avez apporté. A mes parents et à mes supers frères.

Merci au clan Ollier, vous m'avez accueilli à bras ouvert, et je suis très fière de faire partie de votre famille.

Vincent, merci d'être à mes côtés, dans les grands moments et dans les petites choses, de toujours m'encourager et me soutenir, même quand mes décisions sont compliquées. Tu as été à mes côtés dans tous ces moments extra, et ma vie serait tellement moins drôle sans toi.

Abréviations

CD4/8	Cluster de différenciation 4/8
CNA	Chimiothérapie néo adjuvante
FOXP3	Forkhead box protein P3
HES	Hématoxyline-Eosine-Safran
IC95%	Intervalle de confiance à 95%
IHC	Immunohistochimie
IT TILs	Infiltrat Lymphocytaire (Tumoral) intra tumoral
IMC	Indice de masse corporelle
NK	Lymphocytes Natural Killers
PD-1	Programmed death - 1
PDL-1	Programmed death ligand - 1
RCB	Residual Cancer Burden
RE	Récepteurs aux estrogènes
RH	Récepteurs hormonaux
RHC	Réponse histologique complète
RP	Récepteurs à la progestérone
RT PCR	Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction
SSR	Survie sans récidive
Str TILs	Infiltrat Lymphocytaire (Tumoral) du stroma
T reg	Lymphocytes T régulateurs (CD4+, FOXP3+)

Table des matières

I.INTRODUCTION 5
I.1 CANCER DU SEIN *HER2*-POSITIF 5
I.2 PRONOSTIC DES CANCERS DU SEIN *HER2*-POSITIF 5
I.3 AUTRES FACTEURS PRONOSTIQUES 7
I.4 CHIMIOTHERAPIE NEOADJUVANTE 7
INTERET DE LA CHIMIOTHERAPIE NEO ADJUVANTE 7
REPONSE A LA CHIMIOTHERAPIE NEOADJUVANTE : 8
I.5 SYSTEME IMMUNITAIRE ET CANCER 9
IMMUNITE INNEE ET ACQUISE 9
EVOLUTION DES RELATIONS ENTRE LE SYSTEME IMMUNITAIRE ET LE CANCER 9
FACTEURS INFLUENÇANT LE SYSTEME IMMUNITAIRE 11
INFILTRAT LYMPHOCYTAIRE 11
SEUILS PREDICTIFS ET PRONOSTIQUES ASSOCIES A L'INFILTRAT LYMPHOCYTAIRE 13
INTERACTIONS ENTRE CHIMIOTHERAPIE ET SYSTEME IMMUNITAIRE 14
INTERACTIONS ENTRE *TRASTUZUMAB* ET SYSTEME IMMUNITAIRE 15
II. MATERIELS ET METHODES 17
II.1 POPULATION ETUDIEE 17
II.2 OBJECTIFS 17
II.3 ANATOMOPATHOLOGIE 18
EVALUATION DE LA REPONSE TUMORALE 18
QUANTIFICATION DE L'INFILTRAT LYMPHOCYTAIRE 19
II.4 ANALYSE STATISTIQUE 19
ANALYSE DESCRIPTIVE 19
ANALYSE PREDICTIVE 20
SURVIE SANS RECIDIVE ET SURVIE GLOBALE 20
III. RESULTATS 21
III.1 CARACTERISTIQUES CLINICO-PATHOLOGIQUES INITIALES DES PATIENTES 21
III.2 CARACTERISTIQUES CLINICO-PATHOLOGIQUES APRES CHIMIOTHERAPIE NEOADJUVANTE 23
III.3 REPONSE HISTOLOGIQUE 25
III.4 SURVIE SANS RECIDIVE 27
IV. DISCUSSION 30
IV.1 VALEUR PREDICTIVE DE L'INFILTRAT LYMPHOCYTAIRE 30
IV.2 VALEUR PRONOSTIQUE DE L'INFILTRAT LYMPHOCYTAIRE 32
IV.3 POINTS FORTS ET POINTS FAIBLES DE L'ETUDE 33
V. CONCLUSION 35
BIBLIOGRAPHIE 36
ANNEXES 41

I. Introduction

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et la première cause de décès par cancer avec 11 886 décès imputables en France en 2012, soit 18.8% des décès par cancer (Binder-Foucard et al., 2014).

I.1 Cancer du sein *HER2*-positif

Le cancer du sein est une maladie hétérogène pour laquelle plusieurs sous types moléculaires et immunohistochimiques ont été mis en évidence au début des années 2000 (Perou et al., 2000)(Sørlie et al., 2001)(Blows et al., 2010).

Les cancers du sein *HER2*-positifs ont une amplification et une surexpression du gène *HER2* neu (17q12) codant pour le récepteur tyrosine kinase *HER2*. Ils représentent 15 à 30% des cancers du sein. Environ 50% d'entre eux possèdent des récepteurs hormonaux (RH) positifs (Howlader et al., 2014)(Parise et al., 2014)(Kohler et al., 2015).

Ils ont un profil d'expression clinique, une réponse aux traitements et un pronostic différent des cancers du sein luminaux (ayant des récepteurs hormonaux positifs) et triples négatifs (ayant des récepteurs hormonaux négatifs et une absence de surexpression de *HER2*).

I.2 Pronostic des cancers du sein *HER2*-positif

Les cancers du sein *HER2*-positif étaient classiquement considérés comme agressifs, avec un taux de mortalité élevé et un fort risque de métastases précoces.

Au début des années 2000, le développement des thérapies ciblées a considérablement amélioré leur pronostic. Parmi celles-ci, le *trastuzumab*, un anticorps monoclonal anti-*HER2*, est le plus utilisé et le plus étudié.

En situation adjuvante, il est administré en association avec la chimiothérapie, puis en traitement d'entretien pendant un an. *Smith et al* ont comparé, parmi une population prise en charge pour un cancer du sein *HER2*-positif, le pronostic de patientes traitées par chimiothérapie adjuvante associé au *trastuzumab*, à celui de patientes traitées par chimiothérapie seule. Ils ont rapporté une meilleure survie globale pour les patientes dans le groupe *trastuzumab* + chimiothérapie, en comparaison au groupe chimiothérapie seule (hazard

ratio (HR)=0,66, p=0,0115)(Smith et al., 2007). La publication de *Perez et al*, a confirmé l'amélioration de la survie avec une diminution de 39% de la mortalité, et de la survie sans récidive à 4 ans (Perez et al., 2011).

En situation néo adjuvante, il est administré en association avec la chimiothérapie, puis il est poursuivi seul pendant un an. Cette utilisation a été validé par trois essais de phase III comparant l'association *trastuzumab*/chimiothérapie néoadjuvante à la chimiothérapie néoadjuvante seule.

Le « MD Anderson Cancer Center neoadjuvant *trastuzumab* trial » comparait la réponse histologique après chimiothérapie néoadjuvante parmi 42 patientes prises en charge pour un cancer du sein *HER2*-positif. Elles étaient randomisées entre un groupe recevant une chimiothérapie par anthracyclines et taxanes (n=16), et un groupe recevant la même chimiothérapie associé à du *trastuzumab* poursuivi pendant 24 semaines (n=18). Les taux de réponse histologique complète étaient de 25% et 65,2% respectivement, p=0,016 (Buzdar et al., 2005).

Le « Neoadjuvant Herceptin [NOAH] trial » étudiait la survie de 118 patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante seule et 117 patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante et *trastuzumab* en néoadjuvant puis poursuivi pendant un an. La survie sans récidive à 3 ans était plus importante en cas de traitement par *trastuzumab* : 71% contre 56% en cas de chimiothérapie seule, HR=0,59 ; IC95% : 0,38-0,90 ; p=0,013(Gianni et al., 2010). La survie sans récidive à 5 ans était de 58% et 43% respectivement (HR=0,64 ; IC95% : 0,44-0,93 ; p=0,016) (Gianni et al., 2014).

Le « GeparQuattro trial » comportait 445 patientes ayant un cancer du sein *HER2*-positif traitées par chimiothérapie néoadjuvante et *trastuzumab*. Le taux de réponse histologique complète était de 31,7%. (Untch et al., 2010).

Ces résultats ont été confirmés en vie réelle, en comparant le taux de réponse histologique complète et la survie, entre les patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante et *trastuzumab* et celles traitées par chimiothérapie néoadjuvante seule. Le taux de RHC était de 47.7% en cas de traitement néoadjuvant par chimiothérapie et *trastuzumab* contre 19.3% en cas de chimiothérapie seule, $P<0.0001$). La survie sans récidive était également améliorée (HR=4,84, IC95% : 2,52-9,31, $P<0,001$) (Hamy-Petit et al., 2016).

I.3 Autres facteurs pronostiques

- L'**âge** semblerait être un facteur pronostique avec un effet péjoratif dans les cancers de stade précoce pour les patientes jeunes (Gnerlich et al., 2009), bien que ce facteur soit controversé.
- La **taille tumorale** est un facteur pronostique indépendant. La survie diminue de façon linéaire avec l'augmentation de la taille tumorale (Carter et al., 1989)(Neville et al., 1992).
- Le **grade histologique** de Scarff Bloom et Richardson, modifié en 1991 par Elston et Ellis, évalue le degré de différenciation de la lésion en se basant sur trois critères morphologiques : son architecture, sa prolifération, et le pléiomorphisme nucléaire. Un grade élevé (III) est un facteur indépendant de mauvais pronostic (Schwartz et al., 2014).
- Des marqueurs de **prolifération cellulaire** élevés, notamment l'index mitotique ou le Ki67, sont également associés à un plus mauvais pronostic (Stuart-Harris et al., 2008).
- La présence d'**emboles lymphatiques** est un facteur de mauvais pronostic(Gujam et al., 2014). La valeur pronostique de la présence d'emboles vasculaires n'est par contre pas démontrée.
- L'**envahissement ganglionnaire** est le facteur pronostique majeur. Dans l'étude de *Fischer*, la survie à 5 ans était de 83% pour les patientes sans envahissement ganglionnaire, de 73% si 1 à 3 ganglions étaient atteints, de 46% si 4 à 12 ganglions étaient atteints, et de 2,4% si plus de 13 ganglions étaient métastatiques(Fisher et al., 1983). Le pourcentage de ganglions atteints sur le nombre de ganglions analysés est également un facteur pronostique (Lale Atahan et al., 2008).

I.4 Chimiothérapie néoadjuvante

Intérêt de la chimiothérapie néo adjuvante

L'intérêt des traitements néo adjuvants est multiple :

- Les patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante ont une survie sans récidive et globale identiques à celles ayant reçu un traitement adjuvant (Wolmark et al., 2001)
- Le taux de traitement conservateur du sein est augmenté (Fisher et al., 1997)
- Elle permet d'étudier in vivo la sensibilité de la tumeur aux drogues utilisées, avec la possibilité de changer de ligne de chimiothérapie en cas de non réponse

- Dans certains sous types (cancer du sein triples négatif et *HER2*-positif), la réponse histologique à la chimiothérapie néoadjuvante est associée à la survie globale et sans récidive

Réponse à la chimiothérapie néoadjuvante

La réponse histologique à la chimiothérapie (RHC) est un facteur pronostique. Dans les travaux de *Rastogi et al.* et *Symmans et al.* notamment, la RHC était associée à une meilleure survie globale et sans récidive (Rastogi et al., 2008)(Symmans et al., 2007). La Food and Drug Administration (FDA) l'a mise en avant comme marqueur d'efficacité dans les procédures accélérées de mise sur le marché de nouveaux médicaments.

Chez les patientes traitées en situation néoadjuvante pour un cancer du sein, une réponse histologique complète était obtenue plus fréquemment dans les sous types triple négatif et *HER2*-positif (Rouzier et al., 2005). Elle était également plus fréquente en cas de traitement séquentiel par anthracyclines et taxanes par rapport aux anthracyclines seules (Bear et al., 2006).

La définition de la réponse histologique complète (RHC) était variable en fonction des essais, certains retenant uniquement l'absence de lésion invasive ou in situ au niveau du sein (ypT0), d'autres l'absence de lésion infiltrant du sein (ypT0/is) ; d'autres encore l'absence de lésion infiltrante du sein et l'absence de métastase ganglionnaire (ypT0/is N0) ou enfin l'absence de lésion infiltrante ou in situ du sein et ganglionnaire (ypT0 N0).

Cortazar et al. ont étudié l'impact pronostique de ces différentes définitions de la RHC, parmi 12 essais comprenant 11955 patientes ayant un cancer du sein traité par chimiothérapie néoadjuvante. Les réponses histologiques intégrant l'atteinte ganglionnaire (ypT0 N0 et ypT0/is N0) étaient associés à une meilleure survie sans récidive (ypT0 N0: HR=0,44 ;IC95% :0,39–0,51 ; ypT0/is N0: HR=0·48 ; IC95% : 0,43–0,54) et survie globale (HR=0,36, IC95% : 0,30–0,44; et HR=0,36, IC95% : 0,31–0,42 respectivement) que celles du sein seul (ypT0 ou ypT0/is). Ils ne retrouvaient pas de différence de survie entre les réponses ypT0 N0 et ypT0/is N0 (Cortazar et al., 2014).

Les cellules cancéreuses persistantes après la chimiothérapie néoadjuvante sont probablement celles qui sont intrinsèquement résistantes, et qui risquent de récidiver par la suite. Le pronostic des patientes ayant un résidu tumoral étant très variable, il est nécessaire d'identifier les

patientes à haut risque de récidive, pouvant éventuellement bénéficier d'un traitement complémentaire. *Symmans et al* ont mis au point un score pronostique, le Residual Cancer Burden (RCB), prenant en compte le résidu tumoral (taille et cellularité), et les métastases ganglionnaires (nombre et taille de la plus grande métastase). Il était associé à la survie : les patientes ayant un RCB égal à I avaient un pronostic proche d'une réponse histologique complète. Celles ayant un résidu tumoral étendu (RCB-III) avaient le plus mauvais pronostic(Symmans et al., 2007). Ce score a ensuite été validé par différentes études, seul ou combiné avec le Ki67 (Sheri et al., 2015).

I.5 Système immunitaire et cancer

Immunité innée et acquise

Le système immunitaire est composé d'une immunité innée et d'une immunité acquise.

L'**immunité innée** repose sur les cellules Natural Killer (NK), les cellules dendritiques, les macrophages, les granulocytes et sur le complément. C'est la première ligne de défense immunitaire. Elle est rapide, non spécifique, et ne nécessite pas d'avoir été exposé préalablement à l'agent pathogène.

L'**immunité acquise** est spécifique à un antigène auquel elle a déjà été exposée et qu'elle a mémorisé. Elle repose sur les lymphocytes T et B. Les lymphocytes T CD8+ sont cytotoxiques, et détruisent les cellules cibles qui présentent des antigènes spécifiques à travers le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I.

Les lymphocytes T régulateurs (T reg) expriment CD4 à leur surface et FOXP3 dans leur cytosol. Ils exercent un effet immunosuppresseur, dont le rôle est notamment de protéger l'organisme des réactions auto-immunes. Certaines tumeurs utilisent ces fonctions pour se protéger du système immunitaire. La suppression des T reg chez la souris était responsable d'une réaction immunitaire anti tumorale (Shimizu et al., 1999).

Evolution des relations entre le système immunitaire et le cancer

La théorie la plus répandue concernant les relations entre le système immunitaire et le cancer est celle de l'immuno-surveillance (Mittal et al., 2014). Elle comporte trois étapes :

Il y a d'abord une phase **d'élimination**, pendant laquelle le système immunitaire détecte et détruit les cellules cancéreuses. Cette immunité anti tumorale est favorisée par une augmentation des facteurs pro immunitaires dans l'environnement tumoral, les lymphocytes NK, NK-T et T.

Ensuite, il y a un **équilibre** entre les cellules tumorales détruites par le système immunitaire, et celles qui se multiplient.

Enfin, il y a un **échappement** de la tumeur qui se développe et prolifère. C'est un processus multifactoriel lié à l'émergence de variants tumoraux moins sensibles au système immunitaire (l'immuno-édition), à l'augmentation des facteurs immunosuppresseurs dans l'environnement tumoral, et à la diminution de l'expression antigénique du complexe d'histocompatibilité (MHC1)

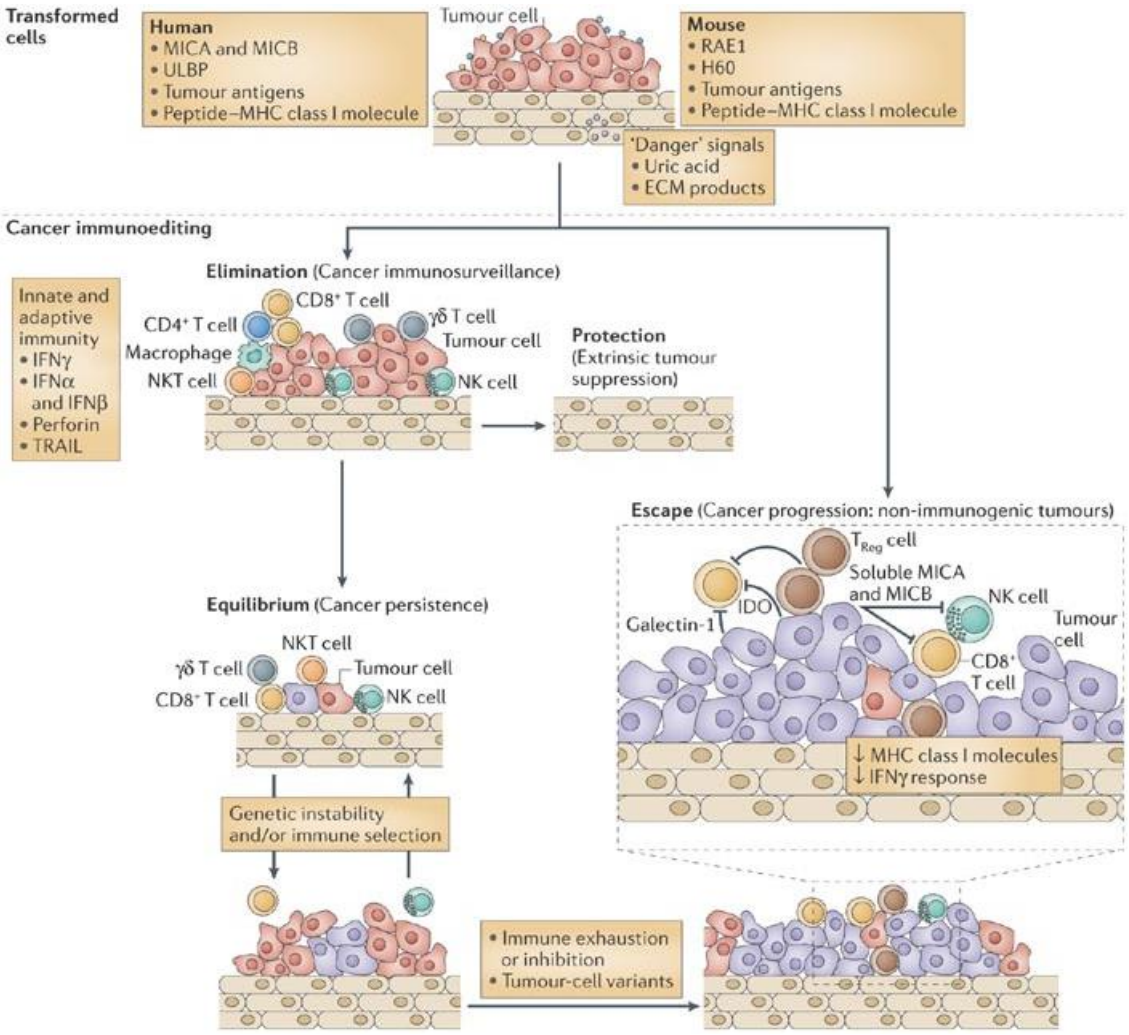


Figure 1 Mécanisme d'immuno-surveillance, tirée de *Dunn et al.* Nature, 2006 (Dunn et al., 2006)

Facteurs influençant le système immunitaire

De nombreux facteurs influencent la réponse immunitaire. Le régime alimentaire, le microbiote, l'obésité ou encore l'influence hormonale en font partie (Kroemer et al., 2015). Ils sont illustrés dans la Figure 2.

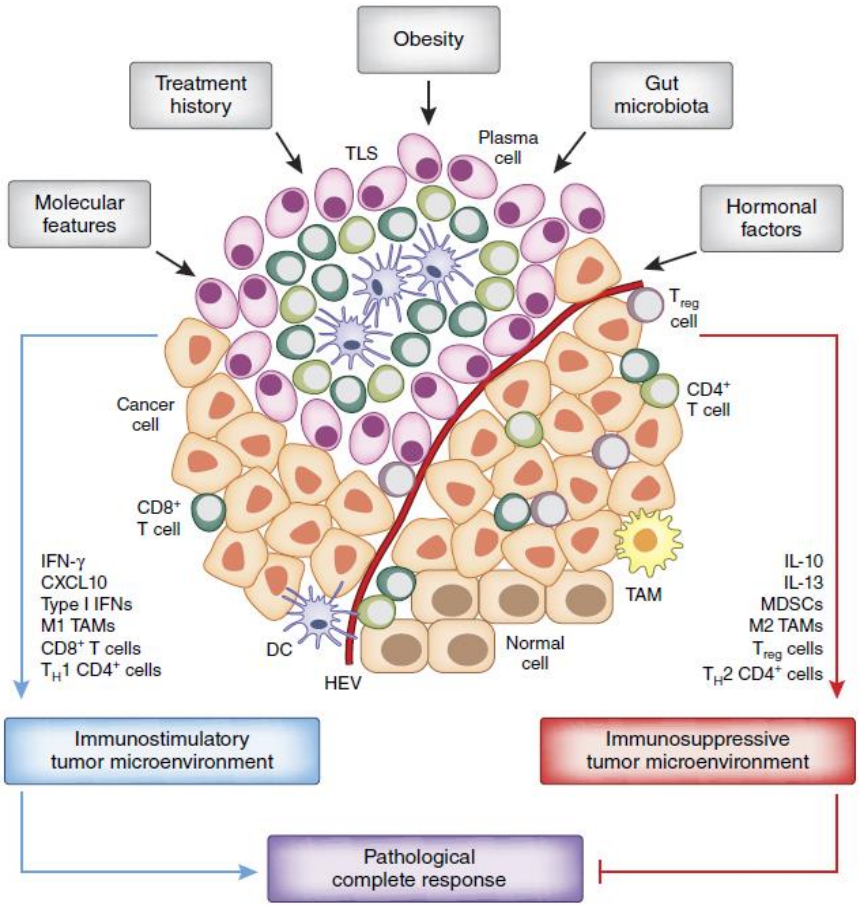


Figure 2 Facteurs influençant la réponse immunitaire dans les cancers du sein. Tirée de Kroemer et al. Nature, 2015 (Kroemer et al., 2015)

Infiltrat lymphocytaire

L'infiltrat lymphocytaire correspond à la présence de cellules appartenant au système immunitaire, les lymphocytes, à l'intérieur de la tumeur ou dans le stroma péri tumoral. Il est un reflet de l'activité immunitaire locale.

Un groupe de travail international a établi des recommandations, visant à uniformiser les méthodologies et augmenter la comparabilité des études. Ils préconisent de mesurer l'infiltrat lymphocytaire dans le stroma péri tumoral, sur une lame avec une coloration standard Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) (Salgado et al., 2015a). Il peut également être mesuré en intra tumoral. Dans les différentes études, les deux valeurs étaient corrélées (Denkert et al.,

2010)(Loi et al., 2013). Toutefois la mesure dans le stroma était plus fiable car moins soumise à une variabilité inter observateur (Denkert et al., 2015) (Denkert et al., 2010)(Loi et al., 2014)(Salgado et al., 2015b).

Effet prédictif de la réponse au traitement néoadjuvant

La première étude de grande envergure étudiant l'association entre l'infiltrat lymphocytaire et la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante était celle de *Denkert et al*. en 2010. Les auteurs ont étudié l'infiltrat lymphocytaire chez 1058 patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante. Les taux élevés d'infiltrat lymphocytaire étaient associées à des taux de réponse histologique complète supérieurs. Cette relation était linéaire avec un Odds Ratio (OR) maximal de 13,39 (IC95% 6,1-29,37 ; p<0,0005) en cas de TILs supérieurs à 60% (Denkert et al., 2010).

Plusieurs études ont confirmé par la suite cette association entre l'infiltrat lymphocytaire et la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante. *Mao et al*. ont réalisé une méta-analyse portant sur 13 études, regroupant 3251 patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante, associé éventuellement à du *trastuzumab*. L'analyse combinée retrouvait une association entre un infiltrat lymphocytaire important pré traitement et une réponse histologique complète (RHC) (OR=3,93, IC95% : 3,26–4,73, p<0,001), qu'il soit intra tumoral (p<0,001), stromal (p<0,001) ou sur les deux sites (p<0,001). En analyse multivariée l'infiltrat lymphocytaire restait un marqueur indépendant de RHC (OR=1,41, IC95%: 1,19–1,66).

L'effet prédictif des TILs était plus important dans la population triple négative (OR=2,49, IC95%: 1,61–3,83, p<0,001) et *HER2*-positif (OR=5,05, IC95% : 2,86–8,92, p<0,001). (Mao et al. 2014).

Effet pronostique de l'infiltrat lymphocytaire

L'infiltrat lymphocytaire était également associé à la survie dans plusieurs études.

Dieci et al. ont analysé l'infiltrat lymphocytaire post traitement dans 278 tumeurs triples négatives traitées par chimiothérapie néoadjuvante. Un taux élevé de TILs était associé à une meilleure survie sans récidive (HR 0,86, IC95% 0,77-0,96, p=0,01) et survie globale (HR 0,86, IC95% 0,77–0,97, p=0,01) (Dieci et al., 2014).

Cet effet était plus marqué dans les sous types triples négatifs et *HER2*-positifs (Loi et al., 2013)(Loi et al., 2014)(Dieci et al., 2015)(Ono et al., 2012).

Les résultats de différentes études publiées sur l'impact prédictif et/ou pronostique de l'infiltrat lymphocytaire dans des essais néoadjuvants, en particulier dans le sous type *HER2*-positif, sont regroupés dans l'Annexe 1.

Sous types lymphocytaires

Certaines études ont approfondi l'analyse de l'infiltrat lymphocytaire en réalisant une caractérisation immunohistochimique des lymphocytes présents, en utilisant notamment un immuno marquage FOXP3 pour identifier les lymphocytes T régulateurs, et un marquage CD8 pour identifier les lymphocytes cytotoxiques.

Un taux élevé de CD8 était significativement associé à un meilleur pronostic (Ali et al., 2014)(Mahmoud et al., 2011)(Mahmoud et al., 2012), et une meilleure réponse au traitement (Seo et al., 2013).

L'impact pronostique des lymphocytes T reg était variable en fonction des études (West et al., 2013)(Gobert et al., 2009).

Dans l'étude de *Ladoire et al*, un rapport CD8/FOXP3 élevé, soit un taux élevé de CD8 associé à un taux faible de FOXP3, était associé à une meilleure réponse au traitement (HR de RHC=6,28 (2.42–16.27) et $p < 0,0001$) et une meilleure survie sans récidive ($p < 0,0001$) (Ladoire et al., 2011a).

La méta analyse de *Mao et al*., mettait en évidence une association entre des taux élevés de CD8+ et de FOXP3+, et la réponse histologique au traitement néo adjuvant (OR=6,44, IC95% : 2,52–16,46 et OR=52,94, IC95% : 1,05–8,26) (Mao et al., 2014).

Seuils prédictifs et pronostiques associés à l'infiltrat lymphocytaire

Plusieurs études ont retrouvé un lien linéaire entre l'infiltrat lymphocytaire et la réponse au traitement d'une part, et la survie d'autre part, posant ainsi le problème pragmatique du seuil optimal à adopter. La notion de « LPBC » (Lymphocyte predominant breast cancer) regroupe les tumeurs ayant un infiltrat lymphocytaire riche. Le seuil choisi pour définir cet infiltrat était variable en fonction des études. Dans la majorité des cas, le seuil était choisi de façon arbitraire et prédéfini, comme supérieur ou égal à 50 ou 60% (Salgado et al., 2015b)(Dieci et al., 2014) (Denkert et al., 2015). La fréquence de ce sous-groupe était d'environ 10% (Salgado et al., 2015b)(Dieci et al., 2014), sauf dans l'étude de *Denkert et al* où elle était de 24,5% (Denkert et

al., 2015). Dans ces études les LPBC étaient associés à une meilleure réponse histologique au traitement néoadjuvant et une meilleure survie (Denkert et al., 2015) (Denkert et al., 2010).

Liu et al ont recherché le seuil le plus discriminant d'infiltrat lymphocytaire parmi 116 tumeurs *HER2*-positif. Les TILS étaient évalués sur la biopsie précédant un traitement adjuvant par chimiothérapie et *trastuzumab*. Ils ont déterminé, à l'aide de courbes ROC, qu'un seuil TILs de 30 % était le plus discriminant. Les TILs supérieurs à 30% étaient associés à une meilleure réponse histologique au traitement néoadjuvant (OR=5.23 ; p= 0.001), et à une meilleure survie pour les patientes n'étant pas en réponse complète (Liu et al., 2015).

Les différents seuils et leur association avec le taux de réponse histologique complète dans plusieurs études sont illustrés dans la Figure 3.

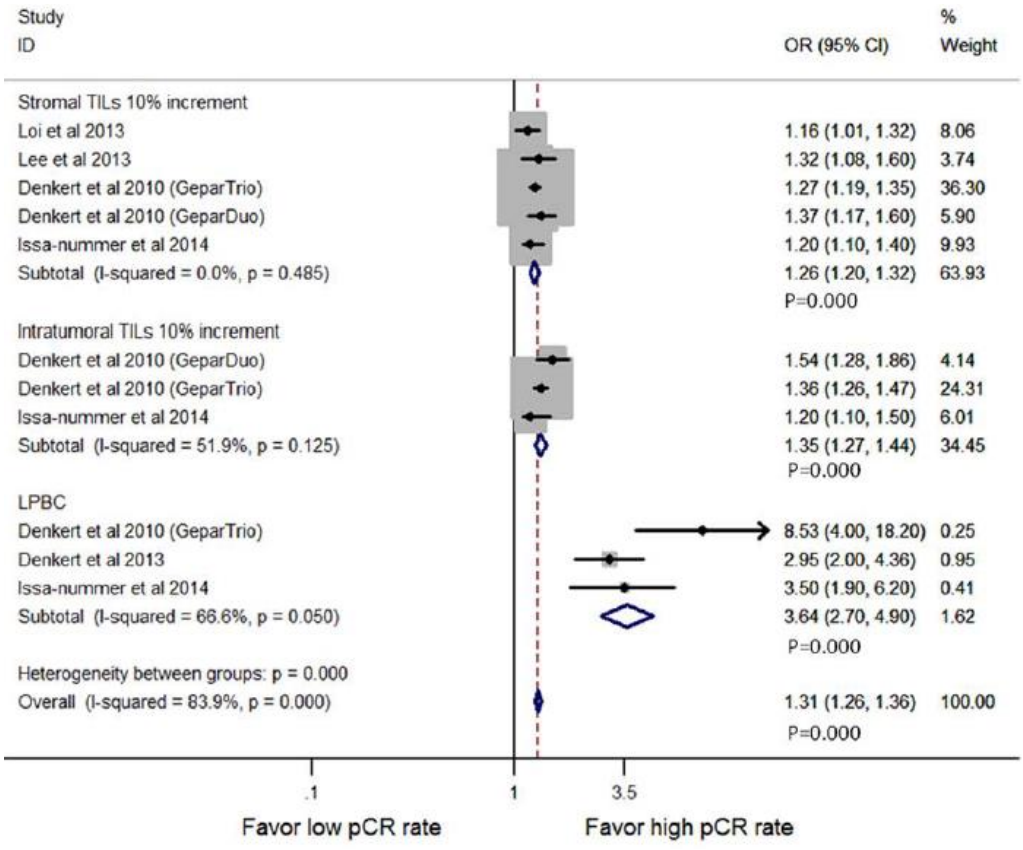


Figure 3 Réponse histologique complète en fonction du seuil de TILs utilisé. Tiré de *Mao et al.* (Mao et al., 2014)

Interactions entre chimiothérapie et système immunitaire

Depuis plusieurs années, des interactions complexes entre la chimiothérapie et le système immunitaire ont été mises en évidence.

Plusieurs études ont montré un lien entre un infiltrat lymphocytaire important, et l'efficacité de la chimiothérapie (Denkert et al., 2010)(Dieci et al., 2014).

Certains types de chimiothérapies, entrainant une mort cellulaire « immunogénique », seraient responsables d'une activation du système immunitaire plus importantes que d'autres.

La lyse cellulaire, entrainée par l'effet cytotoxique direct de la chimiothérapie, provoque la libération de molécules, notamment les interférons de type 1, la calréticuline, l'ATP ou HMGB1 (high mobility group box 1) et d'antigènes qui activent les cellules dendritiques. Ces cellules dendritiques actives présentent les antigènes tumoraux aux lymphocytes naïfs, entrainant leur maturation (Apetoh et al., 2007)(Rovere-Querini and Castiglioni, 2008)(Kroemer et al., 2015). Cette activation de l'immunité acquise pourrait être responsable d'une activité anti-tumorale à long terme.

Interactions entre *trastuzumab* et système immunitaire

L'efficacité du traitement par anticorps monoclonaux anti *HER2* dépend à la fois de l'immunité innée et de l'immunité acquise (Park et al., 2010). Il agit comme un anticorps de l'organisme, grâce à sa portion IgG1. Plusieurs mécanismes d'action du *trastuzumab* ont été mis en évidence. Ils sont illustrés par la Figure 4.

- Le *trastuzumab* se fixe à la région extracellulaire de la protéine membranaire *HER2*. Cette liaison entraîne l'internalisation des récepteurs *HER2*, empêche leur activité kinase en bloquant leur dimérisation, et conduit à la formation de tétramères de la protéine *HER2* qui sont inactives
- Un des mécanismes utilise la voie de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Elle correspond à l'identification du fragment Fc de l'anticorps (ici le *trastuzumab)* par le récepteur Fc *(*RFc) des lymphocytes Natural Killers (NK) et des macrophages, qui détruisent alors la cellule (Kute et al., 2009)(Gennari et al., 2004).
- Un autre est celui de la cytotoxicité dépendante du complément, avec une activation de la voir du complément par le complexe anticorps-antigène (ici le *trastuzumab* lié au récepteur *HER2)*
- Il perturbe des signaux intra cellulaires des cellules sur lequel il est fixé, diminue la réparation de l'ADN et l'angiogenèse(Spector and Blackwell, 2009).
- Le *trastuzumab* active également l'immunité acquise, en recrutant des lymphocytes, notamment CD8.

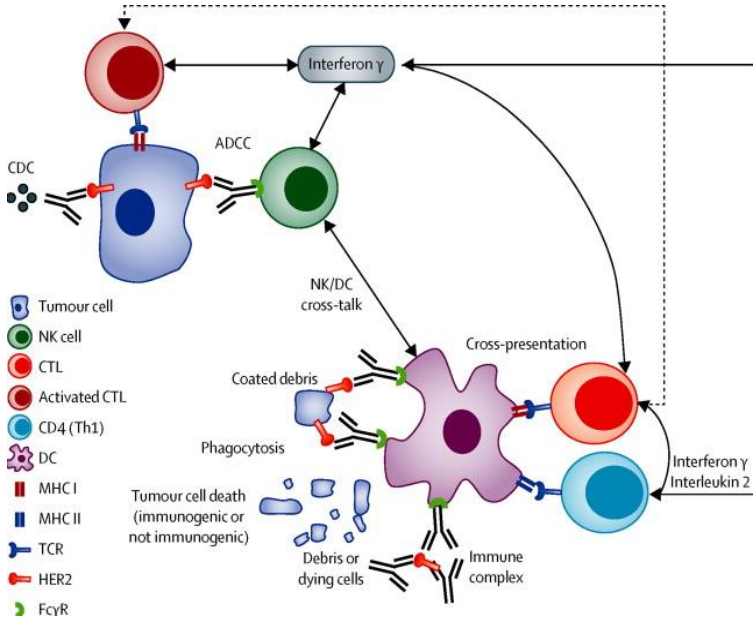


Figure 4 Interactions entre les anticorps anti *HER2* et le système immunitaire (Tirée de *Bianchini et al*, The Lancet oncology, 2014). ADCC = cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps. CDC = cytotoxicité dépendante du complément. CTL = lymphocyte T cytotoxique. DC= cellule dendritique. FcγR = récepeteur Fcγ. NK=natural killer. TCR= recepteur lymphocytes T. Th1= lymphocytes T auxiliaires 1 (T helper)

En cas de traitement néoadjuvant par *trastuzumab* seul, une réponse histologique complète ou importante était associée à un infiltrat lymphocytaire plus abondant (Gennari et al., 2004) et à une diminution du taux plasmatique de lymphocytes T reg (Perez et al., 2007). Les résultats étaient similaires en cas de traitement combiné par *trastuzumab* et chimiothérapie (Perez et al., 2007)(Loi et al., 2014).

L'association du *trastuzumab* à d'autres thérapies ciblées pourrait permettre d'augmenter l'efficacité du *trastuzumab* et de diminuer les résistances au traitement. Il est notamment utilisé en association avec l'hormonothérapie, le pertuzumab (un inhibiteur de la dimérisation de *HER2*), et le lapatinib (un inhibiteur tyrosine kinase des récepteurs *HER1/HER2*). Dans l'étude de *Salgado et al*, l'impact pronostique de l'infiltrat lymphocytaire était indépendant du type de thérapie ciblée (*trastuzumab*, lapatinib ou combinaison des deux) (Salgado et al., 2015b).

II. Matériels et méthodes

II.1 Population étudiée

Nous avons mené une analyse rétrospective parmi une cohorte de patientes prises en charge pour un cancer du sein *HER2*-positif, à l'institut Curie entre 2002 et 2012 (cohorte NEOREP, déclaration CNIL 1547270).

Nous n'avons inclus que les patientes ayant une tumeur initiale T1–3NxM0, unilatérale, non inflammatoire, non métastatique, sans atteinte de la peau ou de la paroi thoracique.

La séquence de traitement reçu était la suivante :

- Toutes les patientes ont eu une biopsie avant l'instauration du traitement.
- Elles ont ensuite reçu un traitement par chimiothérapie néoadjuvante (en majorité, traitement séquentiel anthracyclines puis taxanes) associé éventuellement à une thérapie ciblée par *trastuzumab*.
- Une chirurgie, conservatrice ou non, était pratiquée 4 à 6 semaines après la fin de la chimiothérapie.
- Une radiothérapie complémentaire était réalisée si indiquée.
- Les patientes ont eu en grande majorité un traitement adjuvant par *trastuzumab*, poursuivi pendant un an.
- Certaines patientes ont eu une chimiothérapie adjuvante complémentaire, en fonction de l'avis de la réunion de concertation pluridisciplinaire.

II.2 Objectifs

L'objectif de cette étude était de rechercher les corrélations entre l'infiltrat lymphocytaire et la réponse histologique complète (RHC) et la survie sans récidive (SSR), chez des patientes atteintes de cancer du sein *HER2*-positif, traité par chimiothérapie néoadjuvante +/- *trastuzumab*.

II.3 Anatomopathologie

Les critères suivant ont été recueillis : type de tumeur, taille tumorale, grade histopronostique selon Eston et Ellis, présence de récepteurs aux estrogènes (RE), de récepteurs à la progestérone (RP), statut *HER2*, statut ganglionnaire avec nombre de ganglion métastatiques / non métastatiques et sentinelles / non sentinelles.

L'expression des récepteurs hormonaux était évaluée par une méthode immunohistochimique : réhydratation et restauration antigénique sur tampon citrate (10 mM, pH 6,1), puis mise en contact avec les anticorps RE (clone 6F11, Novocastra, Leica Biosystems, Newcastle, UK; 1/200) et RP (clone 1A6, Novocastra, 1/200). Le marquage était révélé en utilisant le Vectastain Elite ABC peroxidase mouse IgG kit (Vector, Burlingame, CA, USA) avec du diaminobenzidine comme chromogène (Dako A/S, Glostrup, Denmark). Des contrôles positifs et négatifs étaient réalisés à chaque fois. La lésion était considérée comme positive lorsque plus de 10% des cellules tumorales étaient marquées par cette méthode. Les patientes ont été considérées comme ayant des récepteurs hormonaux (RH) positif si RE et/ou RP étaient positifs. Elles étaient donc considérées comme RH négatif si RE et RP étaient tous les deux négatifs.

Le statut *HER2* était également évalué par immunohistochimie, associée si besoin à une technique d'hybridation in situ, selon les recommandations de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) (*Wolff et al,* 2013). Il était considéré comme positif (+++) s'il y avait un marquage membranaire complet et fort dans plus de 10% des cellules tumorales. Il était considéré comme équivoque (++) si le marquage était complet et fort dans moins de 10% des cellules tumorales, complet et modéré dans plus de 10% des cellules, ou incomplet et fort dans plus de 10% des cellules. Dans ce cas il était complété par une technique d'hybridation in situ. La surexpression était définie par le rapport du nombre de copies d'*HER2* sur le nombre de centromère du chromosome 17 supérieur à 2, ou la présence de plus de 4 copies d'*HER2*.

Evaluation de la réponse tumorale

Toutes les lames des pièces d'exérèse chirurgicale après chimiothérapie néoadjuvante ont été relues. Une réponse histologique complète après chimiothérapie néoadjuvante était définie par l'absence de cancer résiduel invasif, au niveau mammaire et ganglionnaire (ypT0/is, ypN0). Un cancer in situ isolé était considéré comme une réponse histologique complète.

En cas de persistance d'une lésion résiduelle, les critères suivants ont été recherchés : taille de la lésion résiduelle, pourcentage de cellules cancéreuses, index mitotique, pourcentage de lésion in situ, nombre de ganglions métastatiques et taille de la plus grande métastase ganglionnaire.

Le Residual Cancer Burden (RCB) a été calculé à l'aide du calculateur du MD Anderson, accessible en ligne à l'adresse suivante : http://www.mdanderson.org/breastcancer_RCB

Quantification de l'infiltrat lymphocytaire

La quantification de l'infiltrat lymphocytaire a été réalisée par la même anatomopathologiste de l'Institut Curie (Dr Laé), en suivant les recommandations internationales (Salgado et al., 2015). Elle était réalisée en aveugle des données de réponse histologique et de survie.

Elle a été effectuée sur des lames avec la coloration standard Hématoxyline-Eosine-Safran (HES). L'infiltrat lymphocytaire intra tumoral (IT TILs) était défini comme le pourcentage moyen de surface tumorale occupée par les cellules mononuclées inflammatoires (lymphocytes, plasmocytes). L'infiltrat lymphocytaire du stroma (str TILs) était défini comme le pourcentage moyen de stroma occupé par les cellules mononuclées inflammatoires (lymphocytes, plasmocytes). Aucun immuno marquage complémentaire n'a été réalisé.

Nous avons défini la variation dynamique de l'infiltrat lymphocytaire comme la variation du taux d'infiltrat lymphocytaire entre la biopsie pré traitement et la pièce opératoire post traitement. Cette variation a été étudiée en tant que paramètre qualitatif (augmentation, stabilité ou diminution du taux de TILs) et quantitatif (modification de son taux en valeur absolue, et en valeur relative)

II.4 Analyse statistique

Analyse descriptive

La population était décrite en termes de fréquence pour les variables qualitatives, et de médiane avec l'écart associé pour les variables quantitatives.

Les associations entre les variables étaient recherchées par le test du Chi2 ou test de Fisher.

Les analyses concernant l'infiltrat lymphocytaire ont été réalisées avec différents seuils : en coupant à la médiane, en tertiles, en quartiles et 10%, et suivant les seuils déjà définis dans la littérature : 30% (Liu et al., 2015), 50%(Dieci et al., 2015)(Loi et al., 2013).

Une recherche de seuil était ensuite effectuée dans notre population pour déterminer le seuil le plus significativement associée à la réponse histologique complète et à la survie.

La comparaison des niveaux de TILs en fonction des variables clinico-pathologiques qualitatives a été réalisée avec un test ANOVA. La comparaison des niveaux de TILs en fonction des variables clinico-pathologiques quantitatives a été réalisée en calculant le coefficient de corrélation de Pearson.

Les différences de moyennes entre les valeurs initiales, et celles après traitement des variables suivantes : index mitotique, pourcentage de composante in situ de la tumeur, cellularité tumorale et TILs, ont été comparées par un t-test pour des échantillons appariés.

Analyse prédictive

L'analyse des facteurs de réponse à la chimiothérapie a été réalisée en utilisant un modèle de régression logistique. L'association entre la réponse histologique à la chimiothérapie néoadjuvante, et les différentes variables étaient quantifiées par régression logistique avec détermination d'un Odds Ratio (OR) et son intervalle de confiance à 95% (95%IC).

Une analyse multivariée a également été réalisée, en prenant en compte les variables ayant un p inférieur à 0,10 en analyse univariée grâce à une procédure pas-a-pas ascendante.

Survie sans récidive et survie globale

La survie sans récidive était définie comme la durée entre la chirurgie et la survenue du décès, d'une récidive loco-régionale ou d'une récidive métastatique. En cas d'absence de survenue d'évènement, les patients étaient censurés à la date de leur dernier contact.

Les survies étaient estimées par la méthode de Kaplan-Meier, et les courbes de survie par le test du log-rank. Le calcul des hazard ratio et de leur intervalle de confiance à 95% était réalisé par modèle de Cox. Les variables ayant un p inférieur à 0,10 en analyse univariée ont été incluses dans le modèle multivarié. Une analyse multivariée a été réalisée en intégrant les variables par une analyse en pas à pas descendant.

Les analyses de survie globale n'ont pas été réalisées du fait du faible nombre d'évènements (n=3).

Le seuil de significativité était à 5%. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R, version3.1.2

III. Résultats

III.1 Caractéristiques clinico-pathologiques initiales des patientes

Les caractéristiques des patientes sont décrites dans le Tableau 1.

La cohorte était composée de 175 patientes ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante, la majorité par anthracyclines et taxanes (n=151, soit 86%). 97% des patientes ont reçu du *trastuzumab (n=170)*, 82% (n=144) en néoadjuvant et en adjuvant, et 15% (n=26) en adjuvant seul.

L'âge médian était de 47 ans (27-78 ans). La majorité des patientes n'était pas ménopausée (64,5%, n=109), et 10,6% (n=18) étaient obèses. 64,1 % des tumeurs étaient de stade T2 (n=109), et 26,5% (n=45) des patients avaient une atteinte axillaire clinique. La plupart des patientes avaient une lésion de grade 3 (70,2 %, n=118) et 40,2 % avaient des récepteurs hormonaux négatifs. 21,8% des biopsies comportaient une composante in situ.

L'index mitotique était significativement plus élevé dans le groupe des patientes traitées par *trastuzumab* néoadjuvant + adjuvant par rapport au groupe de traité en adjuvant seul (respectivement 37,6% contre 16% avec un index mitotique supérieur à 22, p=0,03).

Tableau 1 Caractéristiques initiales des patientes

Variable		***trastuzumab*** **adjuvant seul n (%)**	***trastuzumab*** **neoadjuvant + adjuvant n (%)**	**Total n (%)**	**p**
Age	<45	13 (50.0%)	67 (46.5%)	80 (47.1%)	0,4092
	45-55	9 (34.6%)	38 (26.4%)	47 (27.6%)	
	> 55	4 (15.4%)	39 (27.1%)	43 (25.3%)	
Statut **ménopausique**	Ménopausée	9 (36.0%)	51 (35.4%)	60 (35.5%)	0,9551
	Non ménopausée	16 (64.0%)	93 (64.6%)	109 (64.5%)	
Obésité	non	24 (92.3%)	128 (88.9%)	152 (89.4%)	1
	oui	2 (7.7%)	16 (11.1%)	18 (10.6%)	
Taille tumorale	T1	1 (3.8%)	8 (5.6%)	9 (5.3%)	0,1732
	T2	13 (50.0%)	96 (66.7%)	109 (64.1%)	
	T3	12 (46.2%)	40 (27.8%)	52 (30.6%)	
Atteinte ganglionnaire	N-	6 (23.1%)	55 (38.2%)	61 (35.9%)	0,1391
	N+	20 (76.9%)	89 (61.8%)	109 (64%)	
Index mitotique	≤ 22	21 (84.0%)	88 (62.4%)	109 (66%)	**0,0362**
	>22	4 (16.0%)	53 (37.6%)	57 (34.3%)	
Grade	I-II	9 (36.0%)	41 (28.7%)	50 (29.8%)	0,4597

Variable		*trastuzumab* adjuvant seul n (%)	*trastuzumab* neoadjuvant + adjuvant n (%)	Total n (%)	p
	III	16 (64.0%)	102 (71.3%)	118 (70.2%)	
Récepteurs hormonaux	RH négatif	10 (40.0%)	58 (40.3%)	68 (40.2%)	0,9791
	RH positif	15 (60.0%)	86 (59.7%)	101 (59.8%)	
Type de chimiothérapie	Anthracyclines seules	1 (4.2%)	1 (0.7%)	2 (1.2%)	0,1157
	Anthracyclines-taxanes	23 (95.8%)	128 (90.1%)	151 (91.0%)	
	Taxanes seuls	0 (0.0%)	13 (9.2%)	13 (7.8%)	

Nombre de données non connues : statut ménopausique 1 (0.6%), index mitotique 64 (36.6%), grade histopronostique 3 (1.7%), récepteurs hormonaux 1 (0.6%), type de chimiothérapie 4 (2.3%).

Infiltrat lymphocytaire initial

L'infiltrat lymphocytaire occupait de 1 à 60% de la surface intra tumorale, avec une médiane de 15% ; et de 2 à 70% du stroma avec une médiane de 25%.

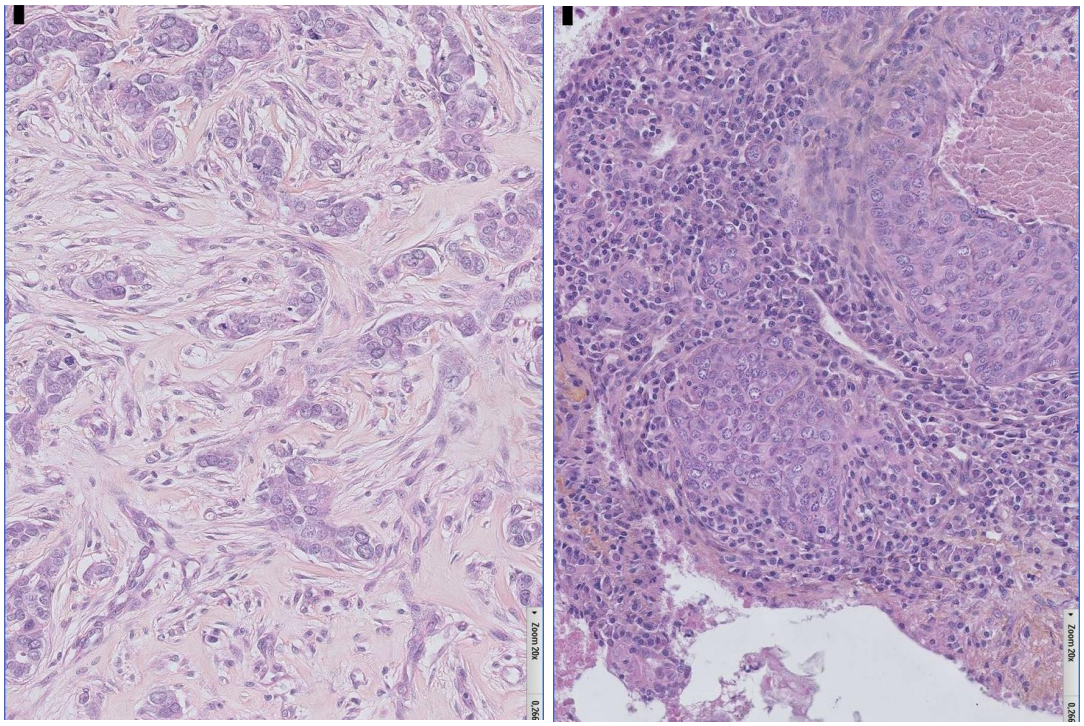


Figure 5 a et b : Exemples d'infiltrat lymphocytaire : image de gauche : tumeur pauvre en infiltrat lymphocytaire ; image de droite : tumeur riche en infiltrat lymphocytaire.

Les infiltrats lymphocytaires du stroma et intra tumoraux étaient fortement corrélés (coefficient de corrélation de Pearson 0,93 [91,6-95,3%], $p<10^{-16}$) (Figure 6).

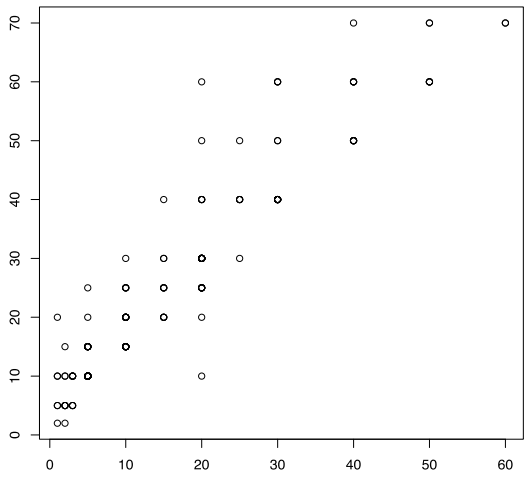


Figure 6 Corrélation entre infiltrat lymphocytaire intra tumoral (en abscisse) et stromal (en ordonnée)

L'infiltrat lymphocytaire était significativement plus important dans les tumeurs avec un statut négatif pour les récepteurs aux estrogènes (RE), aussi bien en intra-tumoral (20% si RE négatif contre 14% si RE positif, p=0,002), que stromal (31% si RE négatif contre 23% si RE positif, p=0,002) (Figure 7a et b).

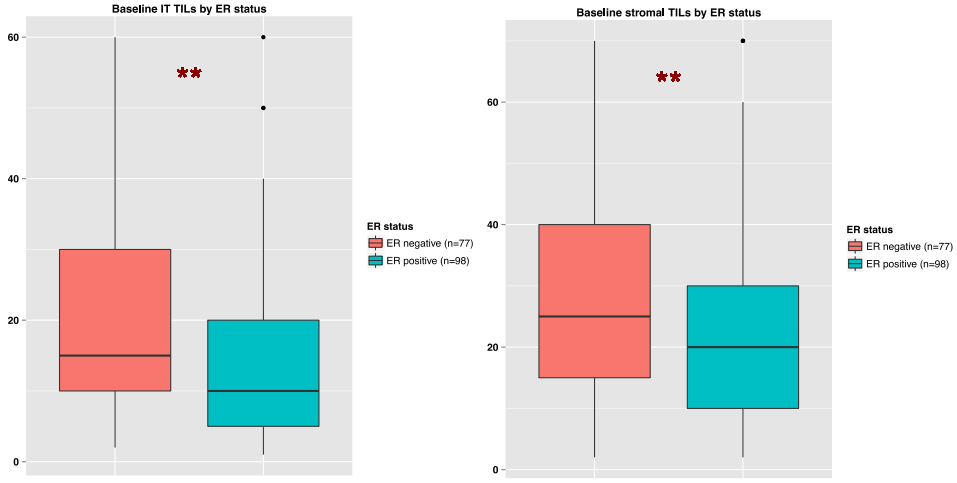


Figure 7 a et b Infiltrat lymphocytaire en fonction du statut hormonal (intra tumoral à gauche, stromal à droite)

III.2 Caractéristiques clinico-pathologiques des patientes après chimiothérapie néoadjuvante

La chimiothérapie néoadjuvante était associée à une diminution de l'index mitotique (8,4 contre 19,4 avant la chimiothérapie, p<0.001), et de la cellularité tumorale (16,3% contre 64,9%, p<0.001). Inversement, le nombre de patientes ayant une composante in situ a augmenté (56.6%

des patientes contre 21,8% initialement), et l'importance du secteur in situ également (39.1% de la zone tumorale en post chimiothérapie contre 3.8% avant chimiothérapie, p<0.001).

Les patientes traitées par *trastuzumab* néoadjuvant + adjuvant avaient un taux de réponse histologique complète supérieur (42,4% contre 15,4% en cas de traitement par *trastuzumab* adjuvant seul, p=0,009). Elles avaient également moins de métastase ganglionnaire résiduelle (21,5% contre 53,8% respectivement). Elles avaient également moins fréquemment eu une chimiothérapie adjuvante complémentaire (10,4% contre 53,8% respectivement, p<0,001).

Infiltrat lymphocytaire après traitement

Par définition l'infiltrat lymphocytaire intra tumoral ne pouvait être évalué que chez les patientes ayant un résidu tumoral.

Après chimiothérapie néoadjuvante, l'infiltrat lymphocytaire stromal avait diminué dans 77,7% des cas (n=136), était resté stable dans 10.3% des cas (n=18), et avait augmenté dans 12.0% des cas (n=21).

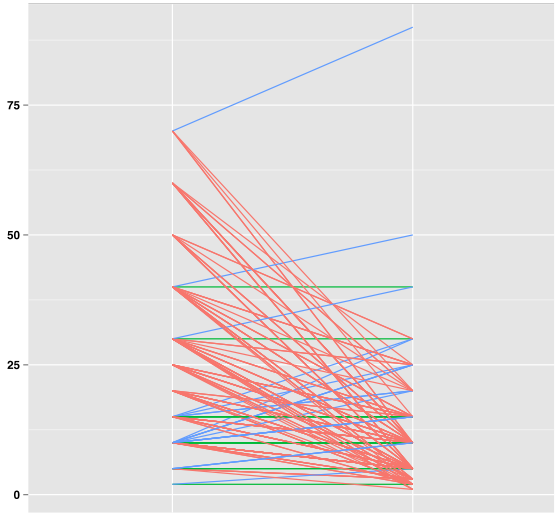


Figure 8 Variation du taux de TILs avant et après chimiothérapie (pourcentage de TILs stromaux initial à gauche ; et après traitement à droite)

Le pourcentage moyen de IT TILs était de 7,8% après traitement contre 16.5% avant le traitement néoadjuvant (p<0.001). Celui de str TILs était de 10,9% contre 26,4% avant traitement (p<0,001).

L'infiltrat lymphocytaire stromal après chimiothérapie était corrélé positivement à l'index mitotique (r=0,357 ; IC95% : 0,172-0,518 ; p<0,001), à la cellularité tumorale post chimiothérapie (r=0,492 ; IC95% : 0,37-0,597 ; p<0,001), à la taille de la plus importante

métastase ganglionnaire (r=0,58 ; IC95% : 0,351-0,743, p<0,001), et au score RCB (r=0.429, IC95% 0,299-0,543 ; p<0,001). Les résultats étaient similaires pour les TILs intra tumoraux.

III.3 Réponse histologique

Une réponse histologique complète (RHC) après chimiothérapie néoadjuvante a été obtenue pour 68 patientes (39%).

En **analyse univariée**, les facteurs associés à une réponse histologique complète étaient l'âge supérieur à 55 ans (p<0,001), le statut ménopausique (p=0,009), la taille tumorale (p=0,048), le statut RE (p= 0,002) et RP (p< 0,001) (Tableau 2).

Tableau 2 Analyse univariée des facteurs clinico pathologiques classiques associés à la RHC

		Total (n)	RHC (n)	RHC (%)	OR	IC95%	p
Age	<45	82	16	19.5 %	1		
	45-55	49	18	36.7 %	1,49	0.7-3.17	0,301
	> 55	44	27	61.4 %	4,07	1.9-9	**<0,001**
Statut ménopausique	Ménopausées	61	32	52.5 %	1		
	Non ménopausées	113	36	31.9 %	0,42	0.22-0.8	**0,009**
Taille tumorale	T1	10	7	70 %	1		
	T2	113	43	38.1 %	0,26	0.05-1	**0,063**
	T3	52	18	34.6 %	0,23	0.04-0.92	**0,048**
Atteinte ganglionnaire initiale	N0	62	25	40.3 %	1		
	N1-N2-N3	113	43	38.1 %	0,91	0.48-1.72	0,768
Index mitotique	≤22	111	42	37.8 %	1		
	>22	59	22	37.3 %	0,98	0.5-1.87	0,944
Grade histopronostique	Grade I-II	51	20	39.2 %	1		
	Grade III	121	46	38 %	0,95	0.49-1.88	0,883
Ki67	< 20	3	2	66.7 %	1		
	≥ 20	18	7	38.9 %	0,32	0.01-3.94	0,384
RE	RE -	77	40	51.9 %	1		
	RE +	98	28	28.6 %	0,37	0.2-0.69	**0,002**
RP	RP -	111	57	51.4 %	1		
	RP +	59	11	18.6 %	0,22	0.1-0.45	**<0.001**

En utilisant les seuils déjà existants dans la littérature (30 et 50%, médiane, tertiles, quartiles, classes de 10%), nous n'avons pas retrouvé d'association significative entre l'infiltrat lymphocytaire initial, qu'il soit intra tumoral ou stromal, et la RHC, (

Annexe 2).

Etant donnée l'absence de résultats significatifs avec les seuils déjà pré-établis, nous avons recherché le seuil de TILS associé à la RHC avec la plus haute significativité statistique (soit la valeur la plus basse de la valeur p d'association).

Nous avons mis en évidence qu'un seuil de 2% des IT TILs était significativement associé avec la RHC (7,1% de RHC pour les IT TILs initiaux inférieurs à 2% contre 41,6% pour les IT TILs initiaux > 2%, p=0,02) (Figure 9).

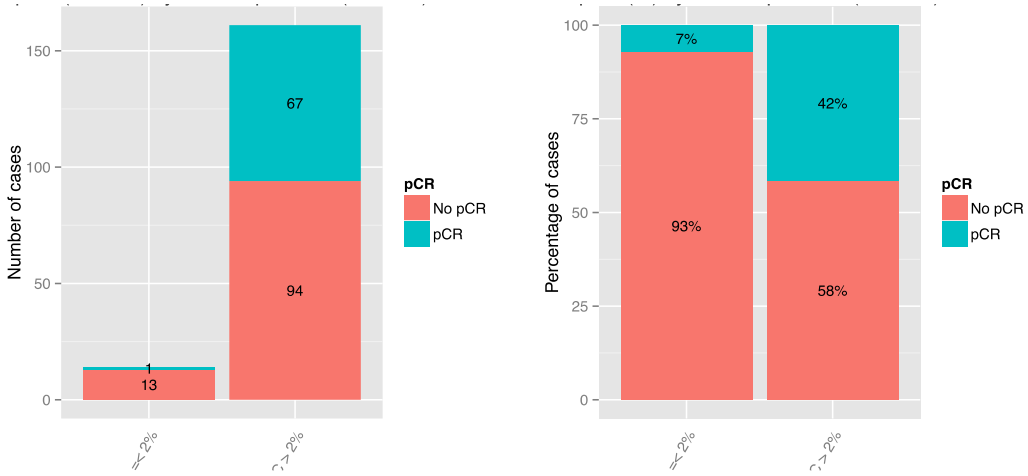


Figure 9 Taux de RHC (pCR) en fonction du taux de IT TILS initial <2% ou >2%

Nous n'avons pas retrouvé d'association significative entre les TILS du stroma et la RHC.

En **analyse multivariée**, le taux initial d'infiltrat lymphocytaire était associé de façon indépendante à la RHC (IT TILs >2% : OR=8.24 ; IC95% : 1,46-155,34 ; p=0,05), ainsi que l'utilisation de *trastuzumab* en néoadjuvant (OR=4,18 ; IC95% 1,41-15,52 ; p=0.017), et le statut du RP (RP + : OR=0,22 ; IC95% : 0,1-0,46 ; p<0,001). Les résultats sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3 Analyse multivariée des facteurs associés de façon indépendante à la RHC

		OR	IC95%	p
Récepteurs à la progestérone	négatifs	1		
	positifs	0.22	0,1-0,46	**<0.001**
***Trastuzumab* néoadjuvant**	non	1		
	oui	4.18	1,41–15,52	**0.017**

		OR	IC95%	p
IT TILs avant traitement	≤ 2%	1		
	> 2%	8.24	1,46-155,34	**0.05**

III.4 Survie sans récidive

Le suivi médian était de 38,8 mois [intervalle : 5,5 - 91,7], pendant lesquels 18 patientes ont récidivé (10%). Une seule de ces patientes était dans le groupe « réponse histologique complète ».

En analyse univariée les facteurs clinico-pathologiques initiaux associés à la survie sans récidive étaient un IMC supérieur à 25 (p=0,007) et un grade histologique élevé (grade III) (p=0,011). Les critères clinico-pathologiques après traitement associés à une meilleure survie sans récidive étaient un index mitotique et une cellularité tumorale faibles (p<0,001 et p=0,001 respectivement), une composante in situ inférieure à 22,5% (p=0,001), une réponse histologique complète (p=0,004), un résidu tumoral inférieur à 2,8mm (p=0,003) ainsi que le score de résidu tumoral RCB (p=0,004).

Les résultats de l'analyse univariée sont dans le Tableau 4

Tableau 4 Analyse univariée des facteurs associés à la survie sans récidive

		Total (n)	Evenement (n)	HR	IC95%	p	P global
Age	<45	82	9	1			
	45-55	49	7	1,17	0,44-3,15	0,752	0,366
	> 55	44	2	0,4	0,09-1,84	0,238	
IMC	IMC<25	124	8	1			**0,007**
	IMC>25	51	10	3,37	1,33-8,57	0,011	
Taille tumorale	T1	10	0	1			
	T2	113	10	NA	NA	0,998	0,262
	T3	52	8	NA	NA	0,997	
Atteinte ganglionnaire initiale	N0	62	5	1			
	N1-N2-N3	113	13	1,35	0,48-3,8	0,569	0,567
Grade histopronosti-que initial	Grade I-II	51	10	1			**0,011**
	Grade III	121	8	0,32	0,13-0,81	0,017	
RE	RE -	77	8	1			0,808
	RE +	98	10	1,12	0,44-2,85	0,808	
RP	RP-	111	11	1			0,744

		Total (n)	Evenement (n)	HR	IC95%	p	P global
	RP +	59	5	0,84	0,29-2,41	0,744	
Index mitotique *	< 10%	144	9	1			**<0,001**
	≥ 10%	22	8	5,38	2,07-13,96	<0,001	
Cellularité tumorale *	≤ 5%	91	2	1			**0,001**
	> 5%	82	16	7,97	1,83-34,66	0,006	
Composante in situ *	<22.5%	109	6	1			**0,002**
	≥ 22.5%	64	12	4,06	1,52-10,82	0,005	
Taille de la tumeur résiduelle *	≤2,8mm	121	6	1			**0,003**
	> 2,8mm	52	12	3,89	1,46-10,39	0,007	
RHC *	non	107	17	1			**0,004**
	oui	68	1	0,09	0,01-0,7	0,021	
Score RCB *	0	68	1	1			**0,004**
	1	24	1	3,29	0,21-52,63	0,4	
	2	69	12	11,01	1,43-84,72	0,021	
	3	14	4	19,99	2,23-178,86	0,007	
IT TILS après traitement	≤ 10%	85	11	1			0,064
	> 10%	20	6	2,48	0,92-6,73	0,074	
str TILS après traitement	≤ 25%	166	14	1			**0,002**
	> 25%	9	4	5,05	1,66-15,36	0,004	

* Après traitement

De façon similaire à la réponse histologique, les TILs n'étaient pas significatifs en utilisant les seuils déjà publiés. Nous avons également réalisé une recherche de seuil. Seul les TILs stromaux après traitement avec un seuil de 25% étaient associés à la survie sans récidive, avec une association entre des TILS élevés après traitement et une survie altérée (HR=5,05 ; IC95% : 1,66-15,36, p=0,002) (Figure 10).

En analyse **multivariée**, les variables significativement associées à une diminution de la survie sans récidive étaient un IMC supérieur à 25 (HR=4,92, IC95% : 1,85-13,1 ; p=0,001), un grade histologique initial faible (grade III : HR=0,35, IC95% : 0,13-0,95 ; p=0,04), une cellularité post traitement élevée (HR=5,92, IC95% : 1,32-26,58 ; p=0,02), une composante in situ > 22,5% (HR=5,47, IC95% : 1,93-15,5 ; p=0,001), et un niveau de TILs stromaux post traitement >25% (HR=8,18, IC95% : 2,26-29,55 ; p=0,001).

Les résultats sont détaillés dans le Tableau 5

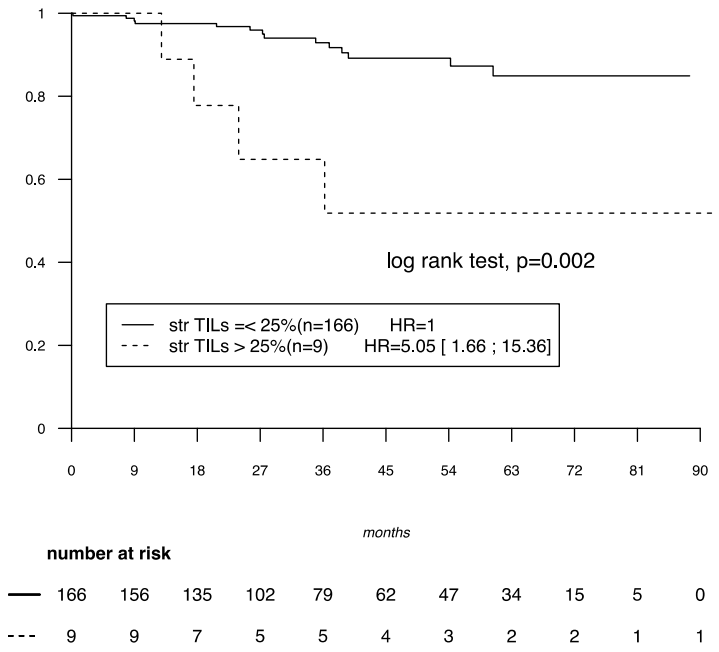


Figure 10 : Courbe de survie sans récidive en fonction des str TILs après chimiothérapie

Tableau 5 : Analyse multivariée des facteurs associés à la survie sans récidive

		HR	IC	p
IMC	≤25	1	-	-
	>25	4,92	1,85-13,1	**0,001**
Grade histopronostique	Grade I-II	1	-	-
	Grade III	0,35	0,13-0,95	**0,04**
Cellularité tumorale après traitement	<5%	1	-	-
	>5%	5,92	1,32-26,58	**0,02**
Composante in situ post traitement	<22.5%	1	-	-
	≥ 22.5%	5,47	1,93-15,5	**0,001**
Infiltrat lymphocytaire stromal post chimiothérapie	≤ 25%	1	-	-
	> 25%	8,18	2,26-29,55	**0,001**

Les analyses réalisées dans la population n'étant pas en réponse histologique complète après chimiothérapie chimiothérapie retrouvaient des résultats superposables, à l'exception de la cellularité tumorale qui n'était qui n'était pas associée à la survie sans récidive. Les résultats sont détaillés dans le

Tableau 6

Tableau 6 Analyse multivariée des facteurs associés à la survie sans récidive dans la population n'étant pas en réponse histologique complète

		HR	IC	p
IMC	≤25	1	-	-
	>25	7.77	2.68-22.56	**<0.001**
Grade histopronostique	Grade I-II	1	-	-
	Grade III	0.23	0.08-0.68	**0.008**
Composante in situ post traitement	<22.5%	1	-	-
	≥ 22.5%	5.48	1.9-15.82	**0.002**
Infiltrat lymphocytaire stromal post chimiothérapie	≤ 25%	1	-	-
	> 25%	11.04	2.98-40.81	**<0.001**

IV. Discussion

Sur une cohorte de 175 patientes prises en charge par chimiothérapie néoadjuvante pour un cancer du sein *HER2*-positif, nous avons mis en évidence que les TILs intra tumoraux avant traitement étaient prédictifs de la réponse à la chimiothérapie avec un seuil à 2%, et qu'un niveau de TILs stromaux après traitement supérieur à 25% était associé à une survie péjorative.

IV.1 Valeur prédictive de l'infiltrat lymphocytaire

L'infiltrat lymphocytaire avant traitement est un reflet de l'activation de l'immunité générée par les cellules tumorales. Dans notre étude, seuls les récepteurs hormonaux étaient associés aux niveaux d'infiltrat lymphocytaire. Les raisons pour lesquelles certaines tumeurs plutôt que d'autres sont capables de recruter les cellules immunitaires sont peu connues. Cette activation du système immunitaire est multifactorielle. Elle est liée la capacité de l'hôte à générer une immunité anti tumorale, intriquée avec certains facteurs extrinsèques au cancer tels que l'alimentation, le microbiote, le poids, l'influence hormonale (Kroemer et al., 2015). Elle est également liée à la capacité de la tumeur à déclencher la réponse immunitaire (aussi appelée immunogénicité), et à l'influence des traitements reçus.

Dans la littérature, l'infiltrat lymphocytaire était significativement plus important dans les tumeurs triples négatives et *HER2*-positif ; et en cas de récepteurs aux estrogènes et à la

progestérone négatifs (Dieci et al., 2015) (Loi et al., 2014) (Salgado et al., 2015b). Cette donnée pourrait correspondre à une immunogénicité plus importante de ces types de tumeurs.

L'infiltrat lymphocytaire intra tumoral initial (et non l'infiltrat stromal) était prédictif de réponse au traitement avec un seuil de 2%. Plusieurs études ont évalué l'intérêt des TILS avant traitement pour prédire la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante et sont concordantes sur l'association entre un infiltrat lymphocytaire important et un meilleur taux de réponse histologique complète. Cependant, les seuils utilisés sont variables d'une étude à l'autre.

Salgado et al. ont réalisé une étude rétrospective sur l'impact prédictif des TILs parmi 387 patientes ayant une tumeurs *HER2*-positif ayant participé à l'essai NeoALTTO. Elles avaient été traitées par chimiothérapie néoadjuvante associée à une thérapie ciblée (*trastuzumab, lapatinib* ou l'association des deux). Les auteurs retrouvaient un impact prédictif de la réponse à la chimiothérapie pour les TILs supérieurs à 5% (OR=2,60 ; IC95% : 1,26-5,39 ; p=0,01). Ils rapportaient également que les patientes avec un infiltrat lymphocytaire initial important avaient une meilleure survie, indépendamment de la réponse histologique (Salgado et al., 2015b).

Liu et al. se sont intéressés au seuil de TILs associé de façon la plus importante avec la RHC, à l'aide de courbes ROC, parmi une population de 116 patientes *HER2*-positif traitées par chimiothérapie et *trastuzumab* en situation néoadjuvante. Ils confirmaient le rôle prédictif de réponse au traitement des TILs avec un seuil de TILs à 30% (p=0,001)(Liu et al., 2015).

Ingold Heppner et al. ont étudié les TILs parmi une cohorte de 498 tumeurs *HER2*-positif appartenant aux études GeparQuattro et GeparQuinto. Les patientes avaient été traitées par chimiothérapie néoadjuvante associée à du *trastuzumab* (68,3%) ou du *lapatinib* (31,7%). En analyse multivariée, des TILs élevés étaient prédictifs de réponse au traitement, que le seuil soit de 10% (OR=1,12 ; IC95% : 1,02-1,24 ; p=0,018) ou de 60% (OR=2,08 ; IC95% 1,17-3,687 ; p=0,013)(Ingold Heppner et al., 2016).

Enfin, l'étude de *Denkert et al.* portait sur 580 patientes, dont 266 ayant une tumeur *HER2*-positif, traitées par chimiothérapie, *trastuzumab* et lapatinib en situation néoadjuvante dans le cadre de l'essai GeparSixto. Les auteurs retrouvaient un effet linéaire de l'impact prédictif des TILs (OR=1.22 ; IC95% : 1,14-1,31 ; p=0,001 pour chaque augmentation de 10%). Avec un seuil à 60%, l' OR pour la RCH était à 2,92 (p=0.001)(Denkert et al., 2015).

Du fait d'une plus grande variabilité concernant la lecture anatomopathologique du taux de TILs intra tumoraux d'une part (Denkert et al., 2015) (Denkert et al., 2010) (Loi et al., 2014) ; et de la corrélation retrouvée entre les TILS intra tumoraux et du stroma, plusieurs auteurs suggèrent de privilégier les TILS du stroma (Denkert et al., 2010) (Loi et al., 2013). Etant donnée l'absence de significativité des TILs du stroma, et le caractère significatif des TILS intra tumoraux dans notre étude, la lecture des deux composantes nous semble judicieuse tant que ces paramètres ne sont pas validés à plus grande échelle. Le fait que les TILs du stroma ne soient pas significatifs en analyse univariée pourrait être dû à un manque de puissance de notre étude.

IV.2 Valeur pronostique de l'infiltrat lymphocytaire

L'infiltrat lymphocytaire avant traitement a été mis en évidence comme un facteur de meilleur pronostic dans les cancer du sein triple négatif et *HER2*-positif (Loi et al., 2013)(Loi et al., 2014)(Adams et al., 2014). Une méta analyse réalisée en par *Mao et al*. portant sur 25 études regroupant 22964 patientes confirmait ces résultats. Ils retrouvaient une association entre un infiltrat lymphocytaire avant traitement élevé et une meilleure survie dans les cancers triples négatifs (SSR : HR=0,82 ; IC95% : 0,76–0,88) et *HER2*-positif (SSR : HR=0,90 ; IC95% : 0,82–0,99)(Mao et al., 2016).Dans notre étude nous n'avons pas mis en évidence une association significative entre l'infiltrat lymphocytaire avant traitement et la survie.

En revanche, nous nous sommes également intéressés à l'infiltrat lymphocytaire **après traitement** et à son impact pronostique. Nous avons retrouvé qu'un infiltrat lymphocytaire stromal supérieur à 25% était un facteur de mauvais pronostic indépendant dans notre étude.

Dans la littérature, l'impact pronostique de l'infiltrat lymphocytaire **après traitement** est moins étudié et conduit à des résultats plus variables.

García-Martínez et al ont réalisé une étude rétrospective portant sur une série de 121 patientes, dont 29 avaient une tumeur *HER2*-positif, traitées par chimiothérapie néoadjuvante associé à du *trastuzumab* néoadjuvant dans 14% des cas. Ils ont analysé les caractéristiques immunohistochimiques (CD3, CD4, CD8, CD20, CD68, Foxp3) de l'infiltrat lymphocytaire avant et après chimiothérapie. De façon similaire à notre étude, ils retrouvaient une moins bonne survie sans récidive en cas d'infiltrat lymphocytaire important dans la population n'étant pas

en RHC (p=0,006). Ce résultat demeurait significatif après ajustement sur la persistante de métastase ganglionnaire après traitement (p=0,02) (García-Martínez et al., 2014).

Au contraire, *Dieci et al*, ont étudié les TILs dans une population de 287 tumeurs triples négatives traitées par chimiothérapie néoadjuvante. Un infiltrat post traitement supérieur à 60% était associé à une meilleure survie sans récidive (HR 0,24, IC95% : 0,09–0,64, p=0,0019) et une meilleure survie globale (HR 0,19, IC95% : 0,06–0,61, p=0,0017). L'impact était plus important en cas de lésion résiduelle de plus de 2 cm ou N+ (HR 0,17, IC95% :0,04–0,69, p=0,005) (Dieci et al., 2014).

Ladoire et al ont analysé les TILs, avec réalisation d'une immunohistochimie, chez 162 patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante plus ou moins *trastuzumab*, dont 111 tumeurs *HER2*-positif. Un taux bas de T reg (caractérisés par un marquage FOXP3+) et un taux élevé de lymphocyte CD8 après chimiothérapie était associée à une meilleure survie sans récidive (p=0.036 et p <0.0001 respectivement) (Ladoire et al., 2011a).

Nous avons retrouvé dans notre population qu'un infiltrat lymphocytaire stromal post traitement élevé était associé à des facteurs de mauvais pronostic (index mitotique et cellularité tumorale élevés, score RCB plus élevé).

Une hypothèse pourrait être que les tumeurs ayant un index mitotique plus élevé du fait du maintien de leur prolifération et une cellularité plus importante seraient plus activatrices du système immunitaire. Cette association entre les tumeurs proliférantes et l'activation du système immunitaire a été mise en évidence par Nagalla et al. (Nagalla et al., 2013).

IV.3 Points forts et points faibles de l'étude

Un des points faibles de ce travail était le nombre relativement peu élevé de patientes et d'évènements, qui peut impacter la robustesse des résultats. La validité des seuils mis en évidence doit maintenant être effectuée sur une série indépendante.

Une double lecture des lames avec un calcul de corrélation aurait été intéressante pour augmenter la fiabilité de l'étude, étant donné le taux parfois faible de concordance entre les anatomopathologistes, notamment concernant l'infiltrat lymphocytaire intra tumoral (Loi et al., 2014). Cependant, la lecture de l'ensemble des lames par la même anatomopathologiste permet de limiter la variabilité interindividuelle.

Un des points fort de notre étude a été de s'intéresser à l'infiltrat lymphocytaire après traitement, qui est rarement recherché dans les essais de traitement néoadjuvant. Son impact pronostique doit maintenant être confirmé dans d'autres études.

Enfin, nous n'avons pas effectué d'identification des sous populations lymphocytaires au sein des TILs. Même si elle n'est pas recommandée en pratique quotidienne, son utilisation dans le domaine de la recherche pourrait permettre d'identifier quels sous types de lymphocytes sont à l'origine de ces changements dynamiques et lesquels pourraient être des facteurs pronostiques. Cependant, ces techniques sont coûteuses, en temps, en argent, et en matériel tumoral ; et les techniques de typage des sous populations ne sont pas encore standardisées.

A contrario, l'information quantitative, accessible de manière simple sur lame HES, et pouvant être effectuée en routine par n'importe quel anatomopathologiste selon des règles établies, semble à elle seule apporter une information prédictive et pronostique importante et doit être encouragée en pratique quotidienne.

V. Conclusion

Avec le développent des immunothérapies dans plusieurs types de cancer, il est prévisible que leur développement se poursuive dans le cancer du sein. Etant donné l'impact prédictif et pronostique de l'infiltrat lymphocytaire, leur mesure systématique en routine pour tous les cancers du sein doit être encouragée.

Avant traitement, nous avons retrouvé de façon concordante à la littérature que les tumeurs n'entrainant pas d'activation du système immunitaire répondaient moins à la chimiothérapie. Il parait nécessaire de rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques dans cette catégorie de patientes qui ne répondrait probablement pas ou peu aux immunothérapies reposant sur les inhibiteurs de checkpoint immunitaires. Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit pourraient également permettre d'identifier des facteurs mutationnels responsables de cette faible immunogénicité. En parallèle, des recherches sont nécessaires pour préciser l'influence des caractéristiques de l'hôte sur la réponse au traitement (notamment facteurs environnementaux, obésité, influence hormonale..).

L'association entre la diminution des TILs et la réponse au traitement, si elle est confirmée par d'autres études, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives. Une recherche précoce de la variation de l'infiltrat lymphocytaire en cours de chimiothérapie pourrait permettre d'identifier des patientes ne répondant pas au traitement, et de changer précocement de ligne de traitement dans l'objectif d'obtenir une réponse histologique complète.

L'identification d'une population n'ayant pas répondu à la chimiothérapie néoadjuvante et présentant un infiltrat lymphocytaire élevé après traitement, représentant un sous-groupe de mauvais pronostic, pourrait permettre leur inclusion dans des essais de seconde ligne de traitement, par exemple des immunothérapies reposant sur les checkpoint immunitaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Adams, S., Gray, R.J., Demaria, S., Goldstein, L., Perez, E.A., Shulman, L.N., Martino, S., Wang, M., Jones, V.E., Saphner, T.J., et al. (2014). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *32*, 2959–2966.

2. Ali, H.R., Provenzano, E., Dawson, S.-J., Blows, F.M., Liu, B., Shah, M., Earl, H.M., Poole, C.J., Hiller, L., Dunn, J.A., et al. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO *25*, 1536–1543.

3. Ali, H.R., Dariush, A., Provenzano, E., Bardwell, H., Abraham, J.E., Iddawela, M., Vallier, A.-L., Hiller, L., Dunn, J.A., Bowden, S.J., et al. (2016). Computational pathology of pre-treatment biopsies identifies lymphocyte density as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Breast Cancer Res. BCR *18*, 21.

4. Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., et al. (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. Nat. Med. *13*, 1050–1059.

5. Bear, H.D., Anderson, S., Smith, R.E., Geyer, C.E., Mamounas, E.P., Fisher, B., Brown, A.M., Robidoux, A., Margolese, R., Kahlenberg, M.S., et al. (2006). Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer:National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *24*, 2019–2027.

6. Bianchini, G., Pusztai, L., Pienkowski, T., Im, Y.-H., Bianchi, G.V., Tseng, L.-M., Liu, M.-C., Lluch, A., Galeota, E., Magazzù, D., et al. (2015). Immune modulation of pathologic complete response after neoadjuvant *HER2*-directed therapies in the NeoSphere trial. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO *26*, 2429–2436.

7. Binder-Foucard, F., Bossard, N., Delafosse, P., Belot, A., Woronoff, A.-S., Remontet, L., and (Francim), the F. network of cancer registries (2014). Cancer incidence and mortality in France over the 1980–2012 period: Solid tumors. Httpswww-Em--Prem.-Comfrodonuniv-Paris5frdatarevues03987620v62i2S0398762014001369.

8. Blows, F.M., Driver, K.E., Schmidt, M.K., Broeks, A., van Leeuwen, F.E., Wesseling, J., Cheang, M.C., Gelmon, K., Nielsen, T.O., Blomqvist, C., et al. (2010). Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies. PLoS Med. *7*.

9. Buzdar, A.U., Ibrahim, N.K., Francis, D., Booser, D.J., Thomas, E.S., Theriault, R.L., Pusztai, L., Green, M.C., Arun, B.K., Giordano, S.H., et al. (2005). Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with *trastuzumab*, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *23*, 3676–3685.

10. Carter, C.L., Allen, C., and Henson, D.E. (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer *63*, 181–187.

11. Cortazar, P., Zhang, L., Untch, M., Mehta, K., Costantino, J.P., Wolmark, N., Bonnefoi, H., Cameron, D., Gianni, L., Valagussa, P., et al. (2014). Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. Lancet Lond. Engl. *384*, 164–172.

12. Demaria, S., Volm, M.D., Shapiro, R.L., Yee, H.T., Oratz, R., Formenti, S.C., Muggia, F., and Symmans, W.F. (2001). Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *7*, 3025–3030.

13. Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B.M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., et al. (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *28*, 105–113.

14. Denkert, C., von Minckwitz, G., Brase, J.C., Sinn, B.V., Gade, S., Kronenwett, R., Pfitzner, B.M., Salat, C., Loi, S., Schmitt, W.D., et al. (2015). Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human

epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *33*, 983–991.

15. Dieci, M.V., Criscitiello, C., Goubar, A., Viale, G., Conte, P., Guarneri, V., Ficarra, G., Mathieu, M.C., Delaloge, S., Curigliano, G., et al. (2014). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO *25*, 611–618.

16. Dieci, M.V., Mathieu, M.C., Guarneri, V., Conte, P., Delaloge, S., Andre, F., and Goubar, A. (2015). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO *26*, 1698–1704.

17. Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat. Rev. Immunol. *6*, 836–848.

18. Fisher, B., Bauer, M., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Fisher, E.R., Cruz, A.B., Foster, R., Gardner, B., Lerner, H., and Margolese, R. (1983). Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. Cancer *52*, 1551–1557.

19. Fisher, B., Brown, A., Mamounas, E., Wieand, S., Robidoux, A., Margolese, R.G., Cruz, A.B., Fisher, E.R., Wickerham, D.L., Wolmark, N., et al. (1997). Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *15*, 2483–2493.

20. García-Martínez, E., Gil, G.L., Benito, A.C., González-Billalabeitia, E., Conesa, M.A.V., García García, T., García-Garre, E., Vicente, V., and Ayala de la Peña, F. (2014). Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. Breast Cancer Res. BCR *16*, 488.

21. Gennari, R., Menard, S., Fagnoni, F., Ponchio, L., Scelsi, M., Tagliabue, E., Castiglioni, F., Villani, L., Magalotti, C., Gibelli, N., et al. (2004). Pilot study of the mechanism of action of preoperative *trastuzumab* in patients with primary operable breast tumors overexpressing *HER2*. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *10*, 5650–5655.

22. Gianni, L., Eiermann, W., Semiglazov, V., Manikhas, A., Lluch, A., Tjulandin, S., Zambetti, M., Vazquez, F., Byakhow, M., Lichinitser, M., et al. (2010). Neoadjuvant chemotherapy with *trastuzumab* followed by adjuvant *trastuzumab* versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with *HER2*-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel *HER2*-negative cohort. Lancet Lond. Engl. *375*, 377–384.

23. Gianni, L., Eiermann, W., Semiglazov, V., Lluch, A., Tjulandin, S., Zambetti, M., Moliterni, A., Vazquez, F., Byakhov, M.J., Lichinitser, M., et al. (2014). Neoadjuvant and adjuvant *trastuzumab* in patients with *HER2*-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel *HER2*-negative cohort. Lancet Oncol. *15*, 640–647.

24. Gnerlich, J.L., Deshpande, A.D., Jeffe, D.B., Sweet, A., White, N., and Margenthaler, J.A. (2009). Elevated breast cancer mortality in women younger than age 40 years compared with older women is attributed to poorer survival in early-stage disease. J. Am. Coll. Surg. *208*, 341–347.

25. Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., et al. (2009). Regulatory T Cells Recruited through CCL22/CCR4 Are Selectively Activated in Lymphoid Infiltrates Surrounding Primary Breast Tumors and Lead to an Adverse Clinical Outcome. Cancer Res. *69*, 2000–2009.

26. Gujam, F.J.A., Going, J.J., Edwards, J., Mohammed, Z.M.A., and McMillan, D.C. (2014). The role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival and methods of detection in patients with primary operable breast cancer. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *89*, 231–241.

27. Hamy-Petit, A.-S., Belin, L., Bonsang-Kitzis, H., Paquet, C., Pierga, J.-Y., Lerebours, F., Cottu, P., Rouzier, R., Savignoni, A., Lae, M., et al. (2016). Pathological complete response and prognosis after neoadjuvant chemotherapy for *HER2*-positive breast cancers before and after *trastuzumab* era: results from a real-life cohort. Br. J. Cancer *114*, 44–52.

28. Howlader, N., Altekruse, S.F., Li, C.I., Chen, V.W., Clarke, C.A., Ries, L.A.G., and Cronin, K.A. (2014). US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and *HER2* status. J. Natl. Cancer Inst. *106*.

29. Ingold Heppner, B., Untch, M., Denkert, C., Pfitzner, B.M., Lederer, B., Schmitt, W.D., Eidtmann, H., Fasching, P.A., Tesch, H., Solbach, C., et al. (2016). Tumor-infiltrating lymphocytes: a predictive and prognostic biomarker in neoadjuvant treated *HER2*-positive breast cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.

30. Kohler, B.A., Sherman, R.L., Howlader, N., Jemal, A., Ryerson, A.B., Henry, K.A., Boscoe, F.P., Cronin, K.A., Lake, A., Noone, A.-M., et al. (2015). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. J. Natl. Cancer Inst. *107*, djv048.

31. Kroemer, G., Senovilla, L., Galluzzi, L., André, F., and Zitvogel, L. (2015). Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. Nat. Med. *21*, 1128–1138.

32. Kuerer, H.M., Newman, L.A., Smith, T.L., Ames, F.C., Hunt, K.K., Dhingra, K., Theriault, R.L., Singh, G., Binkley, S.M., Sneige, N., et al. (1999). Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *17*, 460–469.

33. Kute, T.E., Savage, L., Stehle, J.R., Kim-Shapiro, J.W., Blanks, M.J., Wood, J., and Vaughn, J.P. (2009). Breast tumor cells isolated from in vitro resistance to *trastuzumab* remain sensitive to *trastuzumab* anti-tumor effects in vivo and to ADCC killing. Cancer Immunol. Immunother. CII *58*, 1887–1896.

34. Ladoire, S., Mignot, G., Dabakuyo, S., Arnould, L., Apetoh, L., Rébé, C., Coudert, B., Martin, F., Bizollon, M.H., Vanoli, A., et al. (2011a). In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. J. Pathol. *224*, 389–400.

35. Ladoire, S., Arnould, L., Mignot, G., Apetoh, L., Rébé, C., Martin, F., Fumoleau, P., Coudert, B., and Ghiringhelli, F. (2011b). T-bet expression in intratumoral lymphoid structures after neoadjuvant *trastuzumab* plus docetaxel for *HER2*-overexpressing breast carcinoma predicts survival. Br. J. Cancer *105*, 366–371.

36. Lale Atahan, I., Yildiz, F., Ozyigit, G., Sari, S., Gurkaynak, M., Selek, U., and Hayran, M. (2008). Percent positive axillary lymph node metastasis predicts survival in patients with non-metastatic breast cancer. Acta Oncol. Stockh. Swed. *47*, 232–238.

37. Liu, S., Duan, X., Xu, L., Xin, L., Cheng, Y., Liu, Q., Ye, J., Zhang, S., Zhang, H., Zhu, S., et al. (2015). Optimal threshold for stromal tumor-infiltrating lymphocytes: its predictive and prognostic value in *HER2*-positive breast cancer treated with *trastuzumab*-based neoadjuvant chemotherapy. Breast Cancer Res. Treat. *154*, 239–249.

38. Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J.P.A., Hitre, E., et al. (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *31*, 860–867.

39. Loi, S., Michiels, S., Salgado, R., Sirtaine, N., Jose, V., Fumagalli, D., Kellokumpu-Lehtinen, P.-L., Bono, P., Kataja, V., Desmedt, C., et al. (2014). Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for *trastuzumab* benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO *25*, 1544–1550.

40. Mahmoud, S., Lee, A., Ellis, I., and Green, A. (2012). CD8(+) T lymphocytes infiltrating breast cancer: A promising new prognostic marker? Oncoimmunology *1*, 364–365.

41. Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *29*, 1949–1955.

42. Mao, Y., Qu, Q., Zhang, Y., Liu, J., Chen, X., and Shen, K. (2014). The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. PloS One *9*, e115103.

43. Mao, Y., Qu, Q., Chen, X., Huang, O., Wu, J., and Shen, K. (2016). The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. PloS One *11*, e0152500.

44. Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Curr. Opin. Immunol. *27*, 16–25.

45. Nagalla, S., Chou, J.W., Willingham, M.C., Ruiz, J., Vaughn, J.P., Dubey, P., Lash, T.L., Hamilton-Dutoit, S.J., Bergh, J., Sotiriou, C., et al. (2013). Interactions between immunity, proliferation and molecular subtype in breast cancer prognosis. Genome Biol. *14*, R34.

46. Neville, A.M., Bettelheim, R., Gelber, R.D., Säve-Söderbergh, J., Davis, B.W., Reed, R., Torhorst, J., Golouh, R., Peterson, H.F., and Price, K.N. (1992). Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *10*, 696–705.

47. Ono, M., Tsuda, H., Shimizu, C., Yamamoto, S., Shibata, T., Yamamoto, H., Hirata, T., Yonemori, K., Ando, M., Tamura, K., et al. (2012). Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. *132*, 793–805.

48. Parise, C.A., Caggiano, V., Parise, C.A., and Caggiano, V. (2014). Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/*HER2* Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers, Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/*HER2* Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. J. Cancer Epidemiol. J. Cancer Epidemiol. *2014*, *2014*, e469251.

49. Park, S., Jiang, Z., Mortenson, E.D., Deng, L., Radkevich-Brown, O., Yang, X., Sattar, H., Wang, Y., Brown, N.K., Greene, M., et al. (2010). The therapeutic effect of anti-*HER2*/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. Cancer Cell *18*, 160–170.

50. Perez, E.A., Romond, E.H., Suman, V.J., Jeong, J.-H., Davidson, N.E., Geyer, C.E., Martino, S., Mamounas, E.P., Kaufman, P.A., and Wolmark, N. (2011). Four-year follow-up of *trastuzumab* plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *29*, 3366–3373.

51. Perez, E.A., Ballman, K.V., Tenner, K.S., Thompson, E.A., Badve, S.S., Bailey, H., and Baehner, F.L. (2016). Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage *HER2*-Positive Breast Cancer. JAMA Oncol. *2*, 56–64.

52. Perez, S.A., Karamouzis, M.V., Skarlos, D.V., Ardavanis, A., Sotiriadou, N.N., Iliopoulou, E.G., Salagianni, M.L., Orphanos, G., Baxevanis, C.N., Rigatos, G., et al. (2007). CD4+CD25+ regulatory T-cell frequency in HER-2/neu (HER)-positive and HER-negative advanced-stage breast cancer patients. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *13*, 2714–2721.

53. Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature *406*, 747–752.

54. Rastogi, P., Anderson, S.J., Bear, H.D., Geyer, C.E., Kahlenberg, M.S., Robidoux, A., Margolese, R.G., Hoehn, J.L., Vogel, V.G., Dakhil, S.R., et al. (2008). Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *26*, 778–785.

55. Rouzier, R., Perou, C.M., Symmans, W.F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K.R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., et al. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *11*, 5678–5685.

56. Rovere-Querini, P., and Castiglioni, A. (2008). Adjuvant role for cell death during chemo- and radiotherapy of cancer? Expert Rev. Clin. Immunol. *4*, 27–32.

57. Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F.L., Penault-Llorca, F., et al. (2015a). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO *26*, 259–271.

58. Salgado, R., Denkert, C., Campbell, C., Savas, P., Nuciforo, P., Nucifero, P., Aura, C., de Azambuja, E., Eidtmann, H., Ellis, C.E., et al. (2015b). Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival

in *HER2*-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and *Trastuzumab*: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. JAMA Oncol. *1*, 448–454.

59. Schwartz, A.M., Henson, D.E., Chen, D., and Rajamarthandan, S. (2014). Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: a study of 161 708 cases of breast cancer from the SEER Program. Arch. Pathol. Lab. Med. *138*, 1048–1052.

60. Seo, A.N., Lee, H.J., Kim, E.J., Kim, H.J., Jang, M.H., Lee, H.E., Kim, Y.J., Kim, J.H., and Park, S.Y. (2013). Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. Br. J. Cancer *109*, 2705–2713.

61. Sheri, A., Smith, I.E., Johnston, S.R., A'Hern, R., Nerurkar, A., Jones, R.L., Hills, M., Detre, S., Pinder, S.E., Symmans, W.F., et al. (2015). Residual proliferative cancer burden to predict long-term outcome following neoadjuvant chemotherapy. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO *26*, 75–80.

62. Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *163*, 5211–5218.

63. Smith, I., Procter, M., Gelber, R.D., Guillaume, S., Feyereislova, A., Dowsett, M., Goldhirsch, A., Untch, M., Mariani, G., Baselga, J., et al. (2007). 2-year follow-up of *trastuzumab* after adjuvant chemotherapy in *HER2*-positive breast cancer: a randomised controlled trial. Lancet Lond. Engl. *369*, 29–36.

64. Sørlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 10869–10874.

65. Spector, N.L., and Blackwell, K.L. (2009). Understanding the mechanisms behind *trastuzumab* therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *27*, 5838–5847.

66. Stuart-Harris, R., Caldas, C., Pinder, S.E., and Pharoah, P. (2008). Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. Breast Edinb. Scotl. *17*, 323–334.

67. Symmans, W.F., Peintinger, F., Hatzis, C., Rajan, R., Kuerer, H., Valero, V., Assad, L., Poniecka, A., Hennessy, B., Green, M., et al. (2007). Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *25*, 4414–4422.

68. Untch, M., Rezai, M., Loibl, S., Fasching, P.A., Huober, J., Tesch, H., Bauerfeind, I., Hilfrich, J., Eidtmann, H., Gerber, B., et al. (2010). Neoadjuvant treatment with *trastuzumab* in *HER2*-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *28*, 2024–2031.

69. Varadan, V., Gilmore, H., Miskimen, K.L.S., Tuck, D., Parsai, S., Awadallah, A., Krop, I.E., Winer, E.P., Bossuyt, V., Somlo, G., et al. (2016). Immune Signatures Following Single Dose *Trastuzumab* Predict Pathologic Response to Preoperative*Trastuzumab* and Chemotherapy in *HER2*-Positive Early Breast Cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.

70. West, N.R., Kost, S.E., Martin, S.D., Milne, K., Deleeuw, R.J., Nelson, B.H., and Watson, P.H. (2013). Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. Br. J. Cancer *108*, 155–162.

71. Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Hicks, D.G., Dowsett, M., McShane, L.M., Allison, K.H., Allred, D.C., Bartlett, J.M.S., Bilous, M., Fitzgibbons, P., et al. (2013). Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. J. Clin. Oncol. *31*, 3997–4013.

72. Wolmark, N., Wang, J., Mamounas, E., Bryant, J., and Fisher, B. (2001). Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 96–102.

ANNEXES

Annexe 1 Résultats de la littérature concernant l'impact prédictif et pronostique de l'infiltrat lymphocytaire chez les patientes traitées en néoadjuvant pour des tumeurs *HER2*-positif

Ref	Number patients	*Trastu-zumab*	pCR	DFS	OS
(Demaria et al., 2001)	25	No	No correlation with pretreatment lymphocytic infiltrate.	-	-
(Denkert et al., 2010a)	1,058	No	Linear association with TILs. Maximal OR of 13.39 (95% CI, 6.1 to 29.37; P< .0005) for intra tumoral TILs > 60%	-	-
(Ladoire et al., 2011a)	162 111 *HER2* +	T=57%	Favourable CD8/FOXP3 ratio (high C8, low FOXP3) was associated with pCR [HR=6.28 (2.42–16.27); p < 0.0001]	low FOXP3+ (p=0.036), and high CD8 (p <0.0001) were associated with a better DFS	
(Ladoire et al., 2011b)	112 *HER2* +	T=57%	No correlation between T-bet level or induction and pCR.	T-bet cells after NAC was associated with improved DFS (p=0.04; HR:4.76; 95% CI: 1.07–20)	-
(Ono et al., 2012)	180. 42 *HER2*+	No	pCR rates of the tumors showing a high TIL score (34%) were significantly higher than those of the tumors showing a low TIL score (10%) (P=0.0001)	-	-
(Dieci et al., 2014)	278 TNBC	No	-	multivariate : DFS High TILs vs low (HR 0.86, 95% CI 0.77–0.96, P=0.01)	OS (HR 0.86, 95% CI 0.77–0.97, P=0.01)
(Liu et al., 2015)	116 *HER2*+	T=100%	30 % threshold best discriminated pCR from non-pCR subgroups (P 0.001). TILs > 30% was predictor of pCR (OR=5.23, p= 0.001)	Non pCR : TILS before NAC >30% significantly predicted longer EFS (P=0.018),	-
(Salgado et al., 2015b)	387 *HER2*+	T=34% L=34% T+L=32%	pCR : TILs > 5% were associated with higher pCR rates (adjusted OR 2.60 [95%CI, 1.26-5.39]; P=.01).	TILs before NAC : every 1% increase was associated with a 3% decrease in the rate of an event (HR 0.97 [95%CI,0.95-0.99]; P = .002)	-
(Denkert et al., 2015)	580 266 *HER2*+	T+L=100%	every 10% increase in sTILs was associated with better pCR OR=1.22 (95% CI, 1.14-1.31 ; p.001).TILs >60% : OR=2.92 (95% CI, 1.98-;P .001)	-	-
(Bianchini et al., 2015)	243 *HER2*+	T=25%, P=25%, T+P=25% T without NAC = 23%	No linear association between TILs ans pCR, but lowTIL group had a significantly lower pCR (4.3% vs 23,8%, p=0.062)	-	-
(Varadan et al., 2016)	81 + 60	T=100%	after a single dose of *trastuzumab*, the median Immune Index was significantly higher in the pCR group (P=0.03)	-	-
(García-Martínez et al., 2014)	121 29 *HER2*+	T=14%	Association between pCR and higher pretreatment CD3 (P=0.007; OR=11.7, 95%CI:1.97-69.2); CD4 (P=0.005; OR=11.0); and CD20 (P=0.005; OR=15.3). A CD4/CD8 ratio over the median was predictor of pCR after NAC (P=0.01; OR=8.5, 95% CI:1.4-50.2)	higher CD3 decrease after treatment was related to DFS (P=0.005) in univariate	higher CD3 decrease after treatment was related to better OS (P=0.02) in univariate

(Ingold Heppner et al., 2016)	498 *HER2+*	T=68,3% L=31,7%	univariate (10% TILs: OR 1.12, p=0.002; LPBC: OR 2.02, p=0.002) and multivariate (10% TILs: OR 1.1, p=0.014; LPBC: OR 1.87, p=0.009).	low-risk group consisting of pCR/LPBC cases and the subgroup of no pCR/no LPBC tumors, representing a high-risk group (p=0.039	
(Perez et al., 2016)	945 *HER2+*	T=48%		*Trastuzumab* : no impact of TILs (HR, 1.26 ; p=0,63) No *trastuzumab* : better DFS if high TILs (90% vs 64,5% at 10 years ; HR=0,23 [95% CI, 0.07-0.73]; p=0,01	
(Ali et al., 2016)	768	no	Median lymphocyte before NAC was associated with pCR : univariate (OR4.46, p< 0.0001)p multivariate (OR 2.42, 95 % CI 1.08-5.40, p = 0.03) A reduction in lymphocyte density at surgery was associated with pCR (OR 0.28, 95 %CI 0.17-0.47, p < 0.0001	-	-

pCR : RHC, NAC : chimiothérapie néoadjuvante, T : *trastuzumab*, P: pertuzumab, L : lapatinib, TILs : ILT, DFS : survie sans récidive, OS : survie globale

Annexe 2 Analyse univariée des TILs en utilisant les seuils associées à la RHC publiés

			Total (n)	RHC (n)	RHC (%)	OR	IC95%	p
IT TILs	Médiane	<médiane	98	34	34.7%	1		
		>médiane	77	34	44.2%	1,49	[0.81-2.76]	0,203
	Tertile	1er tertile	60	18	30%	1		
		2e tertile	73	32	43.8%	1,82	[0.89-3.79]	0,103
		3e tertile	42	18	42.9%	1,75	[0.77-4.02]	0,183
	Quartile	1er quartile	60	18	30%	1		
		2e quartile	38	16	42.1%	1,7	[0.73-3.99]	0,222
		3e quartile	35	16	45.7%	1,96	[0.83-4.7]	0,126
		4e quartile	42	18	42.9%	1,75	[0.77-4.02]	0,183
	Seuil : 30%	<30%	139	53	38.1%	1		
		≥30%	36	15	41.7%	1,16	[0.54-2.43]	0,698
	Seuil : 50%	<50%	167	64	38.3%	1		
		≥50%	8	4	50%	1,61	[0.37-7.02]	0,511
Str TILs	Médiane	<médiane	103	38	36.9%	1		
		>médiane	72	30	41.7%	1,22	[0.66-2.26]	0,524
	Tertile	1er tertile	71	25	35.2%	1		
		2e tertile	56	22	39.3%	1,19	[0.58-2.46]	0,637
		3e tertile	48	21	43.8%	1,43	[0.67-3.04]	0,349
	Quartile	1er quartile	47	17	36.2%	1		
		2e quartile	56	21	37.5%	1,06	[0.47-2.38]	0,889
		3e quartile	45	18	40%	1,18	[0.51-2.75]	0,705
		4e quartile	27	12	44.4%	1,41	[0.53-3.72]	0,483
	Seuil 30%	< 30%	103	38	36.9%	1		
		≥ 30%	72	30	41.7%	1,22	[0.66-2.26]	0,524
	Seuil 50%	< 50%	148	56	37.8%	1		
		≥ 50%	27	12	44.4%	1,31	[0.56-3.01]	0,518

Valeur prédictive et pronostique de l'*infiltrat* lymphocytaire chez les patientes traitées par une chimiothérapie néoadjuvante dans les cancers du sein *HER2*-positif

Introduction : Le traitement néoadjuvant permet une analyse de la réponse tumorale et des modifications intervenant au niveau de l'environnement péri tumoral.

Matériel et méthode : Nous avons évalué l'infiltrat lymphocytaire (TILs) avant et aprés traitement chez 175 patientes atteintes de cancer du sein *HER2*-positif et traitées par chimiothérapie néoadjuvante à l'Institut Curie. Nous avons étudié les facteurs prédictifs d'une réponse histologique complète (RHC) et les facteurs pronostiques de survie sans récidive (SSR).

Résultats : 68 patientes étaient en RHC (%). En analyse univariée, un seuil de TILs intra tumoral (IT TILs) supérieur à 2% était associé à la survenue d'une RCH (OR=9,27 ; IC95% : 1,78-170,35 ; p=0,034). Après analyse multivariée, les IT TILs >2% étaient un facteur prédictif indépendant de RCH (OR=8,24 ; IC95% : 1,46-155,34 ; p=0,05), en association avec l'administration de *trastuzumab* en situation néoadjuvante (42,4% contre 15,4%, OR=4,18 ; IC95% : 1,41-15,52 ; p=0,017) et du statut du récepteur à la progestérone (RP positif : OR=0,22, IC95% : 0,1-0,46 ; p≤0,001).

Concernant la survie, nous avons mis en évidence qu'un taux de TIls après traitement supérieur à 25% était associé à une diminution de la SSR en analyse univariée (OR=5,05, IC95% : 1,66-15,36, p=0,004). Cette association restait significative après analyse multivariée (OR=6,18, IC95% : 2,26-29,55 ; p=0,001), en association avec l'index de masse corporelle (IMC>25 : HR=4,92, IC95% 1,85-13,1 ; p=0,001), le grade histopronostique (grade III : HR=0,35 ; IC95% : 0,13-0,95 ; p=0,04), la cellularité tumorale après traitement (>5% : HR=5,92, IC95% : 1,32-26,58 ; p= 0,02), et le pourcentage de composante in situ après traitement (≧ 22.5% : HR=5,47 ; IC95% : 1,93-15,5, p=0,001).

Conclusion : En accord avec la littérature, nous avons retrouvé un impact prédictif des TILs chez les patientes traitées pour une tumeur *HER2*-positif en situation néoadjuvante. Les niveaux d'infiltrat immunitaire après traitement semblent également apporter une information pronostique importante, qui doit maintenant être validée par des études complémentaires.

Mots clés : Infiltrat lymphocytaire – cancer du sein-*HER2* positif – prédictif – pronostic – chimiothérapie néoadjuvante

Predictive and prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in *HER2* positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy

Keywords: Tumor infiltrating lymphocytes – *HER2*-positive – prediction – prognosis – neoadjuvant chemotherapy.

Université Paris Descartes
Faculté de Médecine Paris Descartes
15, rue de l'Ecole de Médecine
75270 Paris cedex 06