HAL
open science

Pronostic de l'infiltrat inflammatoire dans les cancers du sein triple-négatifs (PRINCESSE) : constitution d'une signature transcriptomique pronostique liée à l'inflammation

Céline Blaye

To cite this version:

Céline Blaye. Pronostic de l'infiltrat inflammatoire dans les cancers du sein triple-négatifs (PRINCESSE) : constitution d'une signature transcriptomique pronostique liée à l'inflammation. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03376597

HAL Id: dumas-03376597

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03376597v1

Submitted on 13 Oct 2021

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.

Université de Bordeaux
U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2021 Thèse n° 3116

Thèse pour l'obtention du
DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2021 par

Céline BLAYE (épouse BOISSIN)
Née le 25 avril 1988 à Paris (14ème)

PRONOSTIC DE L'INFILTRAT INFLAMMATOIRE DANS LES CANCERS DU SEIN TRIPLE-NEGATIFS (PRINCESSE) : CONSTITUTION D'UNE SIGNATURE TRANSCRIPTOMIQUE PRONOSTIQUE LIEE A L'INFLAMMATION.

Directeur de Thèse
Monsieur le Docteur Gaëtan Mac Grogan

Membres du Jury

Monsieur le Professeur Hervé BONNEFOI	**Président**
Monsieur le Professeur Antoine ITALIANO	Rapporteur
Madame le Docteur Charlotte DOMBLIDES	Juge
Monsieur le Docteur Marc DEBLED	Juge

Remerciements

Aux membres du jury :

Pr Bonnefoi, président du jury : tôt dans mon cursus, vous m'avez encouragée dans mon parcours d'apprentie oncologue… et immunologiste ; je vous en suis profondément reconnaissante. Je suis très heureuse et enthousiaste à l'idée de pouvoir continuer à me former en sénologie auprès de vous dans les années à venir.

Pr Italiano, rapporteur : vous m'avez fait l'honneur de relire et corriger ce projet, et de vous rendre disponible pour la soutenance malgré un emploi du temps partagé entre Bordeaux et Paris. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance et mon admiration.

Dr Domblides : de mes premiers pas en immunologie, où j'ai eu la chance d'être ta voisine de bureau, à aujourd'hui où tu es là pour m'aider à valider cette étape plus qu'importante… Je te remercie sincèrement pour ton soutien et ton amitié. J'apprécie énormément de travailler avec toi, et j'espère que les années à venir seront riches en projets partagés !

Dr Debled : vous me faites l'honneur de vous rendre disponible pour ma soutenance. J'ai beaucoup appris de vous au cours de mon cursus, que ce soit sur la relation médecin/ patient(e), ou même sur l'accompagnement des plus jeunes, que vous adorez ; j'ai hâte de continuer ma formation avec vous.

Dr Mac Grogan : Il s'en est passé, du temps, depuis cette première fois où je suis venue te voir pour te parler d'immuno-oncologie… et que je t'ai regardé avec des yeux ronds quand tu m'as parlé de FOXP3 ! Merci énormément de m'avoir confié ce projet, certes difficile mais sur lequel j'ai beaucoup appris et pu appliquer les connaissances acquises au laboratoire. Merci infiniment pour ton soutien inestimable, tant sur ce projet que sur tous mes projets

annexes. J'ai adoré travailler avec toi, et j'espère que nous aurons d'autres occasions de réaliser des projets dans les années à venir.

A l'équipe de Princesse :

Ce projet, compliqué, a été un vrai projet d'équipe et n'aurait jamais pu voir le jour sans Valérie (merci pour tout !), Claire (ingénieure Nanostring ô combien précieuse, merci !), Elodie, Véronique Brouste (des rapports rapides et compréhensibles même à mon niveau de stats !) et évidemment Gaëtan ! Un merci tout particulier à Elodie pour ton aide, ta réactivité, et les plus de 500 mails (!!) échangés depuis la mise en place du projet. J'ai beaucoup apprécié notre travail commun !

Un énorme merci aux membres du Comité de la lutte pour la prévention et le dépistage de Gironde qui nous ont fait confiance pour ce projet et qui l'ont financé.

Merci aussi aux patientes d'avoir accepté ce projet.

A mes amis :

Merci à mes amis du lycée : merci au noyau dur des « S4 » : les 2 Antoine, Guillaume, David et surtout mes inestimables « grosses » : Tara et Sophie, copines pour la vie. Sophie, témoin parfaite et un soutien sans faille depuis des années, merci infiniment pour tous ces week-ends de soutien – j'adore quand tu viens nous voir. Tara, ma businesswoman londonienne préférée, c'est incroyable tout ce qu'on peut partager malgré la distance, tu comptes énormément pour moi. Je vous aime les filles !

Merci à mes amis de la fac : bien des années se sont écoulées depuis l'ECN, mais Ariana, Diane, Sacha, Marie, Antoine, Alice, Neil, David, Louise, Anaïs… c'était stressant mais c'était de belles années ! à Alice, confidente de ces années, notre projet commun de départ à

Bordeaux m'a poussé vers de meilleurs horizons et je ne l'ai jamais regretté ; quel bonheur de t'y retrouver presque 10 ans plus tard ! Louise, merci pour ce départ commun et cette vie partagée à l'internat (et nos sous-colles !). Najla, merci pour tous tes conseils au cours de ces années.

Merci aux supers cointernes que j'ai pu croiser en route : Camille et Savva, mon équipe de choc pour le 1 trimestre ; Romain, mon meilleur cointerne (désolée Laura…) avec Laetitia et Caroline (les surdouées !) ; ma Salala préférée qui a quand même été une sacrée découverte : 6 mois intenses, mais on s'est bien marrées. Quel bonheur de te retrouver comme collègue très prochainement ! Caroline et Tiphaine ; Anthony mon râleur préféré ; et Félix, mon jumeau d'oncologie, que je n'ai jamais eu la chance d'avoir en binôme (vieeeeeens on est bien !).

Merci à mes amis des années internat : merci à mon équipe de footing/papote de choc (bon surtout papote, on va pas se mentir) : Inès, super nana et super témoin : merci pour tout ton soutien au cours de ces années, même à distance ; Sophie, chirurgienne de choc avec qui j'ai hâte de travailler, merci aussi pour toute ton aide sur mes projets pro… comme perso ! Solène, la douceur incarnée, merci encore de ton accompagnement dans mes premiers pas en tant que maman ; Marie-Annaïg, future mariée canon et RI solide – nos (vrais) footings sont des moments de détente que j'attends toujours avec impatience et qui nous ont permis de devenir bien plus proches ; Margaux, tu me manques la parigot mais nos discussions restent toujours aussi géniales même si elles ont lieu 3 fois par an ! Carole, les occasions de se voir sont aujourd'hui trop rare mais j'ai hâte qu'on puisse se rattraper. Je vous adore ! Merci aussi à Édouard, grâce à qui nous allons aborder cette nouvelle étape de vie dans une maison toute neuve, à Louis (pour tes vannes ;-)), Adri.

Merci aussi à tous ceux avec qui l'internat a juste été canon : Grégoire mon voisin d'internat, Dimitri notre GO, Guillaume, Chloé la meuf la plus stylée que je connaisse (meuf ouvre nous ton dressing !), Charlotte, JET et Audrey. Claire, Maraph, Florianne, merci pour ces partages d'expérience aussi au cours de ces dernières années.

Merci à monsieur Soen, grand confident de ces années internat ; tu comptes énormément pour moi. Merci Julie, pour ces supers moments partagés en vacances et week-ends.

Merci à mon indispensable Clémence (vovo, Frau Kükü) : une découverte incroyable de ces années d'internat, la « tata Clem » de mes filles ; avec Cricri vous êtes des amis en or, et ce malgré la distance.

Merci à JB et surtout Simona qui, depuis ce trek improbable au Laos, est devenue une super amie, toujours là pour les moments importants !

A tous ceux que j'ai croisés dans mes années à l'hôpital : Un grand merci aux équipes qui m'ont accueillie et formée dans tous les services que j'ai traversés, tout particulièrement : à l'équipe de choc du « 4ème Bergonié » mais aussi celles du « 2ème Bergonié » et de l'HDJ ; à l'équipe du 4ème3 du service de maladies infectieuses de l'hôpital Pellegrin, et en particulier à Charles (et Marco même s'il n'y est plus !) ; à Mikaël et Nathalie, qui m'ont tant appris sur l'accompagnement ; au service d'anapath de m'avoir supportée pendant 6 mois ;-) Merci aux différents oncologues de Bergonié pour leur accompagnement et tout particulièrement à M. Béchade, Guilhem, Anne Floquet, la grande équipe des sénologues. Merci au service de sénologie de l'IGR où j'ai passé 6 mois intenses, mais très intéressants ! Et sans oublier Camille, super CCA et surtout maintenant amie et future collègue, merci pour tous tes conseils et d'avoir « ouvert la voie » !

Merci à mes collègues et amis du laboratoire, qui égaient le quotidien ; à tout le laboratoire mais tout particulièrement à Julie et Domitille (vous êtes au top les filles, nos pauses communes me manqueront et j'aurais bien galéré sans vous...), à Anne partie trop vite à mon goût, Pauline, Amandine, Atika, Séverine. Merci à Gaël pour ton soutien moral régulier, et le reste de « l'équipe Saleh ». Merci à Nicolas d'être un chef en or (tu as du mérite de me supporter, sache que j'en suis consciente !). Et merci à mon incroyable team d'étudiants : Florent (merci pour ton aide sur cette année de galère !), Thomas (merci pour tout, et quel honneur de t'avoir encadré !), Justine et Alex (2 nanas qui vont réussir).

A ma famille :

Merci à ma belle-famille pour leur accueil, les moments partagés, le bonheur de se retrouver en grande tribu avec tout plein d'enfants !

Merci à ma nounou Malika d'avoir été une nounou aussi attentionnée.

Merci à Beth et Tim pour leur accueil et leur affection, c'est chez vous que j'ai pris la décision d'aller faire médecine !

Merci à mes grands-parents : mon regretté papi René et mon incroyable mamie Jacqueline, incroyable grand-mamie. Je t'aime tellement fort, j'ai beaucoup de chance de t'avoir et les filles aussi. Merci à mon regretté grand-père Michel, et à « mamie qui coud », ancienne spécialiste dévouée du cancer du sein. Un grand merci à mes autres « grands-parents » de cœur : Dan et Tony, mais aussi Jacques et Armelle.

Merci aux Toulousaings pour ces chouettes années de partage, et pour leur soutien même si on se voit peu.

Merci à Saïd, véritable cœur d'or. Helen, ton amour et ton soutien ont été très précieux et encore plus depuis l'arrivée de mes filles. Je vous aime très fort.

Merci à mes frères et sœur en or, qui m'ont toujours fait me sentir très privilégiée d'être l'aînée d'une grande fratrie. Ces 10 dernières années ont été ponctuées de 7 déménagements, 2 enfants, un mariage et 2 thèses (dont une toujours en cours !), et je ne sais pas si j'y serais arrivée sans vous. Benji (oncle Ben), tu es d'une gentillesse rare et d'un soutien sans faille. Je ne te remercierai assez pour toute l'aide que tu nous as régulièrement apportée. Tonton Nicolas tu as, toi aussi, le cœur sur la main et tu es aussi présent quand j'ai besoin de toi. J'adore pouvoir discuter de tout avec toi ! Et Julie ma sœurette, presque mon bébé avec nos 9 ans d'écart, que j'aurai toujours un peu envie de protéger et que j'aime fort – toi aussi, tu n'as jamais été en reste quand nous avons eu besoin d'un coup de main. Merci à Meike, ma grande sœur d'adoption, d'avoir été là à de nombreuses étapes clés. Et merci aux « pièces rapportées », Mélanie et Shedy, d'être aussi chouettes.

Merci à mes parents pour votre soutien tout au long de ces années, votre amour et vos encouragements. Merci d'être des personnes aussi incroyables et d'avoir formé une famille aussi proche. Merci aussi pour votre incroyable support depuis que je suis maman, nous avons tellement de chance de vous avoir.

Pour toi, Romain, les mots manquent pour te remercier. Les 8 années passées ensemble ont été pleines d'amour, de joie, et de projets. Tu es mon mari, l'incroyable père de nos filles mais aussi mon meilleur ami (n'ayons pas peur des clichés !). Tu m'as toujours soutenue dans mes projets, même quand ils compliquent grandement notre quotidien, et tu me rends incroyablement heureuse. Je t'aime et je suis heureuse d'aborder cette nouvelle étape de notre vie ensemble.

Aliénor et Jeanne, mes filles, mes chéries pleines de vie, vous êtes ma joie et ma plus grande fierté.

Table des matières

Remerciements ***1***

Abréviations ***9***

Introduction bibliographique ***11***

I. Généralités **11**

a. Les cancers du sein 11

1. Épidémiologie en France 11

2. Définitions morphologique, immuno-histochimique et moléculaire des différents types de cancers du sein 12

Anatomopathologie, immunohistochimie. 12

Apport de la classification moléculaire. 13

Transposition à l'immunohistochimie. 13

b. Particularités des cancers du sein triple-négatifs 15

1. Particularités cliniques 15

2. Particularités biologiques 16

Du point de vue histologique 16

Du point de vue moléculaire 17

c. Prise en charge des cancers du sein triple-négatifs 20

1. Prise en charge des pathologies localisées 20

Chimiothérapie. 20

Chirurgie 21

Radiothérapie 22

2. Prise en charge des maladies avancées/ métastatiques 23

3. Cas particulier de l'immunothérapie. 24

II. Le microenvironnement immunitaire de la tumeur. **25**

a. Rappels fondamentaux sur l'immunité. 25

1. L'immunité innée 25

Cellules polynucléées 26

Cellules mononucléées 26

2. L'immunité adaptative. 26

Les lymphocytes T 26

Les lymphocytes B 27

b. Le microenvironnement immunitaire dans les cancers 27

1. Le changement de paradigme : d'une cellule isolée à une tumeur au sein de son microenvironnement. 27

2. Bases de l'immunité anti-tumorale 28

Développement d'une réponse lymphocytaire anti-tumorale. 29

Freins au développement de la réponse anti-tumorale ou « échappement » des 3Es. 30

c. Le microenvironnement immunitaire du cancer du sein triple-négatif 31

1. Rôle pronostique, rôle prédictif 32

2. Principaux acteurs immuns 33

Populations lymphocytaires du microenvironnement des CSTN 33

Populations myéloïdes du microenvironnement des CSTN 34

3. Méthodes de caractérisation du microenvironnement 34

Anatomo-pathologie et immunohistochimie 34

Étude du transcriptome 35

Imagerie multiplexe 35

III. Traitement néo-adjuvant : évaluation de la réponse et particularités des cancers du sein triple-négatifs. **37**

a. Évaluation de la réponse après chimiothérapie néo-adjuvante. 37

1. Classification de Chevallier 37
2. Score de Sataloff 38
3. Score RCB du MD Anderson. 38
b. Cas particulier de la réponse histologique complète (RHC) 39
1. La RHC dans les cancers du sein 39
2. La RHC dans les cancers du sein triple-négatifs. 40
c. Autres facteurs pronostiques histologiques après chimiothérapie néo-adjuvante. 41
1. Facteurs histopathologiques « classiques ». 41
2. Facteurs immunologiques. 42
d. Maladie résiduelle et mécanismes de chimio-résistance dans le CSTN. 42

IV. Apport de l'analyse transcriptomique dans l'évaluation pronostique des cancers du sein 45

a. Apport des signatures transcriptomiques : le cas des cancers RH+/HER2- 45
b. Analyse transcriptomique et identifications des populations immunitaires présentes. 49
c. Signatures transcriptomiques immunitaires dans les cancers du sein triple-négatifs. 51

***Objectifs de l'étude.* 62**

***Article* 63**

I. Abstract 64

I. Introduction 65

II. Methods 66

Study population and pathological evaluation 66
RNA extraction and analysis 67
Bioinformatics 69
Housekeeping genes selection 69
Nanostring data processing 69
Unsupervised analysis 69
Gene set functional enrichment 70
Signature definition 70
Signature score computation 71
Validation datasets 71
Survival analysis 71
Statistical analysis 71
Ethics 72

III. Results 72

The tumor microenvironment of residual disease. 74
Immune profile of post NAC TNBC residual disease and metastatic relapse. 75
Construction of an 8-genes prognostic signature. 79
Validation of the 8-gene signature and extended gene signature in external datasets. 81
Multivariate analysis of factors associated with relapse on TNBC post NACT residual disease. 84

IV. Discussion 85

V. Acknowledgements 88

***Perspectives et conclusion* 93**

***Bibliographie* 94**

***Serment d'Hippocrate* 104**

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
AURKA	Aurora kinase A
BCR	B-cell receptor, récepteur des lymphocytes B
BRCA	BReast CAncer
CASP (3)	Caspase (3)
CCL5	C-C motif Chemokine Ligand 5
CCND(1, 2)	Cyclin D(1,2)
CCNE1	Cyclin E1
CD (3, 4, 8, 16, 19, 25, 56)	Clusters de différenciation (3, 4, 8, 16, 19, 25, 56)
CDK (4, 6, …)	Cyclin-dependant kinase
CDKN2A,B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A, B
CK 5, 6, 14	Cytokératines (5, 6, 14)
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CSTN	Cancers du sein triple-négatifs
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL (9, 13)	Chemokine (C-X-C motif) ligand (9, 13 , …)
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
DDIT4	DNA Damage Inducible Transcript 4
DUSP4	Dual Specificity Phosphatase 4
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ESR1	Estrogen Receptor 1
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FGFR1, 2, 4	Fibroblast Growth Factor Receptors 1, 2, 4
FOXM1	Forkhead box M1
FOXP3	Forkhead box P3
GO	Gene Ontology
HAS	Haute Autorité de Santé
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HES	Hematoxylin and Eosin Stain
HIF1α	Hypoxia-inducible factor 1α
ICR	Immunologic Constant of Rejection
IDO1	Indolamine 2,3-Dioxygenase 1
IFN γ	Interféron γ
IGF1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor

IGKC2	Immunoglobin Kappa Constant 2
IHC	Immunohistochimie
IL-2, 6, …	Interleukine 2, 6, …
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
KRT5, 14,17	Keratin5, 14, 17 (gènes)
LPBC	Lymphocytes predominant breast cancer, cancer du sein à predominance lymphocytaire.
MAPK	Mitogen-activated protein kinases ou MAP kinases
mARN	ARN messagers
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells ou cellules myéloïdes suppressives
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
NK	Natural killer
ORR	Overall response rate
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
pCR	pathologic Complete Response ou Réponse Histologique Complète
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PD1	Programmed cell Death protein 1
PFS	Progression-free survival
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
POLR1C	RNA Polymerase I and III Subunit C
PRR	Pathogen Recognition Receptors
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RA	Récepteur aux androgènes
RAPTOR	Regulatory Associated Protein of MTOR Complex 1
RCB	Residual Cancer Burden
RCP	Réunion de concertation pluri-disciplinaire
RE, REα	Récepteur à l'oestrogène
RP	Récepteur à la progestérone
RPCB	Residual Proliferative Cancer Burden
RT-PCR	Reverse transcriptase - polymerase chain reaction
STAT	Signal transducers and activator of transcription
TAM	Tumor-associated macrophages
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCR	T-cell Receptor
TGFß	Tumor Growth Factor ß
TIL(s)	Tumor-infiltrating lymphocytes, lymphocytes infiltrant la tumeur
TP53	Tumor protein 53
Tregs	Lymphotycte T régulateurs
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction bibliographique

I. Généralités

a. Les cancers du sein.

1. Épidémiologie en France

Le cancer du sein est **le premier cancer de la femme en termes d'incidence et de mortalité avec 58.459 nouveaux cas estimés en 2018 pour 12.146 décès**. Cette incidence était plutôt en baisse dans les années 2000, mais semble être actuellement légèrement en hausse (+ 0,6% par an en moyenne) (1).

La diminution de l'incidence dans les années 2000 peut être attribuée à un recul des prescriptions des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause, ainsi qu'à un effet de « saturation » du dépistage, c'est-à-dire la diminution/stabilisation de l'incidence après la hausse temporaire liée à l'instauration d'un dépistage organisé (1).

En ce qui concerne la mortalité, celle-ci baisse régulièrement sur la période de 1990 à 2018 (- 1.3%/ an), du fait d'avancées thérapeutiques majeures et d'un dépistage à un stade plus précoce.

Près de la moitié des cancers sont diagnostiqués chez la femme de 65 ans et plus, et l'âge médian au moment du décès par cancer du sein est de 74 ans (2, 3).

Les facteurs de risques associés au cancer du sein sont :

- L'**âge** : moins de 10% des cancers surviennent à 40 ans et l'incidence augmente régulièrement jusqu'à 65 ans ;
- Des **facteurs hormonaux** : une vie hormonale prolongée (puberté précoce, ménopause tardive, nulliparité, premier enfant tardif), la prise de contraceptifs oraux et/ou d'un traitement hormonal substitutif.
- Des **facteurs génétiques**, comme les mutations des gènes BRCA, responsables d'un fort risque cumulatif de cancer du sein chez les personnes porteuses (65% et 45% respectivement chez les femmes porteuses de mutation sur BRCA1 et BRCA2). Il existe également des « prédispositions familiales » qui peuvent être multifactorielles.
- Des facteurs **environnementaux et comportementaux :** radiations ionisantes, travail de nuit, alcool, sédentarité/ alimentation, etc.

- **L'antécédent personnel** de cancer du sein ou de cancer de l'ovaire et/ou de l'endomètre, ainsi que certaines mastopathies à risque, représentent également des facteurs de risque (4).

2. Définitions morphologique, immuno-histochimique et moléculaire des différents types de cancers du sein

Anatomopathologie, immunohistochimie.

Le terme « cancer du sein » regroupe une multitude d'entités clinico-pathologiques avec des présentations, évolutions et pronostics très différents. Les carcinomes infiltrants, quel que soit leur type, se développent, dans la grande majorité des cas, à partir de la cellule luminale dans les unités ductulo-terminales.

En premier est déterminé le type histopathologique, à partir de l'analyse morphologique : la majorité des cancers du sein est de type non spécifique (ex canalaire) (70-80%), qui est un diagnostic par défaut, le deuxième grand type de cancer étant le carcinome lobulaire (10-12%) qui présente comme particularité d'avoir une expression anormale d'une protéine d'adhésion, la E-cadhérine.

Des carcinomes plus rares sont décrits, souvent de bon pronostic : carcinomes tubuleux, mucineux, adénoïdes kystiques, sécrétoires et anciennement les carcinomes médullaires, rares (0.5%) et de présentation très agressive mais de pronostic intermédiaire ; ils sont maintenant considérés comme des carcinomes de type non spécifique « riches en lymphocytes » (5).

Enfin, les carcinomes métaplasiques et lobulaires pléomorphes sont des carcinomes agressifs.

Ensuite, le type de cancer est affiné après détermination du statut des récepteurs hormonaux (œstrogène et progestérone) et du statut HER2, qui représentent des facteurs pronostiques et surtout prédictifs de sensibilité aux traitements systémiques indispensables.

Le seuil de positivité pour les récepteurs hormonaux recommandé par l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) est de 1% de cellules marquées (marquage nucléaire) en immunohistochimie. En France, le seuil retenu est de 10% de cellules marquées pour les récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone (6, 7).

Pour l'évaluation du statut HER2, l'évaluation passe d'abord par l'immunohistochimie ; un cas est considéré comme positif s'il présente un marquage membranaire complet et intense dans plus de 10% des cellules tumorales invasives (10-15% des cas testés). Dans 20 à 25% des cas, le résultat du test est ambigu (2+) ; dans ce cas est effectué un contrôle par une technique d'hybridation *in situ* (8).

Après détermination du statut des récepteurs hormonaux et de HER2, le cancer peut être classé dans une des différentes catégories : hormono-dépendant +/- associé à HER2, HER2+, triple-négatif. Ces différents types tumoraux ont pu être précisés avec l'apport de la biologie moléculaire (9).

Apport de la classification moléculaire.

Au début des années 2000, l'expansion de la biologie moléculaire a conduit à la publication par Perou et coll. (10) et Sörlie et coll. (11) d'une classification des tumeurs du sein selon leur expression génique, grâce à une méthode bioinformatique de clustering hiérarchisé non supervisé. Cette classification, appelée communément « classification moléculaire » ou « classification de Pérou et Sorlie », est basée sur les niveaux d'expression de 1753 gènes et est constituée de 4 sous-types moléculaires : le sous-groupe luminal [caractérisé par l'expression du gène du récepteur à l'œstrogène alpha (*ESR1*) ou RE et de gènes associés à la voie du RE], le groupe HER2 enrichi, caractérisé par la surexpression et l'amplification du gène *HER2*, les tumeurs basal-like qui n'expriment ni les récepteurs hormonaux ni HER2, mais expriment des gènes liées aux cellules basales/myoépithéliales, et un groupe « normal breast-like » dont l'existence a été très débattue et qui semble surtout correspondre au tissu sain présent dans des tumeurs peu cellulaires (10, 11).

Cette classification a ensuite été affinée, séparant notamment le groupe des tumeurs luminales en tumeurs luminales A et B (les tumeurs luminales B ayant une expression du gène du RE, *ESR1*, moins prononcée et une expression plus marquée des gènes de la prolifération) (12).

Enfin, cette classification est disponible de façon simplifiée, permettant son utilisation en routine, par la signature PAM50 faite sur l'analyse de 50 gènes, réalisable en RT-PCR (13).

Transposition à l'immunohistochimie.

Cette classification tumorale ayant des implications thérapeutiques et pronostiques, son utilisation est recommandée ; néanmoins, elle nécessite un certain plateau technique qui n'est pas forcément accessible.

La conférence de consensus de Saint Gallen de 2013 a proposé une classification de ces tumeurs en fonction de critères immunohistochimiques, reprise dans les recommandations de l'ESMO sur la prise en charge des cancers du sein à stade précoce (14, 15) (**tableau 1**).

Sous-type intrinsèque	Correspondance clinico-pathologique
Luminal A	**« Luminal-A like »** RE positif HER2 négatif Ki67 bas (à interpréter selon les valeurs médianes du laboratoire) RP élevé (≥ 20%) Si signature moléculaire évaluant le risque de rechute : risque faible
Luminal B	**« Luminal-B like (HER2 négatif) »** RE positif HER2 négatif ET Ki67 élevé et/ou RP < 20% et/ou haut risque de rechute déterminé par une signature moléculaire **« Luminal B-like (HER2+) »** RE positif HER2 positif Quelles que soient les valeurs du Ki67 et du RP
HER2	**« HER2 + non luminal »** HER2 + Absence d'expression des récepteurs aux hormones
Basal-like	**Cancer du sein triple-négatif** Négativité des récepteurs aux hormones et statut HER2 négatif Expression cytokératines 5, 6, 14
(overlap d'environ 80% entre cancers du sein triple-négatifs et cancers basal-like, mais le groupe triple négatif comprend aussi des sous-types n'exprimant pas les marqueurs basaux et exprimant le Récepteur à l'Androgène) (16).	

Tableau 1 : Table 1. Transposition de la classification moléculaire des cancers du sein à l'immunohistochimie d'après la conférence de consensus de Saint Gallen (14) et l'EPU de pathologie mammaire 2018 (17)

Ainsi, même si les cancers du sein triple-négatifs et les cancers dits « basal-like » sont fréquemment associés, ces 2 termes ne sont pas strictement identiques.

b. Particularités des cancers du sein triple-négatifs

1. Particularités cliniques

Les cancers du sein triple-négatifs représentent environ 15% des cancers du sein, et présentent un profil particulier.

Ils touchent des femmes plus jeunes : âge médian de survenue 53 ans vs 57.7 ans dans les autres sous-types (18), et sont plus fréquents chez les patientes porteuses d'une mutation BRCA1. Il est à noter que les cancers décrits comme « moléculaires apocrine » surviennent chez des patientes plus âgées (19).

Ils sont en général d'une taille plus importante que les autres sous-types, et plus agressifs avec un grade tumoral élevé selon la classification de Elston et Ellis. Du fait de leur agressivité, ils se présentent souvent comme des cancers d'intervalle, entre 2 mammographies.

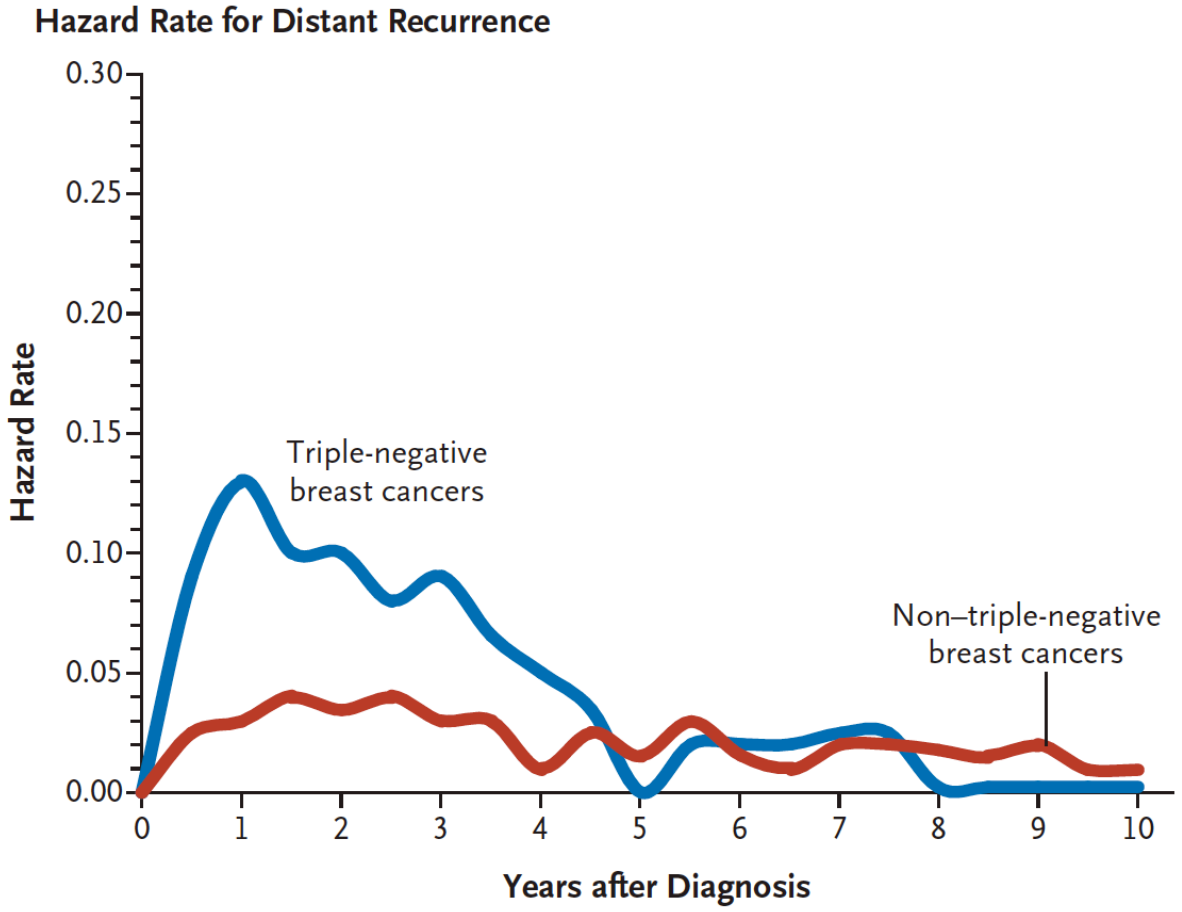


Figure 1 : hazard ratio du risque de récurrence pour les cancers du sein triple-négatifs vs les non triple-négatifs. Figure tirée de Foulkes et al., Triple-Negative Breast Cancer, NEJM 2010

Le risque de rechute pour une tumeur détectée à un stade précoce est élevé puisqu'environ 30% des tumeurs rechutent sous la forme métastatique ; là encore, l'atteinte préférentielle diverge des cancers dits luminaux (atteinte osseuse classique) puisque l'on retrouve plus fréquemment une atteinte viscérale (particulièrement au niveau des poumons et/ou du foie). Cette rechute survient majoritairement dans les 3 années suivant la prise en charge initiale, et est exceptionnelle au-delà de 6 ans – les tumeurs luminales sont connues pour une rechute plus tardive, avec des rechutes métastatiques pouvant survenir 10-20 ans après la prise en charge initiale (20) (**figure 1**).

2. Particularités biologiques

Le groupe des cancers du seins triple-négatifs regroupe des entités biologiques extrêmement hétérogènes.

Du point de vue histologique

Si les cancers du sein triple négatifs de type carcinome canalaire infiltrant sont classiquement de mauvais pronostic, il n'en va pas de même pour tous les types histologiques présentant une négativité des récepteurs aux hormones et une absence d'amplification de HER2. La part de CCI est d'environ 84% au sein des cancers dits « triple-négatifs » : les autres histologies possibles sont les carcinomes métaplasiques, les carcinomes sécrétants, les carcinomes adénoïdes kystiques, les carcinomes adéno-squameux et les carcinomes apocrines avec des pronostics variables selon le type (cf **figure 2**).

Le plus souvent, les tumeurs triple-négatives de haut grade sont des carcinomes infiltrants peu différenciés, sans structure glandulaire identifiable. Les cellules tumorales présentent des atypies nucléaires nettes et peuvent s'organiser autour d'un centre fibreux et nécrotique. Le stroma tumoral peut être de 2 types : soit myofibroblastique (constitué de fibroblastes à différenciation musculaire lisse), ou riche en lymphocytes (17).

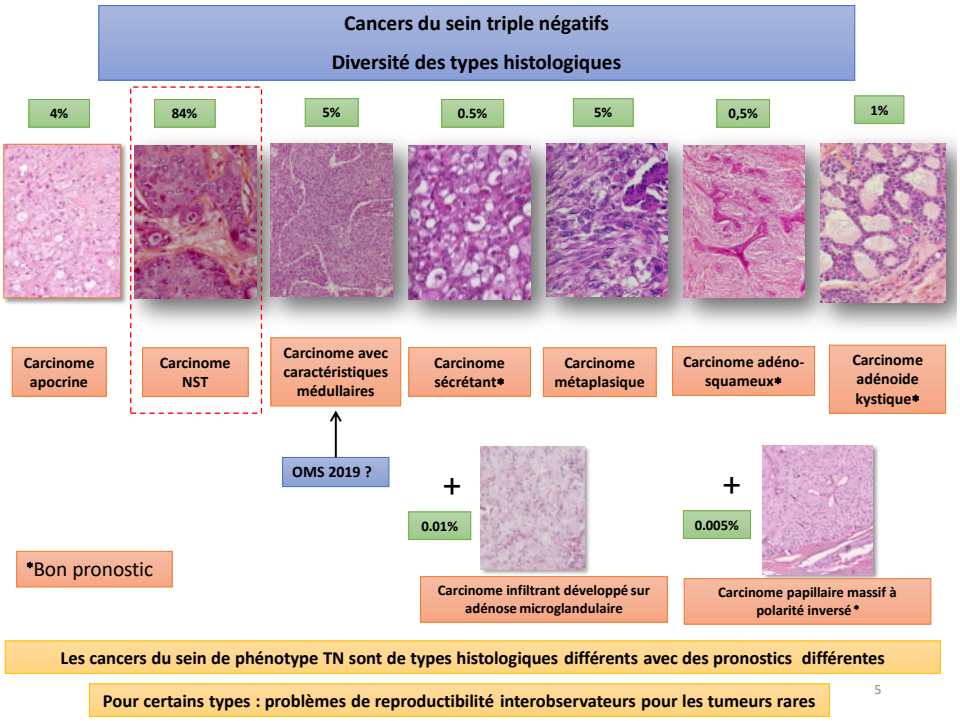


Figure 2 : Diversité des types histologiques des cancers du sein triple-négatifs, diapositive issue du cours sur les cancers du sein triple-négatifs, Gaëtan Mac Grogan.

Du point de vue moléculaire

L'essor des technologie moléculaires a permis à de nombreuses équipes d'étudier plus précisément les caractéristiques de ces tumeurs, mettant en évidence une forte hétérogénéité au sein de l'entité « tumeur triple-négative ».

Ces cancers sont caractérisés par une très grande instabilité chromosomique, avec de nombreuses altérations du nombre de copies d'ADN de faible amplitude, réparties sur l'ensemble du génome ; la présence de nombreux points de cassures le long de la fibre chromatinienne traduit l'existence d'un défaut de réparation de l'ADN double brin. Dans une étude génomique et transcriptomique menée par Curtis et al., les cancers du sein étaient répartis en 10 clusters ; les cancers triple-négatifs étaient très majoritairement répartis entre le **cluster 4**, présentant une **signature immune forte avec infiltrat lymphocytaire élevé**, et le **cluster 10**, de mauvais pronostic, caractérisé par une **haute instabilité génomique et quelques aberrations chromosomiques récurrentes** (perte d'hétérozygotie 5q11, amplifications 7p11.2 (*EGFR*), 7q31 (*caveolin* 1), etc.) (21). Ces variations génomiques induisent des modifications d'expression de certains gènes à distance (activité TRANS), la délétion 5q étant associée à une surexpression de gènes contrôlant le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose – conférant aux tumeurs des capacités de prolifération élevée (21).

Au sein de la classification moléculaire intrinsèque, les cancers du sein triple-négatifs se retrouvent majoritairement (environ 75% des cas) dans le sous-groupe dit « basal » ; les 25% restants se répartissent entre les autres sous-types (5% luminal A, 2.5% luminal B, 8% HER-2 enrichi et 9% dans le groupe « normal-like » dans une publication de Bertucci et al., (22)). Les carcinomes du groupe basal-like sont caractérisés par

- une sous-expression de *ESR1* et des gènes régulés par *RE*α, de *HER2* et de *RA* ;
- et une expression des **gènes de kératines de haut poids moléculaire** (*KRT5, KRT14* et *KRT17* pour les cytokératines CK5, CK14, CK17 respectivement) ainsi que des **gènes liés à la prolifération** via l'activation de *FOXM1, MYC* et *HIF1*α (23).

La mutation la plus fréquente des carcinomes basal-like est la mutation de ***TP53*** (80%) ; ces cancers présentent également souvent une perte de *RB1* et *BRCA1* et une mutation de *PIK3CA* (9%) (24).

Si les cancers du sein triple-négatifs ou les carcinomes basal-like ont été considérés longtemps comme une entité unique, de nombreux auteurs se sont intéressés à les distinguer au point de vue **transcriptomique** afin de mettre en évidence des différences de pronostic, et surtout de rechercher des pistes thérapeutiques plus spécifiques.

Ainsi, **Lehmann, Pietenpol et al**. ont réalisé une analyse clusterisée de 587 cancers du sein triple-négatifs et ont observé 6 principaux sous-types :

- **2 sous-types dits « basal-like 1 et 2 »,** caractérisés par un enrichissement en gènes liés au cycle cellulaire et à la réplication avec un index de prolifération élevé (70% en immunohistochimie vs 42% pour les autres sous-types) ; le type 1 est caractérisé par l'expression de gènes liés à la réparation de l'ADN, tandis que le 2 exprime fortement des facteurs de croissance ;
- un **sous-type « immunomodulatory »**, caractérisé par l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire ;
- un « mesenchymal » et un « mesenchymal stem-like » ;
- un « **luminal-androgen receptor** » (25).

Après micro-dissection et nouvelle analyse, les groupes « immunomodulatory » et « mesenchymal stem-like » ont été supprimés de la classification par les auteurs, puisqu'ils sont en réalité contaminés fortement par des cellules immunitaires et stromales, respectivement (26). Cela montre néanmoins qu'il existe un sous-groupe important de cancers du sein triple-négatifs avec fort infiltrat immunitaire.

Burstein et al. se sont également attachés à étudier les différents sous-types de cancer du sein triple-négatifs, à partir du séquençage ARN de 198 tumeurs ; ils ont mis en évidence 4

groupes – « **Luminal/ Androgen Receptor** », « **mesenchymal** », « **basal-like immune suppressed** » (présentant le pire pronostic) et « **basal-like immune-activated** » présentant une activation des voies de régulation immunitaire (réponse lymphocytaire T et B, cellules NK, facteurs de transcription STAT, etc.) et ayant le meilleur pronostic. Là encore, **ces résultats traduisent une forte implication du système immunitaire dans une grande partie des cancers du sein triple-négatifs** ; la présence d'une signature d'activation immunitaire confère le meilleur pronostic, tandis qu'un phénotype d'immunosuppression est associé au pire pronostic (27).

Enfin, plus récemment, Jiang et al. ont réalisé une analyse « multi-omique » sur une cohorte de 465 patientes asiatiques prises en charge à l'hôpital de Shanghai (données de séquençage type « whole exome sequencing », copy number alterations + séquençage ARN). Leur travail met également en évidence 4 sous-types principaux de cancers du sein triple-négatifs : **LAR (luminal-androgen receptor)**, **immunomodulatory**, **basal-like immune-suppressed (BLIS)** et **mesenchymal-like**. Les mutations ponctuelles retrouvaient des données connues dans le TCGA, à savoir une prédominance des mutations TP53, mais avec une répartition qui différait selon le sous-type (81% dans le sous-type immunomodulatory vs 61% dans le sous-type LAR). Les altérations du nombre de copies d'ADN étaient également différentes d'un sous-type à un autre (les plus fréquentes se trouvant dans le sous-type BLIS) (28).

Ces sous-groupes de cancers triple-négatifs paraissent globalement reproductibles ; dans une étude sur 550 cas de CSTN (issus des cohortes METABRIC et TCGA), Bareche et al. ont reproduit le regroupement proposé par Lehmann et al. pour les sous-types basal-like 1, immunomodulatory, luminal-androgen receptor (LAR), mesenchymal et mesenchymal stem-like. Ils ont pu également montrer que ces sous-types avaient des pronostics différents, le sous-type « LAR » ayant le moins bon pronostic et le sous-type « immunomodulatory » le meilleur pronostic. Enfin, au niveau mutationnel, le sous-type « LAR » était caractérisé par le plus haut niveau de mutation (mutational burden). Les sous-types présentaient des profils mutationnels différents, ainsi qu'un profil d'instabilité génomique différent notamment sur des gènes « driver » du cancer (29). Ces sous-types ont également des réponses différentes à la chimiothérapie, le sous-type « basal-like 1 » ayant un plus fort taux de réponse histologique complète (RHC) post-chimiothérapie néo-adjuvante quand les sous-types « basal-like 2 » et « LAR » présentent les moins bonnes réponses (30).

Au total, les cancers du sein triple-négatifs définis « par défaut » sont en fait des **pathologies très hétérogènes avec des profils moléculaires distincts** ; certains sous-types ont une signature immunitaire marquée.

c. Prise en charge des cancers du sein triple-négatifs

1. Prise en charge des pathologies localisées

La prise en charge des cancers du sein triple-négatifs à un stade localisé repose sur la chirurgie, la radiothérapie, et en cas de tumeur > 5 mm (stade ≥ T1b) la chimiothérapie. Les cancers du sein triple-négatifs étant une entité définie « par défaut » (absence des récepteurs hormonaux et absence d'amplification de HER2), il n'y a pas à ce jour de traitements complémentaires comme l'hormonothérapie ou les thérapies ciblées anti-HER2.

Le déroulement du traitement comprend de plus en plus fréquemment une **chimiothérapie** réalisée de façon **néoadjuvante.** Classiquement considérée comme une modalité permettant d'augmenter le taux de chirurgies conservatrices ou de rendre opérables certaines tumeurs inopérables d'emblée, sans pour autant améliorer la survie globale des patientes, cette modalité est de plus en plus privilégiée ; elle est même **recommandée à partir du stade T2 dans les cancers triple-négatifs** (15). Elle permet en effet une évaluation « in vivo » de la sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie, ainsi qu'une évaluation pronostique (ces points seront rediscutés plus bas) ; de plus en plus d'essais visent à améliorer une réponse non complète par l'ajout de thérapies adjuvantes, en espérant améliorer ainsi la survie des patientes.

Chimiothérapie.

Les cancers du sein triple-négatifs sont généralement de plus grande taille au diagnostic que les autres, et plus agressifs (> 75 % sont de grade 3 selon la classification d'Elston et Ellis). Ils sont également très chimiosensibles. L'ensemble de ces caractéristiques, ainsi que l'absence de thérapie ciblée validée au stade précoce, rend la chimiothérapie quasi systématique pour les stades ≥ T1b et/ou N1 (en l'absence de contexte rendant la balance bénéfices/risques défavorable tel que des comorbidités importantes, etc.), sauf dans les types histologiques rares de bons pronostics (31). **La chimiothérapie néo-adjuvante est la modalité de traitement à privilégier pour les tumeurs > 2 cm et/ou N1 (15).**

En France, le régime de chimiothérapie le plus utilisé est une succession de 2 protocoles, 3-4 cycles d'anthracyclines (Epirubicine ou Adriamycine) + Cyclophosphamide suivis de 3 à 4 cycles de taxanes (Taxol hebdomadaire ou Docetaxel principalement). Dans cette situation, l'utilisation de schémas dits « dose-dense » est de plus en plus privilégiée avec une administration de Cyclophosphamide + anthracycline tous les 15 jours au lieu de 3

semaines, et l'administration de Taxol hebdomadaire. L'utilisation de régimes de chimiothérapie dits « dose-dense » a montré leur supériorité en adjuvant, et semble également bénéfique en néo-adjuvant (32, 33).

D'autres modalités peuvent être discutées, comme l'utilisation de sels de platine ; le Carboplatine a montré une amélioration du taux de réponse histologique complète (RHC) lors de son utilisation dans des protocoles néo-adjuvants, sans que cet avantage ne se transforme en amélioration de la survie globale. Son utilisation pourrait s'évaluer intéressante néanmoins chez des patientes avec stade clinique avancé, facteurs de mauvais pronostic, … mais reste pour l'instant à l'appréciation du prescripteur (34).

Enfin, de nombreux protocoles évaluent actuellement l'utilisation possible d'inhibiteurs de PARP en néo-adjuvant ou adjuvant, ainsi que l'immunothérapie, du fait de leur efficacité dans les situations métastatiques ; ces molécules ne sont pour l'instant pas utilisées en routine clinique.

Lors d'une RHC après chimiothérapie néo-adjuvante, le pronostic des cancers du sein triple-négatifs est très bon et rejoint celui des cancers du sein non triple-négatifs (cf. chapitre III). En cas de maladie résiduelle, une chimiothérapie adjuvante complémentaire à base de Capecitabine peut être proposée suite à l'étude CREATX (35), une étude ayant cependant quelques limites puisque réalisée en Asie (donc résultats à reproduire sur des patientes caucasiennes), avec environ 30% seulement de cancers du sein triple-négatifs.

Actuellement, plusieurs phase III sont en cours afin d'expérimenter des traitements adjuvants dans le contexte de maladie résiduelle après chimiothérapie néo-adjuvante : essai ECOG-ACRIN EA1131 aux Etats-Unis comparant l'utilisation de Xeloda à un platine, essais d'immunothérapie (NCT 02954874 avec le Pembrolizumab), etc. (34)

Chirurgie

Les indications chirurgicales sont les mêmes pour les cancers du sein triple-négatifs que pour les autres types de cancers du sein.

La chirurgie conservatrice (mastectomie partielle, tumorectomie) pourra être proposée dans les cas de tumeurs de petite taille et/ou dans un sein de volume suffisant. L'objectif est d'obtenir des marges de tissu sain d'au moins 2 mm pour l'in situ, et l'absence de carcinome infiltrant au niveau de la berge ; la chirurgie doit permettre un rendu esthétique correct.

En cas de tumeur volumineuse, multifocale ou multicentrique ou de cancer inflammatoire (T4d) ayant répondu à la chimiothérapie, une mastectomie totale sera réalisée.

En cas de mutation BRCA1, les modalités peuvent être discutées avec la patiente en expliquant les risques et le suivi liés à la mutation, la mastectomie totale du sein atteint associée à une mastectomie prophylactique faisant partie des options possibles (36).

Au niveau ganglionnaire, le ganglion sentinelle constitue la référence pour l'exploration axillaire dans les cancers unifocaux T1/T2 et N0 clinique, le risque de lymphœdème du bras étant bien moins important que dans les curages axillaires (inférieur à 10% pour le ganglion sentinelle vs 25% en cas de curage axillaire, voire même 40% si curage associé à une radiothérapie axillaire).

Le curage axillaire est réservé aux situations avec atteintes ganglionnaires cliniques initiales, atteinte ganglionnaire post-chimiothérapie néo-adjuvante, échec de la technique du ganglion sentinelle.

Actuellement, un curage axillaire complémentaire n'est plus recommandé chez les patientes présentant une atteinte d'un à deux ganglions lors de la technique du ganglion sentinelle, en cas de stade clinique T1/T2-cN0, de traitement chirurgical conservateur, et de traitement adjuvant systémique, depuis l'essai ACOSOG-Z0011 (37).

Radiothérapie

Les modalités de la radiothérapie sont déterminées par les facteurs clinico-pathologiques (stade clinique initial, atteinte ganglionnaire, âge de la patiente, grade tumoral, présence d'emboles vasculaires, CCIS étendu) et par le type de chirurgie réalisé. Les modalités sont les mêmes que pour les autres types de cancer du sein, même si les cancers du sein triple-négatifs rentrent souvent dans la catégorie à haut risque.

La radiothérapie du sein après chirurgie conservatrice est très fortement recommandée puisqu'elle réduit le risque de rechute (locale et/ ou à distance) de 15% à 10 ans, mais aussi le risque de mortalité par cancer du sein de 4% à 15 ans (38). La réalisation d'un boost au niveau du lit tumoral améliore encore le pronostic local et est indiqué chez des patientes de moins de 60 ans présentant des facteurs de mauvais pronostic : âge < 50 ans, tumeur de grade 3, présence d'emboles vasculaires, CCIS étendu, chirurgie non R0 (si atteinte des marges très limitées et après discussion en RCP, la reprise chirurgicale devant être privilégiée dans cette situation) (39).

Dans certains cas, la dose du traitement peut être réalisée avec moins de séances dans le cadre d'une radiothérapie hypofractionnée ; cette technique est moins efficace que l'irradiation standard et est donc privilégiée chez des patientes plus fragiles, avec des pathologies à moindre risque de rechute (40, 41).

Après une mastectomie totale, une irradiation de la paroi peut être proposée chez les patientes à haut risque, c'est-à-dire les patientes avec atteinte ganglionnaire (≥ 4 ganglions atteints mais à envisager également entre 1 et 3 ganglions atteints selon les autres facteurs de risque), tumeur initiale au stade T3-T4, atteinte des marges de résection chirurgicale ; cette irradiation réduit le risque de rechute locale et/ ou à distance de 10% à 10 ans, et de décès par cancer de 8% à 20 ans (42, 43).

Enfin, au niveau ganglionnaire, une irradiation des aires ganglionnaires est conseillée en cas d'atteinte ganglionnaire avérée ; l'irradiation axillaire étant très morbide après un curage, elle ne doit être réalisée qu'en l'absence de curage ou si curage avec maladie résiduelle. Les champs ganglionnaires discutés en RCP sont les aires axillaire, sus-claviculaire et la chaîne mammaire interne (44, 45)

2. Prise en charge des maladies avancées/ métastatiques

Au stade métastatique, les cancers du sein triple-négatifs présentent le moins bon pronostic avec une survie médiane de 14.52 mois (IC 95% : 13.7 – 15.24), dans une étude réalisée au sein de la cohorte française ESME (Épidémio-Stratégie Médico-Économique). Cette même étude montre l'absence de franche amélioration du pronostic au cours des dernières années, faute de développement de nouvelles thérapeutiques particulièrement efficaces dans ce sous-type (46), un constat renouvelé récemment sur la même base de données (47).

La **chimiothérapie** reste le traitement principal dans cette situation, avec plusieurs protocoles possibles. La monothérapie reste à privilégier, sauf en cas de nécessité d'obtention d'une réponse rapide (notamment en cas de crise viscérale). Dans cette indication peuvent être utilisée une anthracycline, des taxanes, la Capecitabine, etc. (48) Récemment, l'étude TNT a cherché à comparer l'utilisation de Carboplatine au Docetaxel dans une population de patients avec tumeur triple-négative et/ou présentant une mutation germinale de BRCA 1 ou 2 ; le rationnel de l'étude reposait sur la fréquence accrue des défauts de recombinaison homologue dans ces situations, qui pouvaient les rendre plus sensible à l'utilisation de sels de platine. Une analyse de sous-groupe était planifiée initialement afin d'évaluer l'effet chez les patientes porteuses d'une mutation germinale BRCA, mais aussi dans les tumeurs ayant une expression de BRCA1 altérée (faible présence d'ARN messager ou méthylation de BRCA) ou un phénotype « BRCAness ». Cette étude ne retrouvait pas de supériorité du Carboplatine versus Docetaxel dans la population globale de l'étude, mais mettait en évidence une franche amélioration du taux de réponse globale (ORR 68% vs 33%) et de la PFS (6.8 mois vs 4.4 mois) chez les patientes porteuses d'une mutation germinale de BRCA (49). Au total, le Carboplatine n'apparaissait pas moins efficace que le Docetaxel pour les cancers du sein triple-négatifs tout

venant, avec une tolérance meilleure ; il apparaît particulièrement efficace chez les sujets porteurs d'une mutation BRCA.

Les **anti-angiogéniques** ont montré un bénéfice modeste dans cette indication en 1ère ligne avec une amélioration du taux de réponse objective et de la survie sans progression, sans amélioration de la survie globale (50). Le Bevacizumab peut être proposé en association à une chimiothérapie par taxanes (supériorité par rapport à l'association à la Capecitabine (51)), mais n'est pas strictement recommandé du fait de l'absence de facteurs connus de réponse au traitement (52).

Les **inhibiteurs de PARP** ont montré leur efficacité chez les patients porteurs d'une mutation BRCA 1 ou 2 dans les études EMBRACA (Talazoparib) (53) et OlympiAD (Olaparib) (54) et ont maintenant l'AMM dans les situations métastatiques avec mutation germinales (ou somatiques pour Talazoparib).

Les cancers du sein triple-négatifs présentent une particularité : ils sont, en fait, majoritairement quadruple-négatifs. Plus d'un tiers de ces tumeurs expriment en effet le **récepteur aux androgènes**, qui peut être sélectivement ciblé avec l'utilisation d'anti-androgènes (pour l'instant dans le cadre d'essais cliniques) (55).

3. Cas particulier de l'immunothérapie.

L'essai IMpassion 130, testant l'Atezolizumab en combinaison avec le Nab-paclitaxel chez des patientes avec cancer du sein triple-négatif métastatiques, a montré un bénéfice en survie sans progression et survie globale chez un sous-groupe de patientes exprimant PD-L1, conduisant en France à une ATU de cohorte (56, 57). Malheureusement, le taxane utilisé dans IMpassion 130 était le Nab-paclitaxel ; la tentative de validation d'un schéma tel qu'utilisé en France à base de Paclitaxel s'est soldée par une étude négative, IMpassion 131 (58), conduisant à l'arrêt de l'ATU. Cependant, 2 autres études avec le Pembrolizumab ont démontré récemment son efficacité, tant en situation métastatique (59) qu'en situation néo-adjuvante (60). Si le Pembrolizumab n'est pas encore indiqué en France dans ces situations, il a fait l'objet de 2 autorisations successives par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis en novembre 2020 pour la situation métastatique, et très récemment en juillet 2021 pour la situation néo-adjuvante.

Le fait que le cancer du sein triple-négatif soit le premier sous-type de cancer du sein où une immunothérapie est validée n'est pas un hasard ; l'étude extensive du

microenvironnement tumoral réalisé ces dernières années a permis de montrer qu'il s'agit d'un cancer particulièrement immunogène. Le chapitre suivant va s'attacher à décrire plus en détail l'immunité et le développement d'une réponse immunitaire dans le cancer, et le cas particulier du microenvironnement tumoral des cancers du sein triple-négatifs.

II. Le microenvironnement immunitaire de la tumeur.

a. Rappels fondamentaux sur l'immunité.

Le système immunitaire joue un rôle majeur pour prévenir et/ou éradiquer les infections mais aussi pour éliminer les cellules anormales et donc empêcher l'apparition et/ou la prolifération tumorale. Il se déclenche en présence de signaux particuliers : « pathogen associated molecular patterns » ou PAMPS, « damages associated molecular patterns » ou DAMPS, ou en cas de présence d'antigènes du non-soi.

2 types de réponses coexistent et se complètent : l'immunité **innée** et l'immunité **acquise** ou **adaptative.**

1. L'immunité innée

L'immunité innée correspond à une réponse d'action immédiate et non spécifique de l'agent pathogène ; elle repose sur la reconnaissance des signaux type PAMPs ou DAMPs par des cellules disposant de récepteurs spécifiques, appelés « pathogen recognition receptors » ou PRRs. Elle passe par des **mécanismes humoraux** (cytokines, complément, etc.) et par des **cellules** (cellules « Natural Killer » ou NK, macrophages, granulocytes) dont l'action s'effectue par contact direct (phagocytose, action lytique). Un autre rôle des cellules de l'immunité innée est la **présentation antigénique**, principalement effectuée par les **cellules dendritiques.**

Cellules polynucléées

Il s'agit de la famille des polynucléaires, se partageant en 3 catégories : les **neutrophiles**, les **éosinophiles** et les **basophiles**. Les polynucléaires neutrophiles sont les plus fréquents au niveau de la circulation sanguine ; ils ont un rôle de **phagocytose** et jouent un rôle majeur dans l'inflammation aiguë.

Cellules mononucléées

Les **monocytes** sont retrouvés dans le sang périphérique avant de migrer dans les tissus où ils se différencient en **macrophages**. Ces cellules sont essentiellement des cellules **phagocytaires** mais elles peuvent dans certaines circonstances jouer le rôle de **cellules présentatrices d'antigène.**

Les **cellules dendritiques** ont comme fonction principale la présentation antigénique ; elles captent des antigènes en périphérie, et les transportent vers les organes lymphoïdes secondaires pour initier la réponse immunitaire.

Les **lymphocytes NK** (pour « natural killer ») reconnaissent des cellules tumorales ou infectées, du fait de l'expression aberrante de molécules CMH de type I à leur surface.

2. L'immunité adaptative.

L'immunité adaptative est une réponse spécifique d'un **antigène**, elle est plus longue à se mettre en place mais est ensuite responsable d'une **mémoire** permettant une réponse plus rapide à réexposition. Elle est réalisée par les lymphocytes (essentiellement B et T).

Les lymphocytes T

Les lymphocytes T reconnaissent des antigènes présentés par des cellules présentatrices d'antigènes ou CPA via le complexe majeur d'histocompatibilité (ou CMH) via leur récepteur spécifique TCR (pour T-cell receptor).

Lors de la reconnaissance d'un antigène, le TCR est associé au **CD3**, responsable de la transduction du signal dans le lymphocyte. Il existe 2 grands types de TCR : αβ (largement majoritaire) et γδ (< 10% des cellules ; rôle frontière entre immunité innée et adaptative).

Les lymphocytes T classiques αβ se différencient dans le thymus et peuvent présenter la molécule **CD4** (lymphocytes auxiliaires) ou la molécule **CD8** (lymphocytes cytotoxiques) qui précise leur fonction. Enfin, certains lymphocytes expriment également les molécules CD56 et CD16 pour un phénotype de lymphocytes T NK.

Certains lymphocytes sont dits **régulateurs** ; leur fonction physiologique est d'empêcher la reconnaissance d'antigènes du soi par les lymphocytes T effecteurs et donc d'éviter la destruction du « soi » tel qu'on peut le voir dans les **pathologies auto-immunes.** Ces lymphocytes T expriment le phénotype **CD4+, CD25+** et **FOXP3.**

Les lymphocytes B

Les **lymphocytes B** reconnaissent l'antigène qui leur est spécifique sans intermédiaire (pas de présentation avec une molécule de CMH) via leur **immunoglobuline de surface** qui joue le rôle de récepteur (**BCR** pour B-cell receptor) ; ils représentent 5 à 15% des lymphocytes circulants.

Après activation, les lymphocytes B se différencient en **plasmocytes** qui sécrètent des anticorps.

Les lymphocytes B sont caractérisés par l'expression de la protéine **CD19** à leur surface.

b. Le microenvironnement immunitaire dans les cancers

1. Le changement de paradigme : d'une cellule isolée à une tumeur au sein de son microenvironnement.

Le cancer a longtemps été considéré comme une pathologie avant tout clonale, ne tenant pas compte des interactions potentielles avec son environnement, et dont les caractéristiques étaient l'acquisition progressive par les cellules tumorales de 6 compétences : indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, insensibilité aux signaux inhibiteurs, résistance à la mort cellulaire programmée, réplication illimitée, effet pro-angiogénique et capacité d'invasion et de métastases (61).

Une meilleure compréhension de la tumeur en tant « qu'organe » à part entière, ayant des interactions complexes avec son environnement, a conduit à la prise en compte du **microenvironnement tumoral** et des populations cellulaires le supportant : fibroblastes, cellules endothéliales, péricytes mais aussi et surtout **des cellules du système immunitaire (62)** (**figure 3** : les Hallmarks du cancer par Hanahan et Weinberg, revus en 2011)**.**

Les tentatives de traitement du cancer par de l'immunothérapie ne sont pas nouvelles, le premier vrai traitement d'immunothérapie ayant été l'administration d'interleukine 2 (IL-2, un facteur de croissance des lymphocytes T) avec un taux de réponse complète de 5 à 10% et un taux de réponse globale de 16 à 20% chez les patients atteints de mélanomes ou cancers rénaux (63, 64). Presque 20 ans plus tard et après divers essais autres (interleukines, vaccins,

virus oncolytiques, …), l'arrivée **des inhibiteurs de checkpoints immunitaires** a bouleversé la prise en charge des patients atteints de mélanomes et de cancers du poumon non à petites cellules (65, 66) et s'étend progressivement à de nombreuses autres localisations (ORL, cancers urothéliaux, cancers du sein triple-négatifs, …).

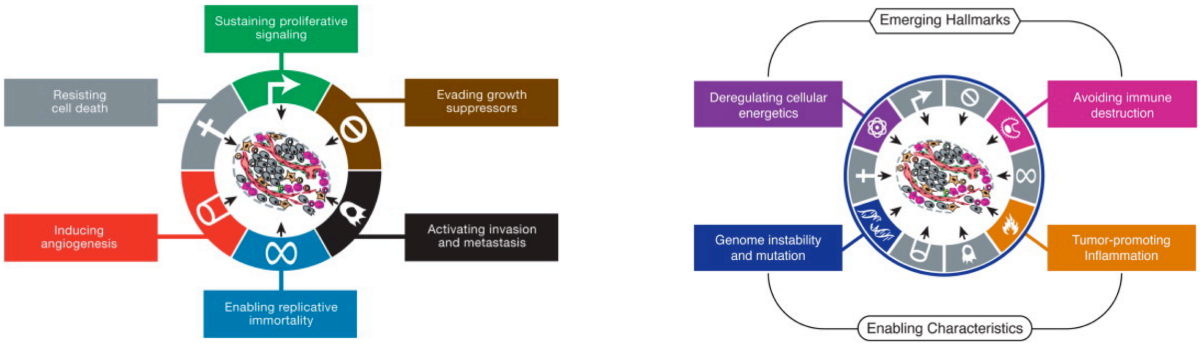


Figure 3 : les 6 "hallmarks" ou compétences du cancer proposées en 2000 et les 4 nouvelles compétences prises en compte, Hanahan and Weinberg, "Hallmarks of cancer : the next generation", Cell 2011

2. Bases de l'immunité anti-tumorale

Le système immunitaire était suspecté depuis longtemps d'être un acteur impliqué dans le développement d'une tumeur solide ; Dunn et al. proposent en 2004 la théorie de l'immunoédition ou « les 3 E » de la réponse anti-tumorale (67) (**figure 4**) :

- **Élimination :** 1ère phase, pouvant permettre l'élimination totale des cellules anormales et empêcher le développement d'une pathologie tumorale. Les cellules de l'immunité innée détectent des signaux de danger et initient une réponse anti-tumorale, avec recrutement cellulaire, productions cytokiniques, libération d'antigènes et donc présentation antigénique et recrutement des cellules de l'immunité adaptative aux propriétés effectrices (cf paragraphe suivant).
- **Équilibration :** Mise en place d'un équilibre dynamique, entre les cellules tumorales ayant réussi à survivre à la première phase et les cellules du système immunitaire. Cette phase peut théoriquement durer plusieurs années.
- **Échappement :** les cellules tumorales parviennent à se développer malgré la présence du système immunitaire, en développant des capacités pour échapper à la détection et/ou à la destruction induite par le système immunitaire (mécanismes listés ci-dessous).

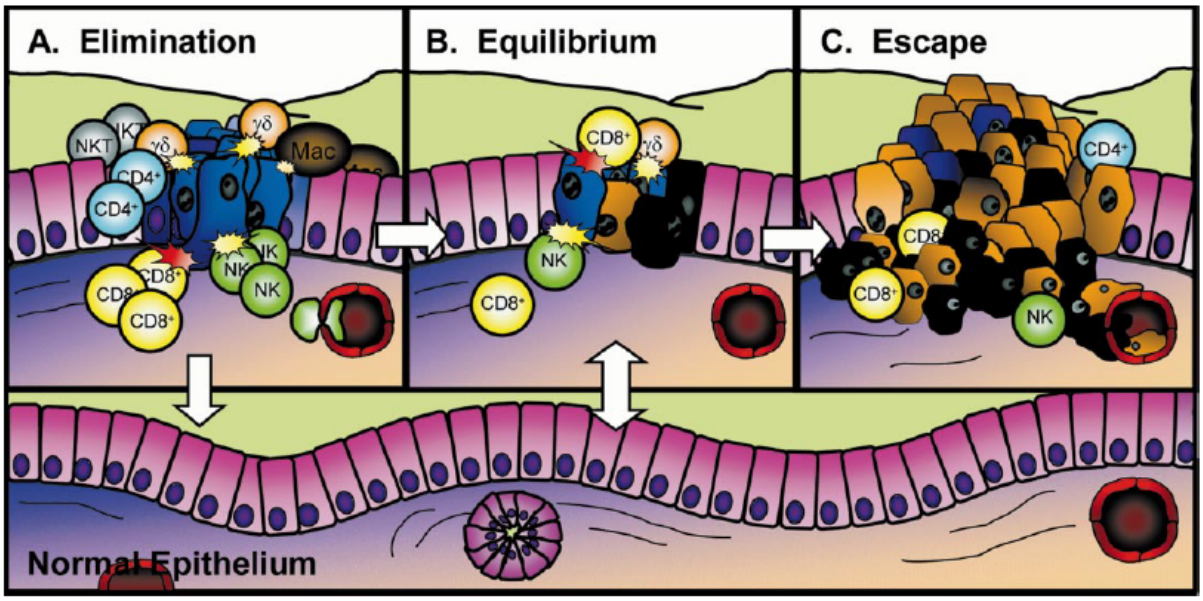


Figure 4 : Les 3 Es de la réponse immunitaire anti-tumoral, figure tirée de l'article "The 3 Es of Immunoediting" de Dunn et al.

Développement d'une réponse lymphocytaire anti-tumorale.

La tumeur va exprimer et/ou libérer des **néo-antigènes**, qui vont être reconnus par les cellules du système immunitaire inné. Parmi elles, les cellules dendritiques vont capturer les antigènes afin de les processer et de les présenter à leur surface, complexés au CMH, tout en migrant vers les ganglions lymphatiques (étapes 1 et 2 sur la **figure 5**). Les antigènes y sont ainsi présentés aux lymphocytes T CD4 et TCD8 qui les reconnaissent via leur TCR (étape 3, **figure 5**).

La rencontre d'un TCR avec son antigène aboutit à la formation d'une **synapse immunologique** qui aboutit à l'activation du lymphocyte par 3 types de signaux :

- Un signal de stimulation passant par la protéine transmembranaire CD3, complexée au TCR ;
- Un **signal de costimulation** indispensable à l'activation du lymphocyte, dont l'étude a permis le développement des premières immunothérapies anti-tumorales réellement efficaces (anti-CTLA4, anti-PDL1).
- Un renforcement de la réponse médié par des cytokines.

Le lymphocyte T activé se déplace vers la tumeur (étape 4, **figure 5**) et infiltre celle-ci (étape 5, **figure 5**), reconnaît sa cible (étape 6, **figure 5**) et la détruit (étape 7, **figure 5**), libérant d'avantage d'antigènes tumoraux (68).

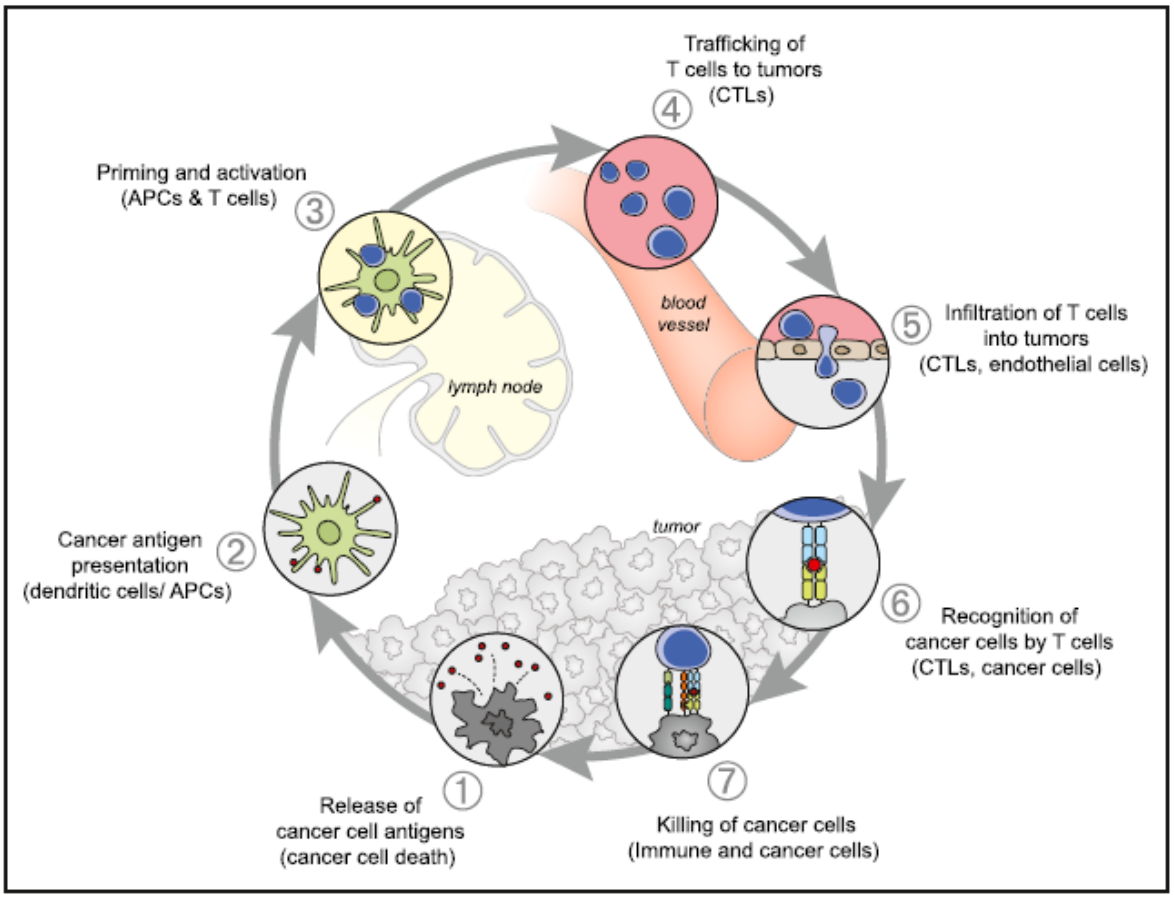


Figure 5 : le cycle de l'immunité anti-tumorale (description dans le paragraphe ci-dessus), Chen and Mellman, "Oncology meets immunology : the Cancer-Immunity Cycle"(68)

Freins au développement de la réponse anti-tumorale ou « échappement » des 3Es.

Le système immunitaire joue un rôle dans la réponse anti-tumorale, et pendant longtemps la progression tumorale a été perçue comme un « simple » échappement de la tumeur à l'action du système immunitaire.

La progression tumorale d'un point de vue immunologique est bien sûr plus complexe que cela, car la tumeur est à la fois capable d'échapper à la vigilance du système immunitaire, mais également de détourner ses fonctions immunorégulatrices/ immunosuppressives à son avantage.

Dans un article intitulé « surveillance immune antitumorale et échappement », F. Ghiringhelli propose de résumer les mécanismes d'échappement en 2 grandes catégories : **immunosélection** et **immunosubversion (69).**

L'immunosélection est la sélection, par le système immunitaire, de cellules tumorales à faible immunogénicité – en effet, ce sont les seules à survivre puisqu'elles ne peuvent pas

être détruites par les cellules cytotoxiques du système immunitaire. Il existe plusieurs façons pour les cellules tumorales de ne plus être reconnues par le système immunitaire :

⇒ Absence de reconnaissance par les cellules T cytotoxiques par perte de TAP1 ou des molécules du CMH de classe 1 et/ou perte de la capacité de réponse à l'IFNγ, ou perte de l'expression des antigènes tumoraux à leur surface ;

⇒ Perte de la reconnaissance par les cellules NK par perte des ligands activateurs de ces cellules (69).

L'immunosubversion, de plus en plus largement étudiée, est le détournement des fonctions du système immunitaire par la tumeur avec la création d'un microenvironnement hautement immunosuppressif. Les cytokines sécrétées par la tumeur recrutent des cellules telles que T régulateurs (Tregs), cellules myéloïdes suppressives (MDSCs pour myeloid-derived suppressor cells), etc. mais contribuent également à induire un switch phénotypique des cellules déjà en place : par exemple, macrophages et neutrophiles passent d'un phénotype de type 1 (effecteurs cytotoxiques du système immunitaire) à un type 2, immunosuppressif. Ces cellules immunosuppressives recrutées ou induites contribuent à l'entretien de cet environnement en sécrétant à leur tour des cytokines immunosuppressives.

Plus qu'un rôle immunologique, cet environnement possède de nombreuses fonctions pro-tumorales :

- Promotion de l'invasion tumorale,
- Préparation des niches métastatiques,
- Promotion de la transition épithélio-mésenchymateuse,
- Induction de l'angiogenèse, etc. (70)

La présence de ces cellules immunosuppressives pourrait expliquer en partie les échecs des immunothérapies actuelles ; le développement de molécules pour cibler cet environnement, ou l'utilisation de molécules existantes (acide tout trans-rétinoïque, sunitinib, etc.) fait l'objet de nombreuses études cliniques.

c. Le microenvironnement immunitaire du cancer du sein triple-négatif

Le cancer du sein a longtemps été considéré comme une tumeur faiblement immunogène, du fait d'un infiltrat lymphocytaire moins marqué que des tumeurs comme les cancers du poumon ou les mélanomes. Néanmoins, le cas du cancer du sein triple-négatif a fait l'objet de nombreuses études du fait d'une plus forte immunogénicité. En effet, **de 4.4 à 10.6 % (voire 30%) des cancers du sein triple-négatifs sont considérés**

comme à prédominance lymphocytaire (« lymphocytes predominant breast cancer » ou LPBC), traduisant un infiltrat considéré à plus de 50 ou 60% (selon les études) de cellules lymphocytaires (71-73), quand cela ne concerne que 5.4 % des cancers du sein tous sous-types confondus, et 2.9% des tumeurs hormono-sensibles (74). Il est à noter que dans le mélanome, le taux de tumeur à prédominance lymphocytaire atteint moins de 20% des tumeurs, contre 35% de tumeur présentant une absence totale d'infiltrat.

Cette plus forte immunogénicité est partiellement expliquée par une instabilité génomique plus importante du sous-type triple-négatif par rapport aux sous-types luminaux, avec la génération théorique d'un plus grand nombre de néo-antigènes susceptibles de déclencher la réponse immunitaire (75).

1. Rôle pronostique, rôle prédictif

Cet infiltrat lymphocytaire plus marqué constitue à la fois un outil pronostique et un outil prédictif de la réponse au traitement néo-adjuvant.

Sur le plan pronostique, l'abondance de l'infiltrat lymphocytaire est corrélée à une meilleure survie sans rechute et à une meilleure survie globale chez les patientes atteintes de tumeurs triple-négatives (76). Cette amélioration du pronostic est visible aussi bien lorsque l'on sépare l'infiltrat en plusieurs groupes (infiltrat faible, moyen, élevé) que lorsque l'on utilise la variable « TILs » comme une variable continue (73). Les TILs ont un rôle pronostique lorsqu'ils sont mesurés sur la biopsie avant traitement néo-adjuvant, mais également lorsqu'ils sont présents sur la pièce opératoire avant traitement adjuvant (71) ou sur le résidu tumoral après traitement néo-adjuvant, où leur rôle pronostique est particulièrement marqué dans les tumeurs à plus haut risque de rechute (persistance d'une atteinte ganglionnaire et/ou résidu tumoral > 2 cm) (77, 78). Dans les autres sous-types tumoraux, les TILs ont été associés à une meilleure survie sans rechute dans les tumeurs HER2+ dans l'étude de Denkert et al. (73) ; le rôle des TILs dans les tumeurs hormono-dépendantes est moins clair, l'étude de Denkert et al. retrouvant un rôle délétère des TILs sur la survie globale, tandis que Loi et al. ne retrouvent pas d'association significative des TILs avec le pronostic chez ces patientes (72, 73).

Toujours pour les tumeurs triple-négatives, l'abondance de TILs dans la biopsie avant traitement néo-adjuvant conventionnel est systématiquement corrélée à une meilleure réponse à la chimiothérapie et à l'obtention d'une réponse complète histologique (ou « pCR », pathologic complete response) (79-81).

2. Principaux acteurs immuns

Comme vu plus haut, l'environnement immunitaire de la tumeur est complexe et peut être composé d'acteurs aussi bien effecteurs de la réponse immune anti-tumorale, que d'acteurs immunosuppressifs permettant l'induction d'une tolérance de la tumeur, comme représenté sur la **figure 6**. L'ensemble de ces interactions peut donc difficilement être capturé par une mesure « simple » de l'infiltrat lymphocytaire au sein du stroma et/ou de la tumeur, ce qui a conduit certains auteurs à proposer une analyse plus poussée du microenvironnement : marquage de cellules spécifiques (T CD8+, T CD4+, expression de FOXP3 seule ou associée aux marquages CD4/CD25 des lymphocytes T régulateurs, CD163 ou CD68 pour les monocytes/ macrophages, etc.).

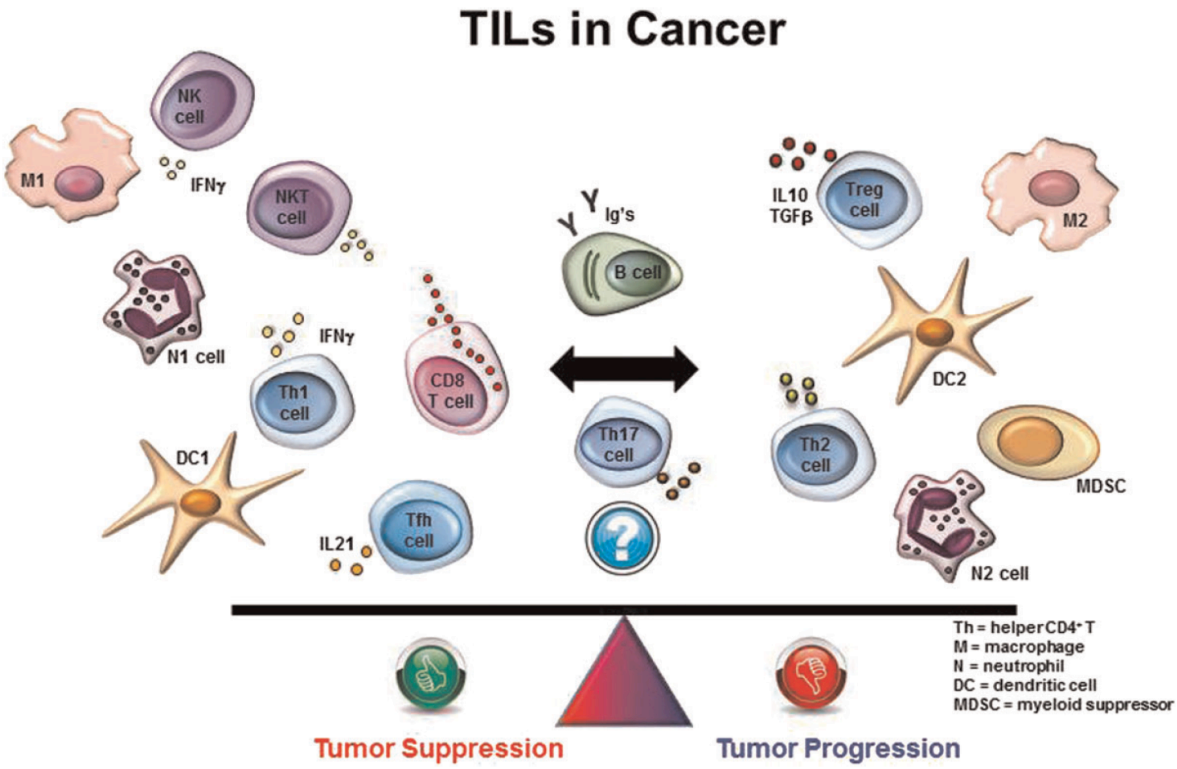


Figure 6 : les différents types cellulaires à l'œuvre dans le microenvironnement tumoral et leur rôle, image tirée de Salgado et al.(82)

Populations lymphocytaires du microenvironnement des CSTN

Les lymphocytes T CD8+, une fois activés, se différencient en lymphocytes T cytotoxiques ayant la capacité de détruire les cellules tumorales. Leur présence est retrouvée dans environ 60% des CSTN (74), à des degrés variables, et est associée à un bon pronostic

(83, 84). Les lymphocytes T CD4+ représentent une population extrêmement hétérogène avec de nombreuses fonctions. Les lymphocytes T régulateurs, définis par un phénotype CD4+CD25+FOXP3+, sont connus pour réguler et supprimer la réponse immunitaire ; ils devraient en théorie être associés à un pronostic défavorable. Néanmoins, leur recrutement est probablement augmenté sur des sites de réponse immunitaire, comme « rétrocontrôle », rendant leur présence de bon pronostic (74, 85). Enfin, les lymphocytes B sont également présents et sont corrélés à l'infiltrat lymphocytaire global, l'infiltrat en TCD4 et TCD8 ; leur présence signe un meilleur pronostic (86, 87).

Populations myéloïdes du microenvironnement des CSTN

Les populations myéloïdes présentes au sein du microenvironnement tumoral des CSTN sont globalement associées à un mauvais pronostic, même si leur rôle est moins étudié à ce jour. Les macrophages associés à la tumeur (TAM pour « tumor-associated macrophages ») sont connus pour être de 2 types : type 1, effecteur de la réponse immune et impliqué dans la présentation antigénique, et type 2, associés à la suppression immunitaire, l'angiogenèse et la progression tumorale – identifiés entre autres marqueur par le CD163. Dans le cancer du sein triple-négatif, les macrophages recherchés en immunohistochimie par l'expression de CD68 ou CD163 ont un rôle pronostique mal définis, tantôt de mauvais pronostic (88), tantôt de bon pronostic (89). Cela est probablement dû au fait qu'il existe un continuum entre les phénotypes M1 et M2, et qu'il est aujourd'hui difficile de différencier ces 2 phénotypes en routine clinique (90). Les neutrophiles intra-tumoraux sont également associés à un mauvais pronostic, de même que le ratio neutrophiles/lymphocytes au niveau sanguin (91, 92).

3. Méthodes de caractérisation du microenvironnement

Anatomo-pathologie et immunohistochimie

Le microenvironnement tumoral est un milieu complexe, dont les premières approches pour le caractériser consistaient en un compte lymphocytaire au niveau du stroma et/ou de la tumeur sur des lames tumorales HES.

Ces approches sont aujourd'hui bien codifiées par l'International TILs Working Group afin d'harmoniser les pratiques et de limiter au maximum la variabilité inter-pathologiste : sélection de la zone tumorale, type de cellules à prendre en compte, localisation (stromale essentiellement, vs tumorale), méthode de quantification (variable continue en pourcentage

plutôt qu'une variable binaire élevée vs basse) ; plus récemment, des indications sur l'évaluation des TILs sur le résidu tumoral après chimiothérapie ont été ajoutées (82, 93).

Le compte total de l'infiltrat en lymphocytes n'est cependant pas suffisant pour rendre-compte des interactions de la tumeur avec son microenvironnement : ainsi, les différents acteurs du système immunitaire peuvent être détaillés via des marquages immuno-histochimiques (anticorps anti-CD3, CD8, CD4, etc.).

Étude du transcriptome

Plus récemment, la réponse immunitaire a fait l'objet d'études s'intéressant au transcriptome des tumeurs et de leur stroma. Ainsi, Denkert et al. ont mené une étude s'intéressant à des TILs sur des biopsies de patientes ayant des CSTN et des cancers du sein HER2+ ; ils retrouvaient une corrélation entre l'infiltrat lymphocytaire et l'expression de mARN aussi bien associés à l'activation immunitaire (CXCL9, CCL5, CD8A, CD80, CXCL13, IGKC2, CD21) qu'à l'immunosuppression (IDO1, PD1, PDL1, CTLA4, FOXP3). Les TILs comme l'activation de tous ces mARN étaient corrélés à l'obtention d'une réponse complète histologique (80).

L'analyse transcriptomique permet d'obtenir de nombreuses informations ; le développement de techniques de pointe comme le Nanostring a comme avantage l'obtention de données reproductibles et moins soumises à des variations d'interprétation. Les inconvénients sont les coûts des techniques, et le fait qu'une activation de la transcription n'est pas forcément traduite par une meilleure représentation de la protéine. L'apport des données transcriptomiques fait l'objet d'un paragraphe détaillé dans le chapitre 4.

Imagerie multiplexe

Une approche spatiale est également envisagée pour mieux appréhender l'organisation de la réponse immunitaire au sein de la tumeur ; Keren et al. ont par exemple développé un scanner multiplexe et ont effectué une description de l'environnement immunitaire de tumeurs triple-négatives. L'utilisation d'une imagerie multiplexe permettait notamment de trouver 2 modes d'organisation de la réponse immunitaire (compartimentalisée/ dispersée au sein de la tumeur), impactant le pronostic des patientes (le pronostic étant meilleur lorsque la réponse tumorale s'organisait de façon compartimentée au niveau du front d'invasion tumoral). Ce type de scanner permet également de réaliser des marquages simultanés et d'étudier de façon plus efficaces les différentes populations en place ; les auteurs ont constaté que la composition de l'infiltrat

immunitaire était corrélée à son abondance (plus l'infiltrat est dense, plus il est riche en lymphocytes ; moins il est dense, plus il contient des macrophages) (94). Gruosso et al. ont utilisé la technique de micro-dissection laser pour étudier spécifiquement les fonctions et pronostics des populations cellulaires du microenvironnement en fonction de leur localisation (épithéliale, stromale) (85). Plusieurs types d'imageries multiplexes sont actuellement mises au point.

III. Traitement néo-adjuvant : évaluation de la réponse et particularités des cancers du sein triple-négatifs.

a. Évaluation de la réponse après chimiothérapie néo-adjuvante.

Après chimiothérapie néo-adjuvante, la réponse peut être évaluée par examen clinique ou imagerie, mais c'est l'évaluation de la réponse lors de l'examen histologique de la pièce opératoire (sein + aire ganglionnaire axillaire homolatérale) qui est la méthode la plus précise. Plusieurs scores existent pour évaluer la réponse au traitement.

La pièce opératoire arrive au laboratoire orientée par le chirurgien ayant réalisé l'exérèse. Elle est alors mesurée et encrée (une couleur différente sur chaque face) afin de permettre une évaluation précise des marges. Après fixation, la pièce est coupée en tranches de 3-5 mm.

En cas de présence d'un reliquat tumoral, l'examen histologique comprendra en premier lieu la mesure du grand axe tumoral ainsi que la distance minimale aux berges en millimètres. L'examen s'attachera aussi à déterminer le type histologique (cohérence avec la biopsie pré-traitement ?), le compte mitotique, la cellularité de la tumeur résiduelle, la présence de carcinome in situ, la présence d'emboles vasculaires. En l'absence de reliquat visible macroscopiquement, la pièce sera échantillonnée de la façon la plus exhaustive possible. S'il persiste un reliquat à l'analyse microscopique, celui-ci sera mesuré ; en l'absence de reliquat seront recherchés des signes de remaniements inflammatoires, notamment au niveau ganglionnaire (95), et la présence d'un éventuel clip.

Des recommandations ont été éditées en 2015 pour standardiser l'évaluation de la réponse au traitement. En effet, de nombreuses classifications existent et étaient utilisées simultanément, avec des définitions de la RHC différentes, avec des variations constatées sur le pronostic. Ces recommandations préconisent tout particulièrement la classification ypTN de l'AJCC et l'utilisation du score residual cancer burden (RCB) du MD Anderson (ou au moins, la description des différents items nécessaires au calcul du score) (96, 97).

Les scores décrits ci-dessous étaient ceux régulièrement utilisés à l'institut Bergonié lors de la prise en charge des patientes de la cohorte.

1. Classification de Chevallier

La classification de Chevallier étudie la réponse sur le sein et les ganglions lymphatiques. Elle est composée de 4 classes :

⇒ Classe 1 : rémission complète = disparition tumorale complète macroscopique et microscopique dans le sein et l'aisselle.
⇒ Classe 2 : carcinome in situ, pas d'atteinte ganglionnaire.
⇒ Classe 3 : carcinome invasif avec altération stromale.
⇒ Classe 4 : rares altérations ou absence d'altérations des cellules tumorales.

La classe 2 est également considérée comme une rémission complète. La classe 3 est une classe très hétérogène comprenant aussi bien de bonnes répondeuses avec un reliquat minime et altéré, que des patientes avec une régression tumorale de moins de 50% (98).

2. Score de Sataloff

Le score de Sataloff étudie également la réponse sur le tissu mammaire et les ganglions lymphatiques. Pour le sein comme pour les ganglions, la réponse est déclinée en 4 items de A à D.

Sein :
⇒ TA : effet thérapeutique total ou pratiquement total.
⇒ TB : effet thérapeutique supérieur subjectivement à 50%.
⇒ TC : moins de 50% d'effet thérapeutique mais effet évident.
⇒ TD : pas d'effet thérapeutique.
Ganglions :
⇒ NA : effet thérapeutique évident, pas de métastases.
⇒ NB : pas d'effet thérapeutique, pas de métastases.
⇒ NC : aspects d'effet thérapeutique, mais présence de métastases.
⇒ ND : pas d'effet thérapeutique, métastases viables.

Cette classification tient compte de l'effet thérapeutique. Les auteurs ont mis en évidence une survie prolongée des patientes présentant une réponse histologique complète (99).

3. Score RCB du MD Anderson.

S'il apparaissait de plus en plus que la réponse histologique complète était un facteur de bon pronostic, il manquait néanmoins un score fiable et reproductible pour évaluer le pronostic à l'issue d'un traitement néo-adjuvant.

En 2007, Symmans et al. proposaient leur score « residual cancer burden » ou RCB comme une évaluation pronostique reproductible de la réponse après traitement systémique. Ce score était construit à partir de plusieurs données associées de façon significative au pronostic, de façon indépendante : les **2 plus grandes dimensions de la tumeur résiduelle**, la **proportion du lit tumoral présentant du carcinome invasif**, le **nombre de ganglions positifs** et le **diamètre de la plus grande métastase ganglionnaire**. Le score obtenu permet de classer les patients en 4 catégories : **RCB 0** qui correspond à la réponse histologique complète, **RCB I** (résidu minimal, dont le pronostic semble proche de la réponse complète histologique) ; **RCB II** (résidu modéré) et **III** (résidu extensif) (100).

10 ans plus tard, les auteurs validaient l'intérêt pronostique et la reproductibilité de leur score sur plusieurs cohortes néo-adjuvantes sur les différents sous-types de cancers du sein ; pour les cancers du sein triple-négatifs ou aux récepteurs hormonaux positifs (non HER2), le RCB apparaissait comme un facteur pronostique indépendant dans les modèles multivariés (101).

Ce score peut être calculé en ligne : www.mdanderson.org/breastcancer_RCB.

b. Cas particulier de la réponse histologique complète (RHC)

1. La RHC dans les cancers du sein

La réponse complète histologique désigne l'absence de maladie invasive résiduelle après chimiothérapie néo-adjuvante ; sa définition exacte a fait l'objet de nombreux débats. Elle est acceptée depuis 2014 comme « surrogate marker » par la Food and Drugs Administration (FDA) pour les essais cliniques en néo-adjuvant (102).

Elle est définie par la stadification ypT0/is, ypN0 selon l'AJCC (96, 97), soit l'absence de maladie invasive résiduelle au sein du parenchyme mammaire et des ganglions axillaires. La présence de carcinome in situ a longtemps fait débat, et certaines études ont retrouvé un rôle pronostique défavorable de l'in situ comme Von Minckwitz et al. (103) ; néanmoins cette différence n'étant pas significative sur la survie globale, la présence d'in situ est acceptée dans la définition de la réponse complète histologique (104). La présence d'une atteinte ganglionnaire a par contre montré à de nombreuses reprises un pronostic moins favorable.

Le rôle de la réponse histologique complète semble varier selon les sous-types ; l'amélioration de la survie globale chez les patientes en réponse complète était surtout montrée chez les patientes avec des sous-types agressifs et non luminaux. Plusieurs études montrent ainsi une amélioration de la survie globale chez les patientes avec cancer du sein triple-négatif (Choi et al., (104)), triple-négatif et HER2 amplifié non luminal (Von Minckwitz

et al., (103, 105)), et une amélioration de la survie sans évènements pour les patientes avec cancer du sein triple-négatif, HER2 non luminal, luminal B/HER2 amplifié (Bonnefoi et al. (106)).

2. La RHC dans les cancers du sein triple-négatifs.

En 2008, l'étude de Liedtke et al. confirmait un taux plus important de réponse complète histologique (définie selon la définition actuelle, ypT0/is ypN0) chez les patientes avec cancers du sein triple-négatifs par rapport aux autres : 22% vs 11%, OR 1.53 (IC95 1.03 – 2.26, p = 0.034) (107). Ce taux était même en-dessous de ce qui est observé aujourd'hui, plutôt autour de 30%, ce que les auteurs expliquent par l'absence d'utilisation de taxanes chez la moitié des patientes.

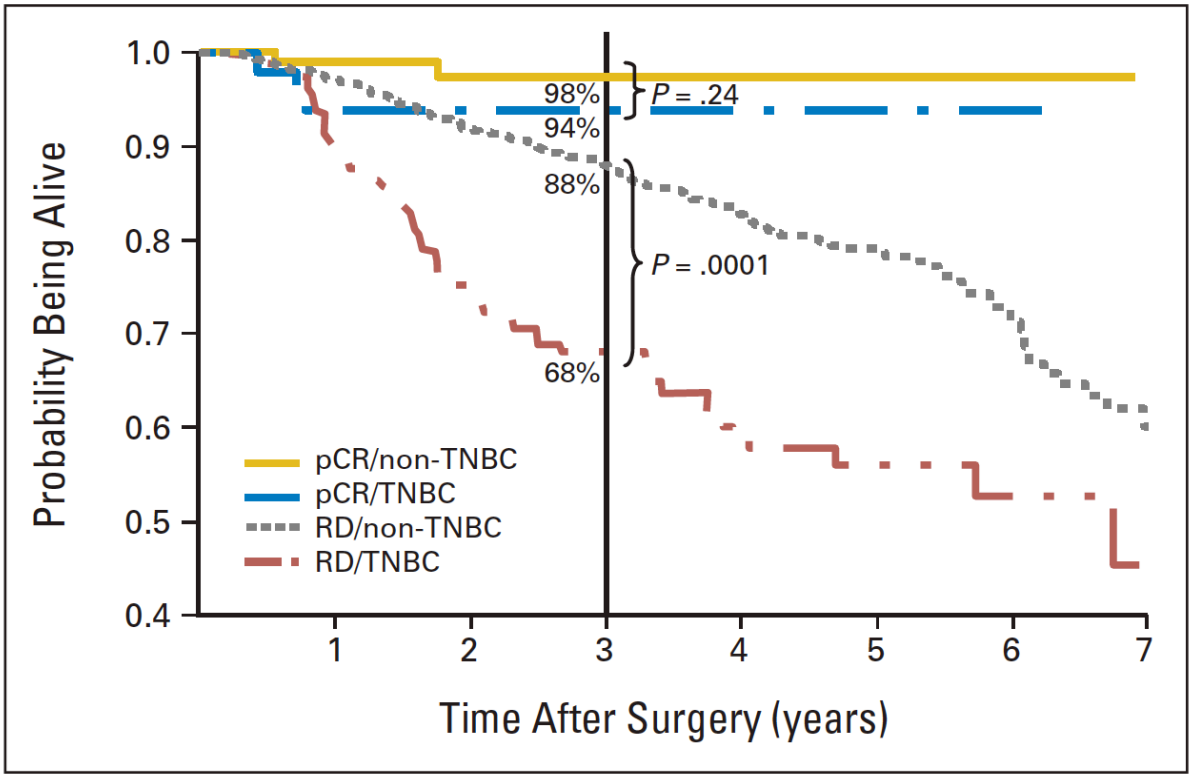


Figure 7 : Survie globale en fonction de la réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante et du sous-type histologique. pCR : pathologic Complete Response, TNBC : triple-negative breast cancer, RD : residual disease. Figure tirée de Liedtke et al., JCO 2008 (107).

Plus encore, les auteurs observaient dans leur publication que si le pronostic global des cancers du sein triple-négatifs était moins bon, et à court terme, que les autres sous-types, cela n'était pas vrai pour les patientes en réponse histologique complète après chimiothérapie néo-adjuvante qui avait un pronostic similaire aux autres sous-types en réponse complète (cf.

figure 7). Les cancers triple-négatifs avec maladie résiduelle avaient en revanche une survie bien moins bonne que les autres sous-types non en réponse complète, un constat réalisé également dans un article de Choi et al. (104)

c. Autres facteurs pronostiques histologiques après chimiothérapie néo-adjuvante.

1. Facteurs histopathologiques « classiques ».

D'autres facteurs ont été associés au pronostic après traitement néo-adjuvant ; la revue des Dr Penault-Llorca et Radosevic-Robin réalisée en 2016 cite ainsi principalement le **Ki67**, mais aussi le **grade tumoral**, le **compte mitotique**, et le **statut des récepteurs hormonaux après traitement** (le cas échéant) (95).

Le Ki67 de la maladie résiduelle a en effet été beaucoup étudié, et l'équipe de Sheri et al. a même proposé son inclusion au RCB dans un index intitulé « Residual Proliferative Cancer Burden » ou RPCB. En effet, dans leur étude conduite sur 220 patientes atteintes d'un cancer du sein traité par chimiothérapie néo-adjuvante (tous sous-types confondus), le Ki67 était un facteur pronostique indépendant pour la survie ; un score combiné avec le Ki67 et le RCB permettait d'encore mieux discriminer les patientes de ce groupe. Des analyses exploratoires de sous-groupes semblaient même montrer une discrimination plus importante pour les tumeurs avec absence de récepteurs hormonaux, sans néanmoins préciser la part de tumeurs triple-négatives dans cette population (108). Néanmoins, si d'autres études avaient également mis en évidence ce rôle pronostique du Ki67 de la maladie résiduelle, elles semblaient montrer un rôle plus fort pour les cancers du sein hormono-dépendants, comme montré par exemple par Von Minckwitz et al. sur la cohorte GeparTrio (109). Enfin, l'étude réalisée à l'institut Bergonié par C. Pinard et al. sur des cancers du sein triple-négatifs ne mettait pas en évidence de rôle pronostique du Ki67 sur la tumeur résiduelle dans ces tumeurs, ce qui peut être expliqué par les taux élevés retrouvés dans ces tumeurs, même après chimiothérapie néo-adjuvante (110).

Le grade tumoral et l'index mitotique post-chimiothérapie pourraient être des facteurs pronostiques, comme montré dans plusieurs études citées dans la revue (95).

Enfin, les **emboles vasculaires et/ou lymphatiques** représentent un facteur pronostique majeur ; dans une étude rétrospective menée par Liu et al., la présence d'emboles lymphovasculaires était associée à une baisse importante de la survie globale tous sous-types confondus (HR 4.35, 95 % CI 1.61–11.79, $p < 0.01$) (111). Après chimiothérapie néo-

adjuvante, la présence d'emboles seuls sans autre maladie résiduelle empêche la classification en RHC (97).

2. Facteurs immunologiques.

Comme mentionné plus haut (II.C.i), la prise en compte du microenvironnement tumoral, et particulièrement de sa composante immunitaire, a conduit à des analyses sur la tumeur résiduelle après traitement. Cette analyse permet d'apporter des informations sur les interactions du système immunitaire avec la tumeur, dans le contexte de traitements souvent responsable d'une immunogénicité (mort immunogène induite par les anthracyclines par exemple).

Dieci et al. en 2013 montraient, sur une cohorte de près de 300 patientes, qu'un infiltrat important en TILs (> 60% de TILs dans le stroma et/ou la tumeur) était associé à une meilleure survie sans rechute et une meilleure survie globale (77). La cinétique des TILs au cours de la chimiothérapie fait par contre débat, certains auteurs notant une augmentation après chimiothérapie (77, 112) quand d'autres notent une diminution (78). **Les TILs de la maladie résiduelle ont fait l'objet de plusieurs publications récentes suggérant qu'ils pouvaient avoir un impact pronostique à part entière : Pinard et al. ont montré la pertinence d'une combinaison RCB-ratio CD4/TILs**, le ratio de CD4 dans la population lymphocytaire totale permettant d'affiner le pronostique au sein de chaque classe RCB (110). Luen et al. ont montré que le taux de TILs de la maladie résiduelle avait un apport pronostique dans la classe RCB II, soit celle où il est le plus important de mieux séparer les patientes (113).

d. Maladie résiduelle et mécanismes de chimio-résistance dans le CSTN.

Le modèle néo-adjuvant est un modèle de choix pour identifier les mécanismes responsables de la chimio-résistance, et fait donc l'objet d'une littérature de plus en plus abondante (114). Ce résidu tumoral, de mauvais pronostic dans les cancers du sein triple-négatifs (près de 50% de rechute métastatique), est considéré par certains auteurs comme à l'origine de la maladie micro-métastatique puis métastatique (114).

Lors de l'étude génomique ou transcriptomique de résidus tumoraux, plusieurs anomalies moléculaires ou voies de signalisation ressortent de façon dominante. Une amplification de MYC et de MCL1 est fréquemment décrite (115), l'amplification de MYC

pouvant être également associée à une inactivation de p53, par délétion d'un allèle associé à une mutation de l'autre allèle, mécanisme proposé de chimiorésistance dans les cancers du sein triple-négatifs (116).

Du point de vue génomique, de nombreuses voies de signalisation actionnables par des thérapeutiques existantes ont été identifiées comme activées de façon anormale au sein des résidus tumoraux (au moins une activation aberrante chez > 90% des tumeurs analysées) : **altérations du cycle cellulaire** (CDK4, CDK6, CCND1, CCND2, CCNE1 ou AURKA ou perte de CDKN2A, CDKN2B, RB1), **activation de la voie PI3K/ mTOR** (amplification AKT 1, 2 ou 3, de PIK3CA, RAPTOR et perte ou mutation PTEN), amplifications dans la **voie des facteurs de croissance** (EGFR, MET, KIT, FGFR1, 2 et 4, IGF1R), altérations dans la voie **RAS/ MAPK** et altérations dans la **voie de réparation de l'ADN** (115).

Après étude transcriptomique, Balko et al. ont mis en évidence une différenciation tumorale en 3 clusters, le groupe I étant un groupe de tumeurs bien différenciées avec un Ki67 élevé et une signature TGFβ et MEK faible et le groupe III étant caractérisé en gènes associés à l'invasion tumorale, exprimant fortement l'activation TGFβ et MEK, représentant des cellules avec des traits de cellules souches (115) ; ces différents phénotypes ne présentaient pas de différences en termes de survie. Cette activation d'un phénotype de type cellule souche ainsi que l'activation de la voie du TGFβ ont également été retrouvés par d'autres auteurs ayant comparé des fragments tumoraux de tumeurs triple-négatives pré et post-chimiothérapie (116).

Suite aux divers travaux publiés sur les voies de résistance possibles à la chimiothérapie, des auteurs ont conduit une analyse transcriptomique de 82 cas de tumeurs triple-négatives après chimiothérapie via Nanostring, en établissant un panel de gènes à partir de la PAM50, d'une signature associée à la perte de *DUSP4*, des voies d'activation MEK et TGFβ ainsi que des gènes associés au score Ki67. Ils ont établi une signature transcriptomique de 3 gènes pour prédire le risque de rechute lors de la présence de tumeur résiduelle après chimiothérapie néo-adjuvante : *CCL5* (positivement corrélé à la survie) impliqué dans l'immunorégulation et le recrutement de la réponse lymphocytaire, *DDIT4* (négativement corrélé à la survie), dont la protéine inhibe mTOR, et *POLR1C* (négativement corrélé à la survie), gène impliquée dans la synthèse d'ARN (117).

L'analyse du résidu tumoral post-chimiothérapie apporte donc de précieuses informations sur les mécanismes à l'œuvre lors de la résistance aux traitements. Jusqu'à présent, peu de données transcriptomiques spécifiques de l'immunité ont été étudiées, or il est pourtant très probable que l'immunité joue un rôle majeur dans les rechutes sur maladie

résiduelles. En effet, les anomalies transcriptomiques révélées par les analyses ci-dessus sur la voie RAS/MAPK peuvent avoir un lien direct avec la réponse immunitaire, cette voie étant responsable d'une sous-expression du CMH I et II à la surface des cellules tumorales – une modalité fréquente d'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire (78).

IV. Apport de l'analyse transcriptomique dans l'évaluation pronostique des cancers du sein

Les chapitres précédents ont permis de définir et présenter : les cancers du sein triple-négatifs et leurs particularités, les fondements de l'immunité anti-tumorale et les hypothèses expliquant ses échecs, le microenvironnement tumoral immunitaire du cancer du sein et les différentes populations à l'œuvre d'une part ; les modalités d'évaluation de réponse après traitement néo-adjuvant et les particularités de la maladie résiduelle dans le cancer du sein triple négatif d'autre part.

Le développement des technologies de biologie moléculaire, les rendant de plus en plus rapides et reproductibles, a été à l'origine d'un nombre croissant de publications sur le sujet. Dans le cancer du sein, elles ont **permis le développement de signatures pronostiques** importantes, guidant parfois la prescription des traitements complémentaires. En immunologie, elles permettent de **décrire de plus en plus précisément les cellules immunitaires présentes et leurs interactions.** Les **signatures développées à partir de l'immunité semblent particulièrement intéressantes à visée pronostique et/ou prédictives** de la réponse aux thérapies classiques ou immunologiques, notamment dans le cancer du sein triple-négatif.

a. Apport des signatures transcriptomiques : le cas des cancers RH+/HER2-

La place de la chimiothérapie n'est pas toujours évidente dans les cancers hormono-dépendants, souvent moins agressifs et moins chimio-sensibles que les cancers triple-négatifs ; ils disposent en outre d'une thérapie ciblée avec l'hormonothérapie. La décision de mettre en œuvre une chimiothérapie est prise en RCP, en tenant compte de l'état général de la patiente et de ses comorbidités, de ses souhaits (concernant les traitements et le type de chirurgie souhaité), mais aussi des caractéristiques propres de la maladie. Une charge tumorale élevée (taille > T2, envahissement ganglionnaire ≥ 4 ganglions), des marqueurs d'agressivité, un âge jeune (< 35 ans) sont autant de facteurs qui feront pencher la balance en faveur d'une chimiothérapie, alors que la survenue d'une tumeur de petite taille et peu agressive (grade 1) chez une patiente âgée et /ou avec comorbidités seront autant d'éléments en faveur d'une hormonothérapie seule.

Des outils en ligne peuvent permettre également d'affiner la décision, tel que Predict UK (https://breast.predict.nhs.uk/) validé sur de larges cohortes de patientes (118). En rentrant les caractéristiques liées à la patiente (âge, statut ménopausique), liées à la tumeur (récepteurs hormonaux, statut HER2, Ki67, taille, envahissement ganglionnaire, grade, mode de détection), on obtient le risque estimé de décès à 5 ans et 10 ans, avec l'impact des différentes modalités de traitement.

Cependant, lorsque tous ces paramètres ont été pris en compte, il reste des cas pour lesquels le risque de rechute est difficile à évaluer et où des informations intrinsèques à la tumeur aident à la décision : c'est le rôle aujourd'hui des signatures génomiques. Ces tests sont soumis à la validation par une RCP et peuvent être réalisés en cas de tumeur au stade précoce (pT1c à pT2, pN0 à pN1mi, RH+/HER2-, de grade 2, sans indication préalable de chimiothérapie adjuvante en tenant compte de l'âge ou des emboles vasculaires) – recommandations HAS de Janvier 2019 (119). Ils étudient au sein de l'ARN tumoral des signatures prédictives de rechute.

En France, les 4 tests génomiques validés et dont l'utilisation est encadrée par les recommandations de l'HAS sont Oncotype DX, Mammaprint, Prosigna et EndoPredict.

Oncotype DX est un test génomique fonctionnant avec la technique de RT-qPCR, pour étudier 21 gènes (16 liés au récepteur à l'œstrogène, à HER2, à la prolifération et à l'invasion et 5 gènes dits « de référence »). Il a été validé par plusieurs études rétrospectives, et de façon prospective par l'essai TAILORx qui a montré son utilité dans les cancers hormono-dépendants/ HER2 non surexprimé, pN0. Oncotype DX stratifie les patientes en 3 groupes de risque ; TAILORx a permis de montrer l'absence d'intérêt à la chimiothérapie dans les groupes de faible risque, ou même pour la majorité des patientes présentes dans le groupe à risque intermédiaire (120, 121). Plus récemment, RXponder a montré que les patientes post-ménopausiques avec atteinte ganglionnaire modérée (N1) de risque faible ou intermédiaire pouvaient surseoir à la chimiothérapie (122).

Mammaprint est un test comprenant 70 gènes (liés à la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse) étudiés par cDNA array ; il permet de classer les patientes en 2 groupes de risque, et a été validé prospectivement par l'essai MINDACT, dans une optique de désescalade de la chimiothérapie chez des patientes à risque clinique élevé mais score génomique à faible risque (123).

Prosigna permet de calculer un score de récurrence basé sur l'expression de 50 gènes, qui permettent de définir le sous-type moléculaire et de calculer un score de risque de rechute. Cette analyse est faite via Nanostring, et prend également en compte des paramètres cliniques (taille tumoral, statut ganglionnaire) ; il est destiné aux patientes ménopausées. Il

classe les patientes en 3 catégories et a été validé de façon rétrospective (124), mais un essai est en cours pour évaluer son rôle prédictif (essai OPTIMA).

Enfin, **EndoPredict** est un test combinant 12 gènes (liés au récepteur à l'œstrogène et à la prolifération) évalués par RT-qPCR pour obtenir l'EP score, ensuite combiné à des informations cliniques (taille tumorale, statut ganglionnaire) pour obtenir le score final (EPclin). Il a été validé de façon rétrospective (125).

Ces tests représentent un apport important de la génomique dans l'arbre décisionnel, puisqu'ils permettent d'intégrer le **risque de rechute intrinsèque de la tumeur** au reste des paramètres cliniques et biologiques. Le problème principal posé par ces tests est le manque de reproductibilité : plusieurs études ont comparé ces tests sur les mêmes groupes de patientes, avec des discordances sur l'évaluation du risque allant de 42 à 66% (126). Ils sont récapitulés dans le **tableau n°2**.

Tests génomiques	MammaPrint	Oncotype DX	Prosigna	EndoPredict
Compagnie	Agendia	Genomic Health	Nanostring	Sividon
Indication	pN0-N1	HR+/HER2-, pN0/N1	HR+, pN0-N1, ménopause	HR+/HER2-, pN0-N1, ménopause
Intérêt	Pronostique et prédictif	Pronostique et prédictif	Pronostique	Pronostique
Nombre de gènes	70	21 (16+5)	58 (50+8)	12 (8 + 4)
Combinaison avec critères cliniques	Non	Non	Oui (pT, pN)	Oui (pT, pN : EP clin)
Validation : études rétrospectives	TRANSBIG (Buyse et al.2006)	NSABP B14 (Paik et al. 2004), TransATAC (Dowsett et al. 2010), NSABP B28 (Mamounas et al. 2017), NSABP20 predictive (Paik et al. 2006)	ABCSG8 (Gnant et al. 2014), TransATAC (Sestak et al. 2015), DBCG 77B (Laenk-holm et al. 2018)	ABCSG06 (Filipits et al. 2011) et ABCSG08 (Fitzal et al. 2015)
Validation : études prospectives	MINDACT (Cardoso et al. 2016)	TAILORx (Sparano et al. 2018)	Non	Non
Type de tissu utilisé	FFPE	FFPE	FFPE	FFPE
Méthode d'analyse	cDNA array	qRT-PCR	Nanostring Ncounter	qRT-PCR
Scores génomiques	MammaPrint Index (MPI, -1 à +1)	Recurrence score (RS 0-100)	ROR score (0-100)	EP score, Epclin score
Catégories de risque	faible, élevé	faible, intermédiaire, élevé	faible, intermédiaire, élevé	faible, élevé

Tableau 2 : comparatif des différentes signatures génomiques disponibles en France pour les cancers du sein hormono-dépendants. Tableau adapté du tableau 1 de la review de Kwon, M J (127) (les tests BCI et BCT non utilisés en France ne sont pas mentionnés).

b. Analyse transcriptomique et identifications des populations immunitaires présentes.

Dans les premiers chapitres, nous avons vu comment la prise en compte du microenvironnement immunitaire s'était progressivement imposée comme un facteur pronostique et prédictif de la réponse aux traitement majeur ; d'abord par le compte des TILs, population lymphocytaire « tout-venant » ; puis par une caractérisation de plus en plus précise des différentes sous-populations présentes, à l'aide de marquages en immunohistochimie (IHC) (CD3, CD4, CD8, FOXP3, etc.). L'identification des populations immunitaires présentes en IHC est néanmoins fortement limitée par le nombre de marquages possibles par lames, quand on sait qu'il existe une multitude de sous-populations pour chaque grande entité (lymphocytes T, macrophages, etc.).

Le transcriptome permet d'aller beaucoup plus loin dans cette approche, avec l'étude des transcrits liés à l'immunité : gènes impliqués dans la réponse inflammatoire cytotoxique dite « de type 1 » (essentiellement liés à la réponse immunitaire T et à l'IFNγ), gènes liés aux régulateurs négatifs de la réponse (PD-1/PD-L1, FOXP3, CTLA4, etc.). A partir des transcrits obtenus, 2 types de méthodes peuvent être réalisées en biostatistiques :

⇒ **Les méthodes d'enrichissement (enrichment)** reposent sur l'utilisation de bases de données en ligne, gratuites ou payantes : ex KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome), GO (Gene Ontology). Il s'agit de comparer l'enrichissement d'un tissu en certains gènes, et d'analyser les voies de signalisation/ fonction associées à ces gènes. Cela permet par exemple de détecter une présence plus importante d'une population immunitaire donnée (ex : lymphocytes T CD8) ou de montrer la présence d'une réponse immunitaire cytotoxique au sein d'un tissu, par rapport à un autre (128). Cette méthode ne permet cependant pas de quantifier précisément les populations cellulaires présentes.

⇒ **Les méthodes de déconvolution :** à partir de toutes les données de séquençage, ces méthodes qui passent par l'utilisation de logiciels (CIBERSORT, TIMER, MCP counter etc.) vont permettre d'estimer de façon assez précise les populations cellulaires présentes dans un tissu, et leur proportion (129, 130). Ainsi, CIBERSORT est capable d'estimer de façon corrélable à l'IHC les proportions de TILs au sein d'une tumeur (et leur sous-catégorie) ; mais ce logiciel permet en plus d'aller beaucoup plus loin, puisqu'il identifie de nombreux sous-types cellulaires différents (TCD4 activés, TCD4 non activés, macrophages dans différents états d'activation : immatures/ M0, M1

(immunité plutôt anti-tumorale), M2 (pro-inflammatoires/ pro-angiogéniques, etc.) (129).

Les intérêts de ce type d'analyse sont multiples : elles ne requièrent pas de tissu frais (utilisation de prélèvements fixés), elles permettent l'analyse simultanée de nombreux paramètres, et se fait sans risquer d'altérer les fonctions cellulaires (contrairement à la dissociation tumorale nécessaire lorsqu'on utilise des techniques type cytométrie de flux) (131).

D'autres niveaux de lecture existent bien sûr : génome, épigénome, protéome ; mais nous avons choisi de nous concentrer sur le transcriptome dans ce projet.

La place des différentes méthodes utilisées pour connaître le microenvironnement immunitaire d'une tumeur est résumée sur le schéma suivant (**figure 8**) :

- En haut, l'analyse du tissu permet d'apporter des informations soit par dissociation et cytométrie, soit par analyse en immunohistochimie/ immunofluorescence, +/- à l'aide de scanners multiplexes.
- Au milieu, l'utilisation d'une portion de tumeur avec séquençage et/ou extraction d'ARN et/ou analyse épigénétique permettent, grâce aux analyse *in silico* présentées juste au-dessus, de déterminer les populations cellulaires présentes.
- En bas, les techniques de type « single cell » pour le transcriptome ou l'épigénétique permettent à l'échelle cellulaire de mettre en évidence des différences au sein d'un même sous-type ; l'analyse précise des récepteurs des lymphocytes B et T permet de faire de la prédiction de néo-antigènes tumoraux.

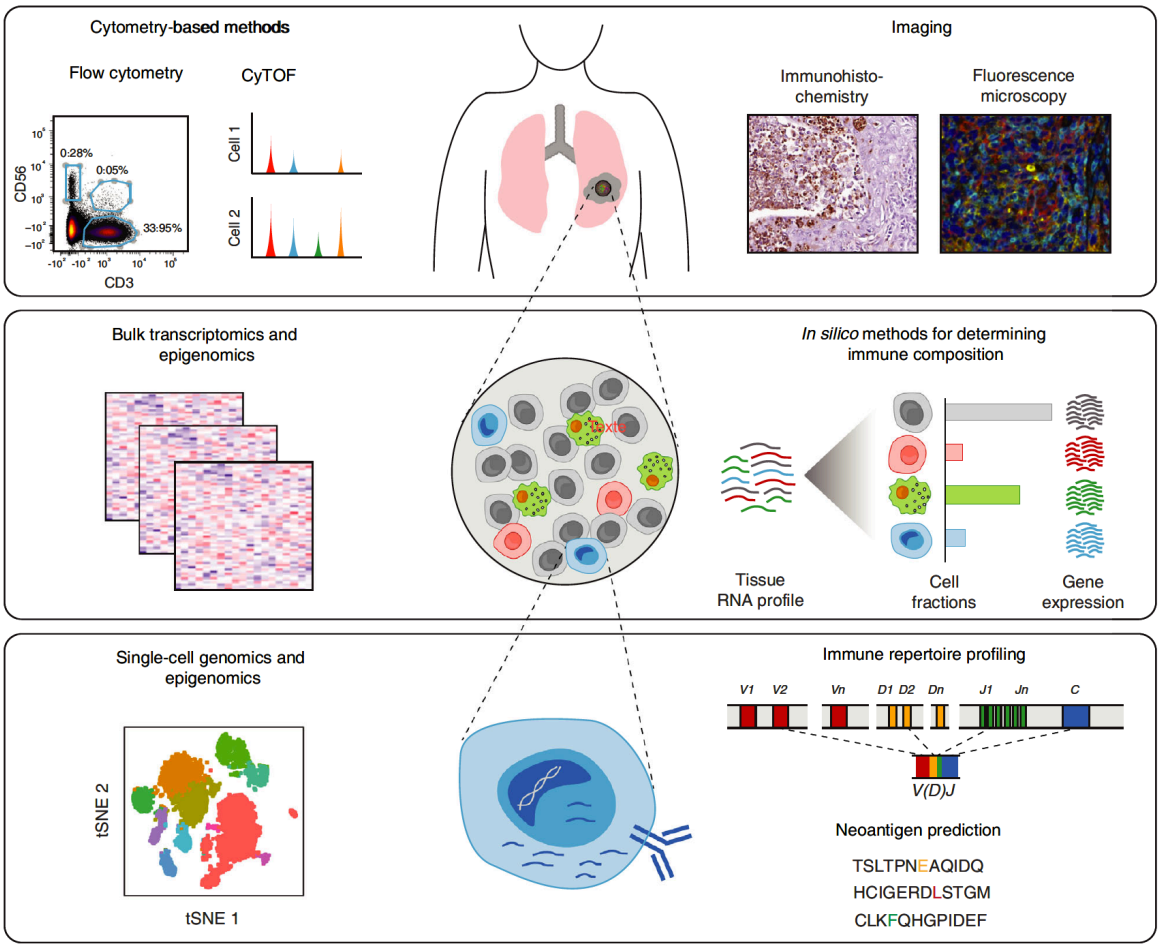


Figure 8 : résumé des méthodes existantes, à différents niveaux (tissulaires, analyses transcriptomiques/épigénétiques, single cell). Au milieu : analyses transcriptomiques/ épigénétiques accompagnées de méthodes de déconvolution/ enrichissement génique. Image tirée de l'article de Liu, C. et al., Immunology 2019 (131)

c. Signatures transcriptomiques immunitaires dans les cancers du sein triple-négatifs.

Il n'existe à l'heure actuelle pas de score génomique utilisable en clinique pour évaluer le pronostic d'une patiente avec cancer du sein triple-négatif. Pour cette raison, et pour les divers arguments développés plus haut (immunogénicité de ce type de cancer et rôle pronostique et/ ou prédictif des TILs notamment), de nombreuses signatures à orientation immunologiques ont été proposées.

Hendrickx et al. ont testé en 2017 leur **« immunologic constant of rejection » (ICR)** sur la base TCGA/ breast (tous sous-types). Cette signature, faite de gènes liés à l'immunité anti-tumorale mais aussi à d'autres processus biologiques (maladies auto-immunes, rejet de greffe, etc.) permettait de séparer les cancers du sein en 4 groupes. **Le groupe ICR4, où la**

signature était la plus fortement exprimée, était un groupe de meilleur pronostic malgré une forte proportion de tumeurs de phénotype basal (132). Desmedt et al., sur une large cohorte constituée de plusieurs bases de données, ont étudié les divers métagènes à l'œuvre dans les cancers du sein tous sous-types confondus. Plusieurs métagènes ressortaient : métagène lié à la prolifération (centré sur *AURKA*), à l'invasion/aux métastases (*uPA*), à la réponse immunitaire (*STAT1*), à l'angiogenèse (*VEGF*), à l'apoptose (*CASP3*), et au phénotype (récepteurs hormonaux, *ESR1*, et expression HER2, *HER2*). Dans les cancers du sein identifiés comme triple-négatifs (par signature génomique), **le module lié à l'immunité STAT1 permettait de séparer les patientes en 3 groupes pronostiques (133).**

Certains auteurs ne se sont intéressés d'emblée qu'aux CSTN. Rody et al. ont compilé les données de plusieurs bases de données et ont réuni 394 cas de cancers triple-négatifs à un stade précoce, leur permettant de construire une signature **avec ratio lymphocyte B/ IL-8.** En analyse multivariée prenant en compte les facteurs pronostiques classiques (taille, statut ganglionnaire, etc.), ce ratio était le seul à sortir comme facteur pronostique indépendant (134). Bonsang-Kitzis et al. (135) ont classé 262 cas de cancers du sein triple-négatifs en 6 clusters (clustering non hiérarchisés), dont 2 liés à l'immunité (Immunity 1 et 2). Le cluster Immunity 2, constitué de gènes impliqués dans la réponse des lymphocytes B et T (particulièrement des T CD8+) était un facteur pronostique indépendant dans la cohorte de validation, mais aussi dans la cohorte METABRIC de Curtis et al. Sur la tumeur résiduelle après chimiothérapie néo-adjuvante, Pinto et al. ont établi une signature à 3 gènes via Nanostring, comprenant *CCL5*, codant pour une chemokine très importante de la réponse immunitaire (117).

Il est à noter que si les gènes varient d'une signature ou d'un métagène à l'autre, les voies représentées sont redondantes, les plus représentées étant :

- Gènes liés à l'activité des lymphocytes T : CD4, CD4 follicular helper (Tfh), CD4 T helper de type 1 (Th1), CD8+, gènes liés au TCR et à ses voies de transductions, …
- Importance des **lymphocytes B** (*CD19, MS4A1, …*)
- Gènes liés à « l'immunosuppression » : *PD-1, PD-L1, IDO1, LAG3, CTLA4,…* qui sont en général positivement corrélés aux autres marqueurs (puisqu'ils traduisent également l'activation lymphocytaire)
- Réponse cytotoxique : voie des interférons, facteur de transcription *STAT1*, etc.

De nombreuses signatures ont ainsi été publiées, avec des résultats parfois non reproductibles, dans de nombreuses situations cliniques différentes (maladie à un stade précoce/ avancé, tumeurs avec récepteurs hormonaux négatifs ou triple-négatives ou basal-like, …). Il manque aujourd'hui une signature validée de façon prospective, permettant de

changer la prise en charge des patientes avec tumeur triple-négatives. Un récapitulatif des signatures majeures (non exhaustif !) est présenté dans le **tableau n°3**.

Enfin, les CSTN étant des candidats très intéressants pour l'immunothérapie, une signature idéale permettrait à la fois d'évaluer le pronostic, mais aussi de prédire la réponse aux inhibiteurs de checkpoint ; en ce sens, la signature « Tumor Inflammation Signature » ou TIS de Ayers et al., développée sur plusieurs types tumoraux (mélanomes, côlons, CSTN, cancers ORL), donne des pistes précieuses sur les gènes candidats (136). Cette signature de 18 gènes, construite à partir de gènes de la réponse T et de l'IFNγ, permet de prédire la réponse au traitement anti-PD1 de plusieurs types tumoraux. Les auteurs notent néanmoins que si une expression faible de la signature est bien associée à l'absence de réponse aux immune checkpoints, une signature fortement exprimée n'est pas nécessairement synonyme de réponse au traitement, suggérant que d'autres mécanismes de résistance étaient à envisager.

Article	Patientes	ARN	Résultats	Gènes
An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer, Teschendorff et al., Genome Biol 2007 **(137)**	n = 186, ER- (% HER2 + ?)	MA	Identification d'un module de gènes centré sur la réponse immune, pronostique chez les patientes ER-.	*C1QA, XCL2, SPP1, TNFRSF17, LY9, IGLC2, HLA-F*
Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes, Desmedt et al., Clin Cancer Res 2008 **(133)**	> **2100 patientes** à un stade précoce.	MA	Pour les cancers du sein triple-négatifs, seul le module lié à l'immunité/ STAT1 permettait de prédire le pronostic.	Entre autres (> 90 gènes dans le module) : *STAT1, CXCL10, TAP1, CXCL11, INDO, CXCL9, CCL5, ADAMDEC1, CCL8, LYZ, IRF1, LAG3, CD3G, GZMK, CD48, STAT4, SH2D1A, CD69, IRF8, APOC1, LILRA4, CD40LG, IL18, CCRL2*, etc.
T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast cancer, Rody et al., Breast Cancer Res 2009 **(138)**	n = 1781 (tous sous-types, tous stades)	Affymetrix	**7 clusters liés à l'immunité** : IgG, HCK, CMH II, LCK (lymphocytes T), CMH de type I, STAT I, Interféron . **La signature LCK était associée à un meilleur pronostic pour les tumeurs ER-**,indépendamment du statut HER2.	Module LCK : *CD3, TCRα, TCRβ, lymphocyte-specific kinase, IL7R*

***A clinically relevant gene signature in triple-negative and basal-like breast cancer*,** Rody et al., Breast Cancer Res 2011 **(134)**	394 CSTN (training set), 185 CSTN (cohorte de validation)	Affymetrix	Construction d'un index Lymphocyte B/ IL-8, rôle pronostique.	*IgG, IL-8, CXCL1, CXCL2* (gènes principaux)
Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer, West et al., Breast Cancer Res, 2011 **(139)**	n = 113 biopsies pré-NACT (73% CSTN	MA	Expression forte de la signature (= "high TILs") était corrélée à un meilleur taux de pCR comparé à une faible expression (low TILs) : OR 6.325 (95%IC 2.487 à 16.08). Rôle prédictif.	*CD19, CD3D, CD48, GZMB, LCK, MS4A1, PRF1, SELL*
***CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival*,** Gu-Trantien et al., J Clin Invest, 2013 **(140)**	Tous types de cancers du sein ; n = 10 (training set), n = 60 (cohorte de validation)	MA	2 signatures développées par les auteurs : **signature lymphocytes T follicular helper** et **signature Th1**. La signature Tfh avait un **rôle pronostique** à la limite de la significativité pour les CSTN ; la signature Th1 était **prédictive de la réponse à la NACT** pour les CSTN.	**Signature lymphocytes T follicular helper :** *CXCL13, CD200, FBNL7, ICOS, SGPP2, SH2D1A, TIGIT, PD-1* ; **signature Th1 :** *CCND2, CD38, CTLA4, RAB27A, RAB33A, SH2D2A, STAT1, TNFRSF4, IL12RB2, SAMD9L, CXCL9, IFNG*

Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without Carboplatin in HER2-positive and triple-negative primary breast cancer, Denkert et al., J Clin Oncol, 2015 **(80)**	**n = 580,** cancer HER2+ ou **CSTN (n = 314)**. Biopsie avant NACT	RT-PCR	Une signature élevée (surexpression de tous les gènes, groupe C) était prédictive d'une réponse au traitement.	*CXCL9, CCL5, CD8A, CD80, CXCL13, IGKC, CD21, IDO1, PD-1, PD-L1, CTLA4, FOXP3*
Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours : importance of immune response**,** Jézéquel et al., Breast Cancer Res, 2015 **(141)**	CSTN ; n= 107 (training set), n = 87 (validation)	Affymetrix	Clustering non hiérarchisé : 3 groupes (C1, C2 et C3). C3 avait un **pronostic significativement meilleur**, et était caractérisé par l'**expression de gènes de la réponse immunitaire.**	*CD4, CD79A, CXCL2, IL-6, VAV1*
Prognostic and predictive value of NanoString-based immune-related signatures in a neoadjuvant setting of triple-negative breast cancer : relationship to tumor-infiltrating lymphocytes**,** Lee HJ et al., Breast Cancer Res Treat, 2015 **(142)**	CSTN, n = 55 Biopsies pré-NACT	NS Human Immunolo -gy Panel	L'analyse génomique a permis de mettre en évidence plusieurs gènes **prédictifs de la réponse au traitement** ainsi que **pronostiques**.	Gènes prédictifs de la réponse à la NACT : *NFKB1, MAPK1, TRAF1, CXCL13, GZMK, IL7R, MS4A1*,... ; gènes associés au pronostic : *NFKB1, TRAF1, CXCL13,..*

***Biological network-driven gene selection identifies a stromal immune module as a key determinant of triple-negative breast carcinoma prognosis*,** Bonsang-Kitzis et al., OncoImmunology, 2016 **(135)**	CSTN, n = 262 (training set), n = 295 (validation) + cohortes Ignatiadis et al. et METABRIC	MA	Etablissement de 6 clusters dont 2 liés à l'immunité (Immunity 1 et 2). **Le métagène Immunity2** sortait comme **facteur pronostique indépendant** dans chaque cohorte avec le Nottingham Prognostic Index.	Gènes en lien avec les voies de signalisation des lymphocytes B, T et en particulier des T CD8+. Entre autres : *GZMA, GZMB, CCR7, LY96, MS4A1, CD74, CD3D, CCL2, CD14, CD2, LCK, IL7R, CD163, MNDA, NCF2, CSF2RB, FGL2*
Subtype-specific metagene-based prediction of outcome after neoadjuvant and adjuvant treatment in breast cancer, Callari et al., Clin Cancer Res, 2016 **(143)**	Tous sous-type, n = 3847 chimio néo/ adjuvante.	Affymetrix	**Signature liée aux lymphocytes T.** Signature **prédictive** d'une réponse au traitement néo-adjuvant pour les CSTN dans la cohorte CHEMO, et d'un meilleur **pronostic.**	*CXCL13, PLEK, IFNG, SLAMF7, ILR2B, PRF1, IRF1, PTPN22, IKZF1, APOBEC3G, IL2RA, ITGAL, CXCL9, GZMA, GZMB, HLA-E, CCR5, CD8A, SIRPG, CST7, GNLY, CECR1, PNOC, LCP1, HLA-DMB*
***A prognostic signature based on three-genes expression in triple-negative breast tumours with residual disease*,** Pinto et al., NPJ Genome Med, 2016 **(117)**	CSTN post NACT, n = 82 (training set), n = 113 (validation)	NS, panel 449 gènes	Construction d'une signature à 3 gènes : ***CCL5*** (gène impliqué dans la réponse immunorégulatrice et l'inflammation), *POLR1C* et *DDIT4*. Signature **pronostique.**	*CCL5*

Identification of genetic determinants of breast cancer immune phenotypes by integrative genome-scale analysis, Hendrickx et al., Oncoimmunology, 2017 **(132)**	Tous sous-types, n = 1004 (TCGA breast cancer)	RNA-seq	Test de la signature "Immunologic Constant of Rejection". Définition de **4 phénotypes ICR 1 à 4** (4 surexpression gènes signature). Le phénotype ICR4 était significativement plus fréquent chez les tumeurs basales (32%), leur conférant un **meilleur pronostic.**	*PD-L1, PD1, CTLA4, FOXP3, IDO1, IFNG, TB2A, CD8B, CD8A, IL12B, STAT1, IRF1, CXCL9, CXCL10, CCL5, GNLY, PRF1, GZMA, GZMB, GZMH*
A gene signature to predict high tumor-infiltrating lymphocytes after neoadjuvant chemotherapy and outcome in patients with triple-negative breast cancer, Criscitiello et al., Ann Oncol, 2018 **(144)**	CSTN, n = 99 (training set), biopsie avant NACT ; n = 185 (validation) tumeur post NACT	MA	Construction d'une signature avec 4 gènes permettant de prédire un taux de TILs plus élevé post NACT. Signature **pronostique** (meilleure DRFS si exprimée à la biopsie initiale)	*GBP1, CXCL13, SULT1E1, HLF*

Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis., Savas et al., Nat Med **(145)**	CSTN, n = 2 puis validation sur METABRIC	Single-cell RNAseq	Signature représentant un sous-type de lymphocyte T **CD8+ dit « resident-memory like »**	Uprégulation de : *INPP5F, HECTD2, AGFG1, TNFRSF18, SPRY1, MYO1E, RBPJ, MCM5, GOLIM4, KCNK5, SARDH, CSGALNACT1, AFAP1L2, GZMB, CXCL13, TNS3, ENTPD1, ZBED2, MYO7A, ETV1, SRGAP3, AKAP5, LMCD1, ITGAE, GSG2, GNLY, TTC28* Sous-régulation de : *GZMK, C1orf21, LDLRAP1, RASGRP2, TCF7, SORL1, PLEK, SATB1, P2RY8,TC2N, FCRL6, TRABD2A, GIMAP5, C1orf163, ANK3, SELL, FAM65B, ICAM2, PLCG2, SMIM14, ADRB2, SOCS3, LYAR*
A transcriptomic immunologic signature predicts favorable outcome in neoadjuvant chemotherapy treated triple-negative breast tumors, Pérez-Pena J et al., Front Immunol, 2019 **(146)**	CSTN, n = 2108 Contexte NACT (biopsies pré traitement)	Affymetrix	Signature **pronostique** en analyse multivariée. Pas de rôle prédictif de la réponse au traitement.	*IDO1, STAT1, LAG3, GZMB*

***A multigene assay determines risk of recurrence in patients with triple-negative breast cancer*,** Stewart et al., Cancer Res., 2019 **(147)**	Tumeurs **basales**, n = 44 (training set), n = 56 (validation). Stade précoce non traité.	NS (panel custom)	MHC II activation signature, composée de gènes liés au CMH de type II, aux TILs (+ sous-type moléculaire pour identifier les cancers de phénotype basal). Le score obtenu prédit une **meilleure DFS à partir du diagnostic**.	*CIITA, CD74, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DPB2, HLA-DRB1, HLA-DMA, HLA-DMB, CTSH, NCOA1, CD3D, CD4, CD8A, CD69, IFNG, PD-1, IL7R, ARHGAP9, PD-L1*
***Transcriptome-Based Network Analysis Unveils Eight Immune-Related Genes as Molecular Signatures in the Immunomodulatory Subtype of Triple-Negative Breast Cancer*,** Zhang et al., Front. Oncol 2019 **(148)**	CSTN, n = 107 (training set), cohorte externe. Validation : CSTN, n = 78 (idem cohorte externe). Stade précoce, non traité		Signature pronostique sur la cohorte externe KM plot. Gènes du sous-type « immunomodulatory » des CSTN, liés à la réponse immune adaptative et aux voies de signalisation médiées par les cytokines (GO).	*BTN3A1, CSF2RB, GIMAP7, GZMB, HCLS1, LCP2, SELL*

Prognostication of a 13-immune-related-gene signature in patients with early triple-negative breast cancer, Kim et al., Breast Cancer Res Treat 2020 **(149)**	CSTN, n = 200. Pas de validation	NS panel "PanCan-cer Immune Profiling"	Signature pronostique "liée à l'immunité", non validée sur une cohorte externe.	Risque de récurrence à distance augmenté : *CD1B, CD53, CT45A1, GTF3C1, IL11RA, IL1RN, LRRN3, PRKCE* Risque diminué : *MAPK1, NEFL, PTPRC, SPACA3, TNFSF11*
Transcriptomic Profiles of CD47 in Breast Tumors Predict Outcome and Are Associated with Immune Activation, Noblejas-López et al., Int J Mol Sci 2021 **(150)**	*In silico* uniquement Validation sur METABRIC		5 gènes anticorrélés à CD47, protéine surexprimée dans le cancer et envoyant un signal « don't eat me » aux cellules phagocytaires (macrophages), sont prédictifs de la survie dans les cancers de type basal. Gènes fortement liés à l'activation T et à la présentation antigénique.	*PTGER4, ETS1, PTPRC, HLA-E, TGFBR2, OPTN*
Immune-related Gene Expression Predicts Response to Neoadjuvant Chemotherapy but not Additional Benefit from PD-L1 Inhibition in Women with Early Triple-negative Breast Cancer, Sinn et al., Clin Cancer Res 2021 **(151)**	CSTN, n = 162 (pas de validation)	RNA sequen-cing	8 gènes liés à l'immunité prédisent la réponse au Durvalumab (anti-PDL1).	*TAP1, GBP1, HLA-A, HLA-B, CXCL10, STAT1, CD38, ITGA2*

Tableau 3: Signatures transcriptomiques liées à l'immunité, avec focus spécifique sur les cancers du sein triple-négatifs et/ou basal-like et/ou ER-. CSTN : cancer du sein triple-négatif, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, DFS : disease-free survival, ER : estrogen receptor, MA : micro-array, NACT : neo-adjuvant chemotherapy, NS : Nanostring, RNA-seq : RNA-sequencing.

Objectifs de l'étude.

En partant de la cohorte de Clémence Pinard et al., nous voulons étudier les facteurs liées au microenvironnement tumoral (et en particulier à la réponse immunitaire) afin d'établir le pronostic de patientes présentant une maladie résiduelle après chimiothérapie néo-adjuvante pour CSTN.

L'objectif principal de l'étude est la réalisation d'une signature transcriptomique, à partir du panel Nanostring PanCancer IO 360, et de construire un score clinico-biologique permettant de prédire la rechute de ces patientes.

L'objectif secondaire est la description du microenvironnement immunitaire de la maladie résiduelle après chimiothérapie, puisque les chimiothérapies utilisées dans le traitement des cancers du sein peuvent induire une mort immunogénique, et favoriser le recrutement immunitaire.

Article

Prognostic value of the immune infiltrate in triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy

Celine Blaye[1,2], Elodie Darbo[3], Marc Debled[1], Veronique Brouste[4], Valerie Velasco[5], Clemence Pinard[6], Nicolas Larmonier[2,7], Isabelle Pellegrin[8,9], Audrey Tarricone[8], Julie Commeny[10], Herve Bonnefoi[1,3,7], Claire B. Larmonier[5], Gaetan MacGrogan[3,5*]

[1]Department of Medical Oncology, Institut Bergonié, F-33000 Bordeaux, France; [2]University of Bordeaux, CNRS, ImmunoConcEpT, UMR 5164, 33076 Bordeaux, France; [3]University of Bordeaux, INSERM U1218, ACTION Laboratory; [4] Department of Clinical Research and Medical Information, Institut Bergonié, F-33000 Bordeaux France; [5]Department of Biopathology, Institut Bergonié, F-33000 Bordeaux France; [6]Pathology laboratory, University Hospital of Martinique, F-97261, Fort de France, France; [7]University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux France; [8]Service d'Immunologie et immunogénétique, University Hospital of Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France; [9]Centre de ressources biologiques plurithématique, University Hospital of Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France; [10]Department of Surgery, Institut Bergonié, F-33000 Bordeaux, France

Running title: Immune-related gene signature predicts DRFI in TNBC pts

Keywords

TNBC – residual disease – immune microenvironment of the tumor - transcriptomic signature

Financial support:

This project was funded by the Comité Prévention Dépistage Cancers

***Corresponding author:**

Gaëtan MacGrogan

g.macgrogan@bordeaux.unicancer.fr +33(0)5 56 33 33 36 (Tél)/ +33(0)5 56 33 33 38 (Fax)

Conflict of interest:

The authors declare no potential conflicts of interest.

Manuscript word count: 4540 words, **total number of figures: 4**, **total number of tables: 2**

Statement of translational relevance (120-150 words)

Triple-negative breast cancer patients with consequent residual disease after neo-adjuvant chemotherapy are a group of patients of poor prognosis, though not all of them will experience metastatic relapse. We describe here the immune environment of the residual disease and the differences between patients who will later experience metastatic relapse compared to those who won't become metastatic. We propose a transcriptomic signature based on immunity to better discriminate patients at risk for metastatic relapse. This signature was significantly associated with prognosis in our cohort, by multivariate analysis, and predicted outcome correctly in two independent external cohorts. It can help identify patients, especially in the Residual Cancer Burden (RCB) II category, who could benefit from additional treatment in this setting.

I. Abstract

Purpose: Triple-negative breast cancer (TNBC) patients have up to 75% risk of metastatic relapse within the following years when they have residual disease (RD) after neo-adjuvant chemotherapy (NACT). The immune infiltrate in TNBC being prognostic and predictive of response to treatment, we sought to develop an immunologic transcriptomic signature to better predict relapse in these patients.

Experimental design: We identified 115 samples of residual tumors from post-NACT TNBC patients. We profiled the expression of 770 genes related to cancer microenvironment using the Nanostring PanCancer IO360 panel to develop a prognostic transcriptomic signature, and describe the immune microenvironment of the residual tumor.

Results: Thirty-eight (33%) of patients experienced metastatic relapse. Hierarchical clustering separated patients into 5 clusters with distinct prognosis, based on pathways linked to immune activation, epithelial to mesenchymal transition and cell cycle. The immune

microenvironment of the residual disease was significantly different between patients who experienced relapse compared to those who did not, the latter having significantly more effector anti-tumoral immune cells, with significant differences in lymphoid subpopulations. We selected eight genes linked to immunity (*BLK, GZMM, CXCR6, LILRA1, SPIB, CCL4, CXCR4, SLAMF7) to* develop a transcriptomic signature which could predict relapse in our cohort and in the RCBII subgroup. This signature was validated in two external cohorts (KMplot and METABRIC).

Conclusions: Lack of immune activation after NACT appears to be a strong prognostic factor for metastatic relapse. We propose a prognostic signature based on immune infiltrate that could lead to targeted therapeutic strategies to improve patients' prognosis.

I. Introduction

Triple-negative Breast Cancer (TNBC) accounts for approximatively 15% of breast cancers and is defined by a lack of estrogen receptor (ER) expression, progesterone receptor (PR) expression and the absence of HER-2 amplification. It affects younger women than other breast cancer subtypes and has a worse prognosis with a higher metastatic relapse rate, mostly in the first years following initial treatment (1). This prognosis, however, is largely dependent upon tumor chemosensitivity. Patients exhibiting a pathological complete response or very good response after neo-adjuvant chemotherapy (NACT) will have an excellent prognosis, while patients with an important residual disease (RCBII and III) have a high risk of experiencing a metastatic relapse within the next years without further intervention (up to 75% in the RCBIII class) (2,3). The use of adjuvant Capecitabine has recently been shown to improve the prognosis of these patients with a 40% reduction of the risk of invasive-disease relapse, leaving approximatively 30% of patients with residual disease at risk of an invasive-disease relapse in the next five years (4). To date, there is no means to identify patients who are going to relapse in the group of patients with residual disease, nor to better tailor the adjuvant treatment to improve the rate of disease-free survival.

The last 15 years have seen the development of cancer immunotherapy and the acquisition of an extensive knowledge of the tumor immune microenvironment. TNBC appears to have a higher immunogenicity than other breast cancer subtypes, since it is more

often associated with an important immune infiltrate (4.4 to 28.3% of "lymphocyte-predominant" breast cancers) (5,6). High tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) count in TNBC is associated with better prognosis and higher chemosensitivity (5-7). TNBC is the first of breast cancer to be granted FDA approval for the use of immune checkpoint inhibitors, with Atezolizumab in the metastatic setting (8) or Pembrolizumab in the metastatic and neo-adjuvant settings (9,10).

Recommendations on the assessment of TILs count in TNBC have been proposed (11), but this quantification is pathologist-dependent. Besides, TILs-count only cannot describe the immunological microenvironment, which is the result of a very complex interplay between effector and immunosuppressive cells (12). Progress made in transcriptomic technologies has allowed better characterization of the molecular pathways involved in tumors. Extensive work has been published on the immune mechanisms underlying tumor rejection (13,14), but the immunological context of residual TNBC after NACT is still not well characterized.

The aim of our study was therefore to better characterize the immunological micro-environment in residual TNBC after NACT and its prognostic impact in association with current clinical and pathologic markers.

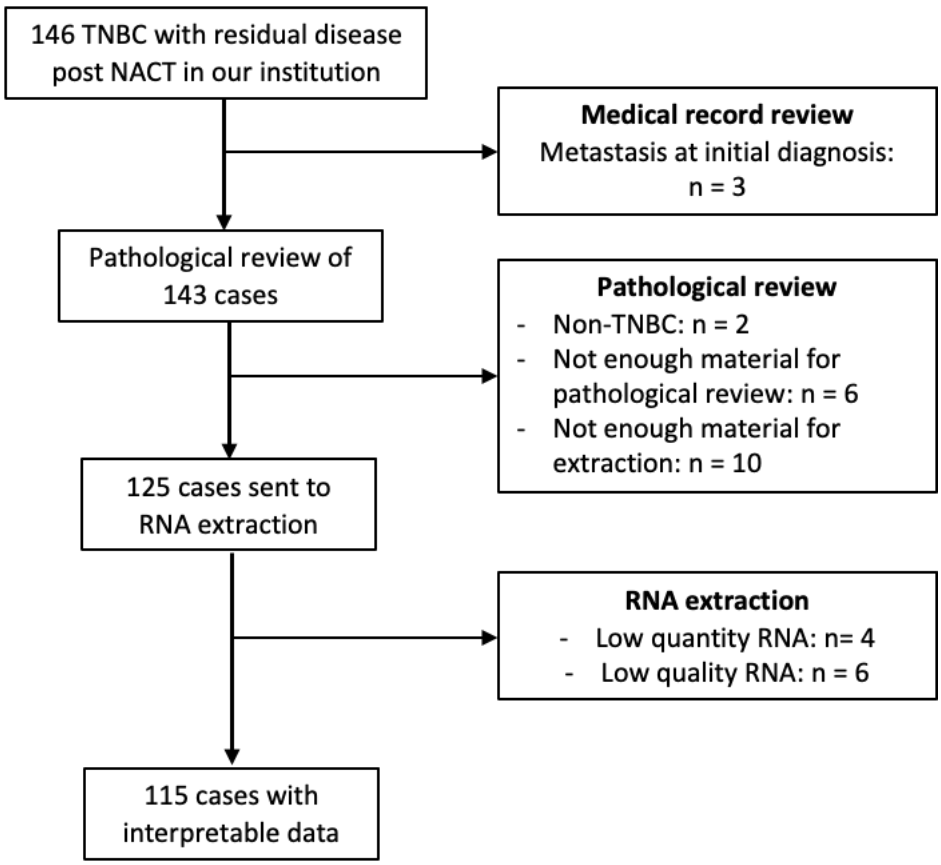
II. Methods

Study population and pathological evaluation

We searched our institution database for female patients with TNBC, aged ≥ 18 years old, who underwent surgical resection after neo-adjuvant chemotherapy from December 2003 to November 2015, and who had residual disease at that time. TNBC was defined according to ASCO/CAP 2010 guidelines (15) (estrogen and/ or progesterone receptors staining < 1% of tumor cells), and HER-2 status determined according to the French national GEFPICS' 2014 guidelines (16). Patients were excluded if they had a history of breast cancer before the onset of NACT, or any other cancer (excluding skin carcinomas), or confirmed metastasis at the time of diagnosis. Thus, we identified 143 cases matching our selection criteria. 83% of patients received a chemotherapy regimen composed of 6 cycles of anthracyclines and taxanes, 8% received only an anthracycline-based regimen, the remaining receiving other regimens (Myocet/ Endoxan, taxanes only, incomplete regimen, etc.). All cases with residual disease had available formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples,

but only 125 cases had enough material for RNA extraction. After RNA extraction and quality controls, 115 cases were analyzed using the Nanostring® nCounter® system (cf flow chart, S1).

:



Supplemental figure 1: flow chart of the study. NACT: neoadjuvant chemotherapy. TNBC: triple-negative breast cancers.

Patients' medical records were reviewed for clinical information. Residual tumor H&E slides were reviewed by two pathologists (GM and CP) to determine tumor cellularity, stromal TILs' infiltration (11), residual cancer burden according to BIG/NABCG guidelines (17) as well as area of interest to be sent for RNA extraction.

RNA extraction and analysis

Total tumor RNA (tumor and tumor microenvironment) was extracted from four to six 10-micron tumor sections after identification of the residual tumor by a pathologist on a corresponding H&E section. RNA was extracted using the High Pure FFPET RNA Isolation Kit (Roche®), following the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality were assessed by Nanodrop 1000 spectrophotometer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and 2100 Bioanalyser with Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA). 200ng of total RNA

was used from each sample for gene expression profiling (acceptation criteria 260/280 ratio: 1.8 -2.3, 230/280 ratio: 1.7-2.3).

RNA samples were analyzed based on the NanoString PanCancer Immuno-Oncology panel (IO360), made of 770 genes related to the interplay between tumor, microenvironment and immune response in cancer. Sample runs were performed on the nCounter FLEX Analysis System (automated nCounter® Prep station and the nCounter® Digital Analyzer optical scanner (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) according to the manufacturer's protocol. This panel was designed using biological signatures, including the 18-gene Tumor Inflammation Signature (18) and includes genes from tumor-related pathways (common signaling pathways, tumor intrinsic factors, cell cycling and proliferation, release of cancer cell antigens), microenvironment-related pathways (angiogenesis, extracellular matrix remodeling, collagens, metastasis) and immune response-related pathways (cancer antigen presentation, T cell priming and activation, immune cells localization to tumors, recognition of cancer cells by T cells, killing of cancer cells, myeloid and NK cell activity, immunometabolism). We added a custom panel of 30 genes in which we included genes from Hendrickx et al. Immunologic Constant of Rejection (ICR) signature (14) (custom panel see supplemental Table 1).

	30 genes CUSTOM
1	IL9
2	IL12B
3	ELF5
4	HORMAD1
5	FOXC1
6	SOX8
7	TUBB2B
8	SOX6
9	FGFR2
10	RARRES1
11	GBP5
12	LAMP3
13	TOP2A
14	NOX 1 (= NADPH oxydase 1)
15	PTGES2 (prostaglandin E synthase 2)
16	STAT5
17	STAT6
18	ADORA2B
19	C-FLAR

20	MCL1
21	IL-13
22	PGR
23	HLF
24	SULT1E1
25	CCR8
26	IDO2
27	SPNS2
28	MSLN
29	HMOX1
30	TIM-3

Supplemental table 1: 30-gene panel custom

Bioinformatics

Housekeeping genes selection

We refined the 20-housekeeping gene list defined in NanoString IO360 panel using three independent datasets grouping triple negative breast cancer patients retrieved from xenaBrowser (19) [TCGA BRCA primary tumors with 123 patients, Chin et al. 2006 (20) : 41 patients and Hess et al. 2006 (21) : 27 patients]. We computed gene expression variability as the inter-quantile (5%-95%) ratio in each dataset and selected 6 of the 20 genes showing ratios under 1.5 in all datasets: *ERCC3, POLR2A, SF3A1, TBC1D10B, TMUB2, UBB*.

Nanostring data processing

Raw RCC files of 115 patients were loaded into R environment and normalized using NanoStringNorm package (22). We normalized the expression values with options CodeCount ='geo.mean', Background ='mean.2sd', SampleContent ='housekeeping.geo.mean', round.values = TRUE, take.log = TRUE.

Unsupervised analysis

We first computed gene expression pairwise Spearman's correlations and selected gene pairs with at least 0.7 score. We then selected modules of correlated genes having at least 10 members using edge.betweenness.community function from igraph R package (23). The 573 remaining genes and 115 patients were separately clustered according to gene expression using PCA and HCPC functions from FactoMineR R package (24) with options

ncp=10 for PCA and default parameters and extracted 4 gene clusters and 5 patient clusters. We visualized the heatmap and annotations using phearmap R package (25).

Gene set functional enrichment

Gene clusters: We evaluated functional gene cluster (from unsupervised clustering and the extended signature) enrichment using enricher function from ClusterProfiler R package (26) and Reactome, WikiPathways, Hallmarks from the MSigDB (27) and genesets provided by NanoString. The universe was set as the genes present in the NanoString setup. The most significant term per unsupervised gene cluster was reported. We reported gene sets showing an adjusted p-value under 0.05 for the extended signature.

Patient comparison: We first computed single sample GSEA scores using GSVA R package (28) with norm.ssgsea option set to FALSE and gene sets provided by NanoString (biological functions and immune cell population signatures). We also computed immune cell population infiltration using MCP counter (29). The scores were then compared between metastatic and non-metastatic patients using the Wilcoxon's test.

Signature definition

Due to unbalanced patient groups (77 non-metastatic and 38 metastatic patients) we decided to proceed 1000 times random subsampling of 30 patients in each group and evaluated each gene predictive power by computing univariate Cox proportional hazards regression model using survival R package (30). We selected the 8 genes for which the test returned a p-value under 0.05 in at least 90% of the iterations (p values detailed in Supplemental table 2). The signature was extended by selecting genes showing a Spearman's correlation score above 0.8 with at least one signature member. Signature score has been defined as described below.

Gene	p value
GZMM	0.0171
BLK	0.0219
CXCR6	0.0261
LILRA1	0.0301
SLAMF7	0.0388
SPIB	0.0450
CXCR4	0.0468
CCL4	0.0476

Supplemental table 2: p-values for the selected genes

Signature score computation

For each patient, the 8-genes and extended signature, the Immunological Constant of Rejection [ICR from Hendrickx et al., (14)] and TIS (18) gene signature scores were computed using single sample GSEA with the same parameters as described above. Cohorts were then separated in two subgroups according to the optimal cut-off defined with surv_cutpoint function from survminer R package (31).

Validation datasets

We selected 442 patients with the filter "PAM50 – basal" from KMplot breast cancer cohort (32) and used online tools to compute the relapse free survival probabilities. We used the median value of our 8-genes and extended signature and separated the cohort according to the optimal score.

We tested our signature on the METABRIC dataset in which we selected 251 ER, PR, HER2 negative status and basal PAM50 patients (33). These data were accessed through Synapse (synapse.sagebase.org).

Survival analysis

We used survival and survminer R packages (31) to compute Kaplan Meier curves and log-rank test p-values to evaluate metastasis free survival differences.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the 9.4 SAS software version (SAS Institute, Inc., Cary, NC). The qualitative data were described by their numbers and percentages, the quantitative data by their medians and their ranges [min-max]. The quantitative data were analyzed as continuous variables.

Distant-relapse free interval (DRFI) was defined as the time interval between the surgery date and the date of death from BC or distant recurrence/metastases, whichever occurred first (34). Follow-up times were censored at last contact if no distant relapse had occurred or if patients had died without distant relapse. The follow-up was calculated using the inverse Kaplan-Meier method, where deaths are censored.

The Kaplan-Meier method was used to estimate DRFI, and the results were compared between groups with log-rank tests. For the univariate analysis of DRFI, hazard ratios (HR) and

95% confidence interval (95%CI) were calculated with the Cox proportional hazard regression model, P Wald is also reported.

Only variables with P<0.05 in the univariate analysis were included in multivariate analyzes to investigate their prognostic value. The proportionality of the risks was verified by the Schoenfeld test. A P-value <0.05 was considered significant.

Ethics

For this study, Institutional Review Board approval was obtained. Patients were informed of the study project and those who were not opposed were included in the study.

III. Results

Clinicopathological characteristics of the population.

Mean age of patients was 50.8 years old and 46% of them were menopausal. Post NACT, residual tumor sizes ranged from 1 mm to 110 mm. Fourteen (12%), 73 (63%) and 28 (24%) patients had RCBI, RCBII and RCBIII scores, respectively. Thirty-eight (33%) patients experienced a metastatic relapse during follow-up, with a median follow up of 82.8 months [IC95% (74.2; 94.7)]. Clinicopathological characteristics of the study cohort are detailed in Table 1.

Clinicopathologic characteristics of patients in the study		n	%
Age	≤ 50	60	52,2
	>50	55	47,8
Menopausal status	NR	1	0,9
	0	62	53,9
	1	52	45,2
cT	NR	2	1,7
	2	58	50,4
	3	38	33,0
	4	17	14,8
cN	0	59	51,3
	1/2/3	56	48,7
Chemotherapy regimen	Anthracyclines + taxanes	95	82,6
	Anthracyclines without taxanes	9	7,8
	Others	11	9,6
ypT	1	65	56,5
	2/3	50	43,5
ypN	ypN0	79	68,7
	ypN1/2	36	31,3
Elston & Ellis grade	NR	1	0,9
	2	37	32,2
	3	77	67,0
Ki67 index	<20%	32	27,8
	>=20%	83	72,2
Lymphovascular invasion	NR	1	0,9
	0	87	75,7
	1	27	23,5
TILs	<5%	11	9,6
	>=5%	104	90,4
RCB Class	I	14	12,2
	II	73	63,5
	III	28	24,3

Table 1: characteristics of the main cohort population. NR: not reported. SBR: Scarff-Bloom-Richardson grading. TILs: tumor-infiltrating lymphocytes. RCB: Residual Cancer Burden.

The tumor microenvironment of residual disease.

We performed an unsupervised hierarchical clustering of the gene expression of 115 residual tumors and found five different clusters, with different prognosis, and 4 groups of highly correlated genes enriched respectively in cell proliferation, epithelial-to-mesenchymal transition, interferon gamma-related response and immune cell localization to tumor (fig 1.A). The three clusters enriched in “immune cell localization to tumor” pathways had a better survival than the two clusters with poor immune cell activation. The worst subgroups in terms of prognosis were markedly enriched in genes implicated in “cell proliferation” pathways and were rather poor in immunological pathways-related genes (fig 1.B). Next, we evaluated biological pathways activity in each patient by performing single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA) and assessed significant differential activation between patients who later relapsed or not by applying Wilcoxon’s test. For this, we used the functional annotations determined by Nanostring on the IO360 panel. In the residual disease of patients who did not experience metastatic relapse, we found a significant upregulation of pathways implicated in immune response: “lymphoid compartment”, “cytokine and chemokine signaling”, “costimulatory signaling”, “antigen presentation”, “immune cell adhesion and migration”, and “JAK/STAT” signaling. For patients that later experienced a metastatic relapse, tumor microenvironment (TME) of the residual disease was enriched in many processes associated with the tumorigenic and metastatic processes such as “Hypoxia”, “Angiogenesis”, “TGF beta signaling, “Notch signaling” and “Cell Proliferation”. Patients who later experienced relapse also displayed other pathways such as “Autophagy”, “MAPK pathway”, “DNA damage repair”, “metabolic stress”, “PI3K.Akt”, “Epigenetic regulation” pathways. Results are shown on a volcano plot (Fig 1.C).

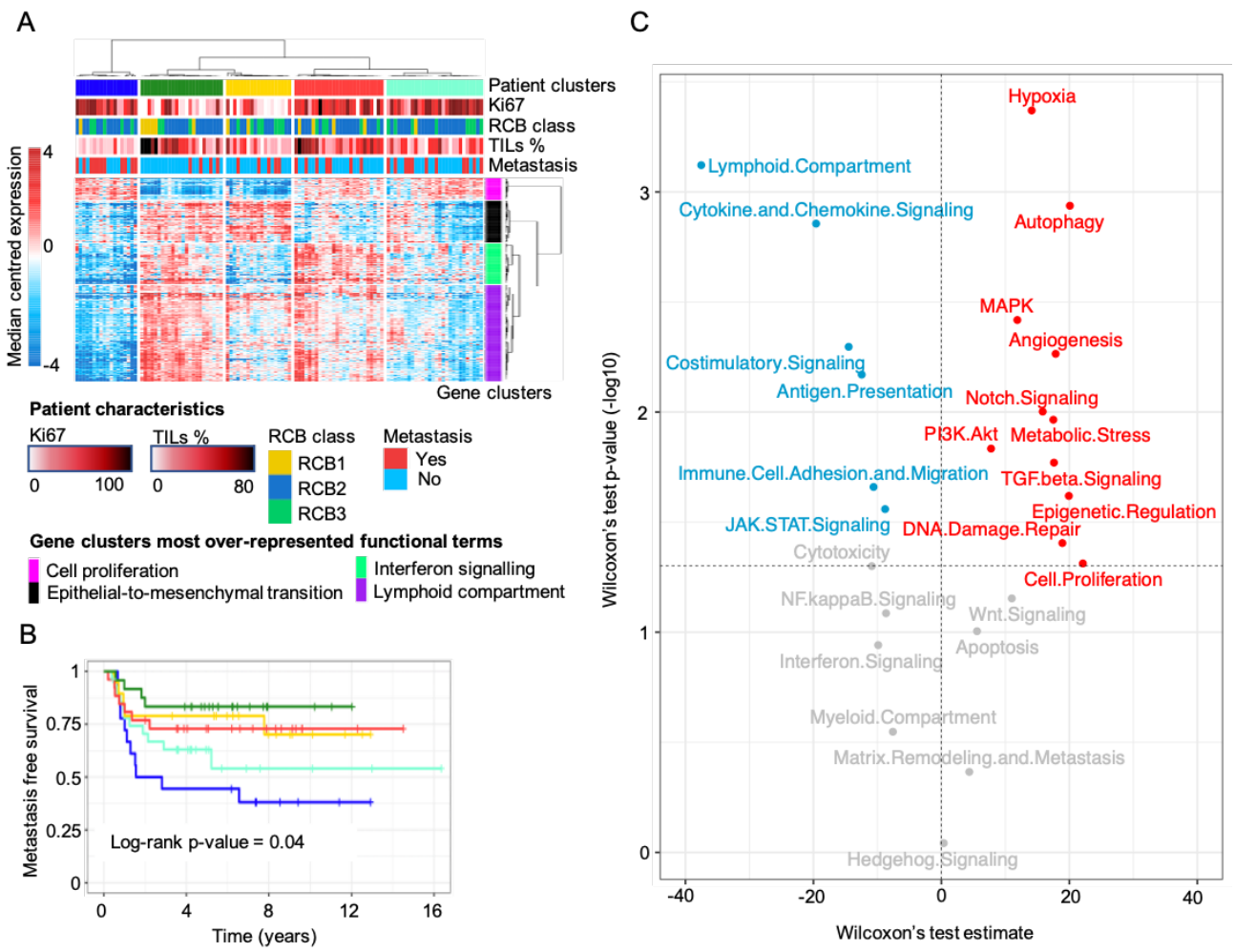


Figure 9: TME of the residual disease. A/ Unsupervised hierarchical clustering from 115 patients (columns) and 573 genes (rows) highlights five different patient subroups and four gene clusters for which the most significant enriched functions are presented in the legend. B/ Kaplan-Meier analysis of the five patient subgroups defined in A. C/ Volcano plot representing ssGSEA differential analysis. The x-axis represents the Wilcoxon's difference estimate and the y-axis the corresponding p-value. Significantly enriched IO360 pathways (p-value<0.05) in non-metastatic and metastatic patients are highlighted in blue and red respectively. RCB: residual cancer burden. TILs: tumor-infiltrating lymphocytes. TME: tumor microenvironment.

Immune profile of post NAC TNBC residual disease and metastatic relapse.

Next, we evaluated the composition of the immune infiltrate of the residual disease, and explored whether there were differences between patients with or without metastatic relapse. In our cohort, 30 patients (26%) had a TILs infiltrate of at least 50%. TILs were significantly associated with improved DRFI in univariate analysis; mean percentage of TILs in the residual disease of non-metastatic patients was 32,10 vs 17,55 for metastatic patients. Using two different methods (ssGSEA applied to Nanostring IO 360 genesets and MCP counter) to study immune populations, we observed highly significant differences in the immune infiltrate profiles of the post NAC residual tumors between patients who experienced metastatic recurrence and those who did not. The main population of this infiltrate were cells

of monocytic lineage/ macrophages (MCP counter method/ ssGSEA, respectively) (fig 2A, B). However, this myeloid infiltrate did not discriminate between metastatic and non-metastatic patients. In lymphoid populations, we found an enrichment in lymphocytes B, in total T cells (with a significant enrichment on the Nanostring genes set in Th1 cells, but not in Treg), in CD8 T cells (total and exhausted), on cytotoxic cells and in NK cells for patients that did not experience metastatic relapse (fig 2A, populations highlighted in bold characters). This enrichment was similar in the MCP counter method (fig 2A). Both approaches showed very consistent results, indeed, predictions for similar immune populations are highly correlated (Supplementary Figure 2B).

When related to the percentage of TILs on the residual disease as shown in fig 2B, these differences were less pronounced. Indeed, the most important difference was the total immune infiltration: patients who did not become metastatic had much more TILs on their residual disease (fig 2B). The CD45+ population as measured by the ssGSEA method had not the same distribution as the TILs (determined on H&E slides), which was expected since TILs reflect only the lymphocytic population. On these heatmaps, the main immune population was the macrophages/ monocytic population; there was also an enrichment in lymphocytic cells (mostly T, CD8, NK and to a lesser extent B cells) that seemed higher in non-metastatic patients (fig 2B and S2C).

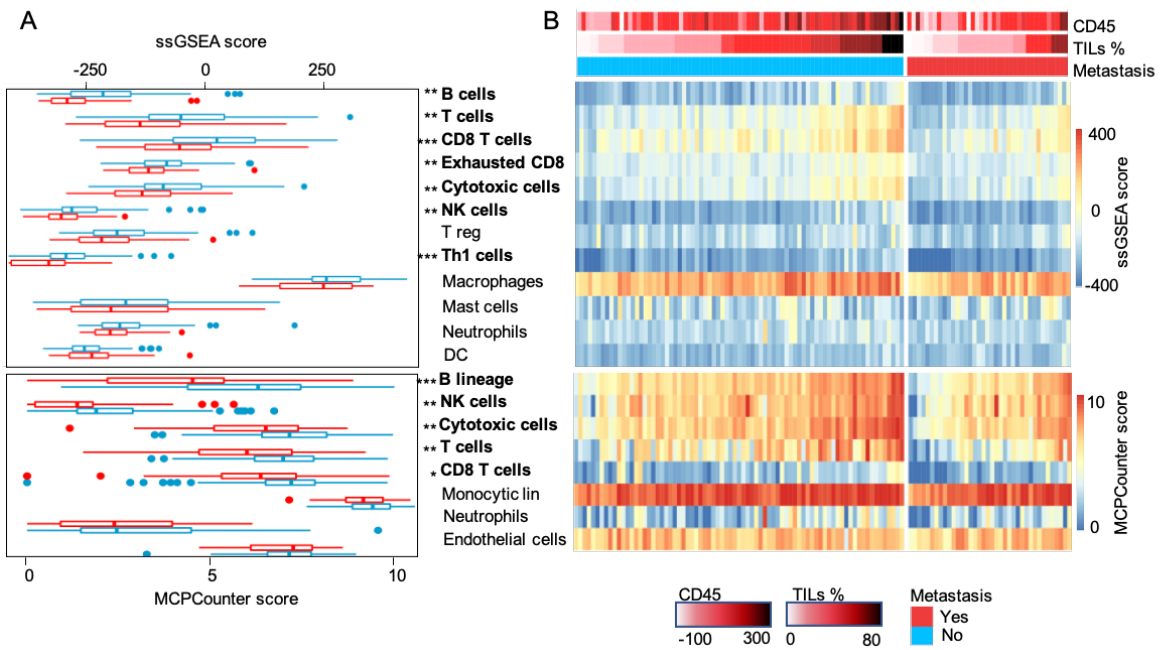
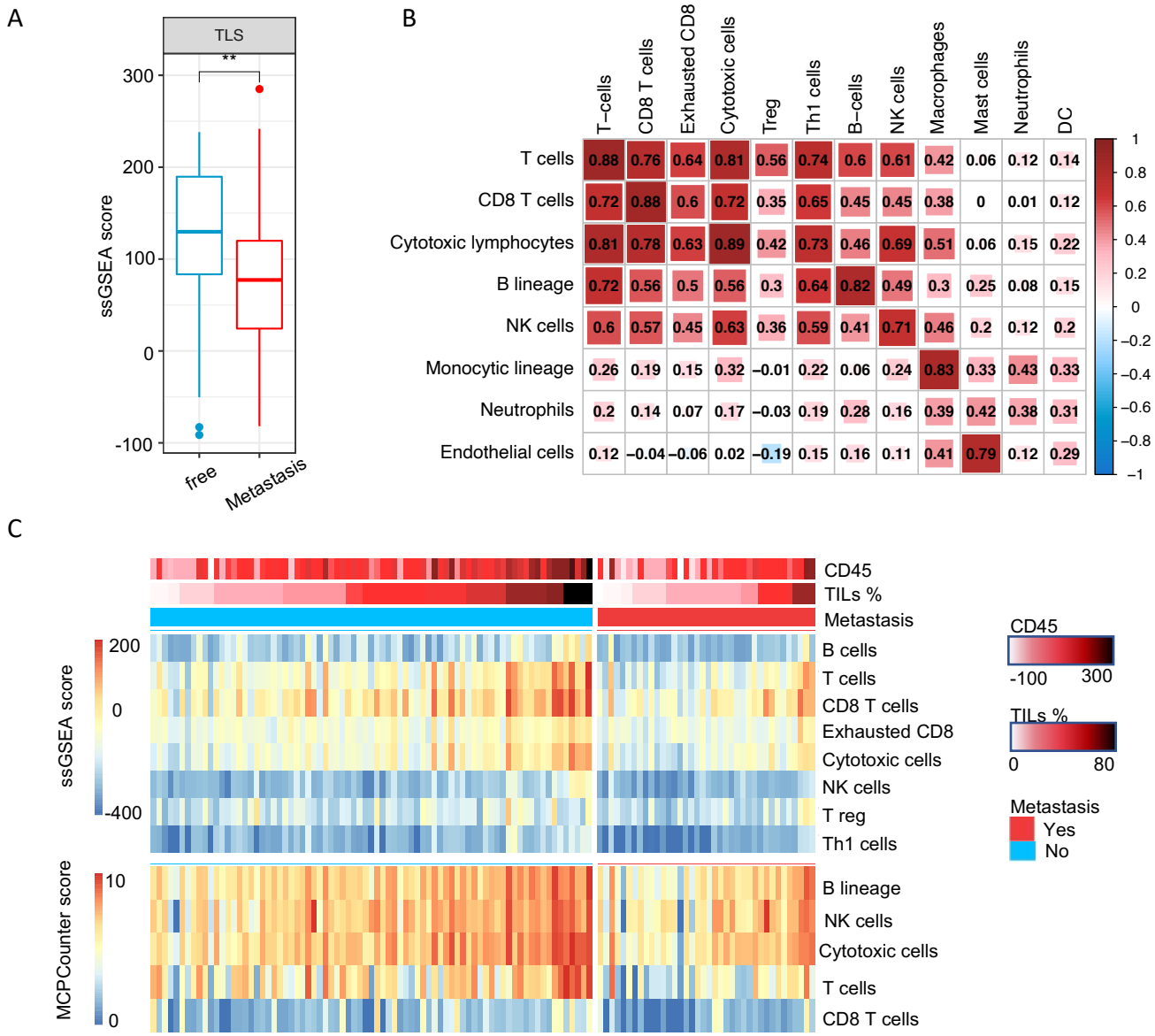


Figure 10: Analysis of the immune microenvironment of the residual disease in non-metastatic vs metastatic relapse patients. A/ Boxplots summarize score distributions in metastatic (red) and non-metastatic (blue) patients for each corresponding

immune cell population in B. B/ Heatmap representing immune infiltration scores computed with ssGSEA applied to Nanostring IO 360 genesets (top panel) and MCP counter (bottom panel). Patients (columns) are ranked according to TILs scores (H&E) in metastatic and non-metastatic patients, scores of CD45 ssGSEA enrichment are reported at the top of the heatmap. ***The heatmap gives for each immune population its relative enrichment in each sample.*** *B/ Wilcoxon's test significance are noted as p-value < 0.001 ***, p-value < 0.01 ** and p-value<0.05 *.*

Finally, because a high infiltration of B lymphocytes, cytotoxic cells and Th1 cells was detected in the immune infiltrate of non-relapsing patients, we applied the 12-chemokine gene expression score previously correlated to the presence of tumor localized ectopic lymph node-like structures (35) and found it was significantly enriched in patients who did not experience metastatic relapse (fig S2A).



Supplemental figure 2: Analysis of the immune microenvironment of the residual disease in non-metastatic vs metastatic patients. A/ Boxplot summarizes score distributions in metastatic (red) and non-metastatic (blue) patients for the tumor localized ectopic lymph node-like structures as proposed by Coppola et al (35)., also called tertiary lymphoid structures or TLS. B/ Heatmaps of correlation between the Nanostring IO 360 immune populations and the MCP counter method immune populations. C/ Heatmap representing immune infiltration scores computed with ssGSEA applied to Nanostring IO 360 genesets (top panel) and MCP counter (bottom panel) for lymphoid populations only. Patients (columns) are ranked according to TILs scores (H&E) in metastatic and non-metastatic patients, scores of CD45 ssGSEA enrichment are reported at the top of the heatmap. The heatmap gives for each immune population its relative enrichment in each sample, compared to other immune populations.

Construction of an 8-genes prognostic signature.

We implemented a 1000 times sub-sampling procedure (detailed in Methods) to determine robust survival predictive power of each gene and selected eight genes (*BLK, GZMM, CXCR6, LILRA1, SPIB, CCL4, CXCR4, SLAMF7)* being significantly associated with survival (logrank test p-value < 0.05 in >90% of iterations). The score was derived from the 8-genes list using ssGSEA. We tested our signature for the whole cohort and in the RCBII subgroup since it contains patients with very heterogeneous outcomes; we used ssGSEA with the eight selected genes as the genes set. The 8-gene signature could accurately predict the DRFI of our patients with an HR of 0.18 (IC95 0.09; 0.35), p < 0.001 (fig 3A). Interestingly, our signature could also separate high-risk patients and low-risk patients in the RCBII group [HR 0.15 (IC95 0.06; 0.4), p < 0.001] (fig 3B). The heatmap showing the 8 genes expression according to the signature score is shown in fig 3C, along with the metastatic status, the RCB class, the presence of lymphovascular emboli and the levels of TILs as seen in H&E.

We next sought to investigate the individual prognostic values of each gene in an independent cohort. We therefore used the KMplot website (https://kmplot.com) (32) and checked the prognostic role of each gene in the basal PAM50 subtype (fig S3A). All genes but one were associated with a significant improved prognosis on this cohort. The fact that *BLK* had a non-significant trend toward a better survival could be explained by several reasons: lack of sensitivity, intercohort variability, or the fact that one gene can be associated with several pathways with diverse biological functions. To overcome this problem, we studied the correlations between all of our genes in our cohort, and identified 55 genes that presented a correlation score ≥ 0.8 with at least one gene from our signature. This led to the development of an "extended signature" composed of 63 genes, which could also predict survival of our patients with good accuracy (HR 0.27 [IC 95 0.14; 0.51], p < 0.001) (fig 3D). When applying gene ontology (GO) on this set of genes, the main represented pathways were in favor of a strong lymphoid response (lymphoid compartment, costimulatory signaling with *TIGIT, PDCD1/PD1* among others, interactions between a lymphoid and a non-lymphoid cells, TCR-related pathways, etc.) (fig S3B).

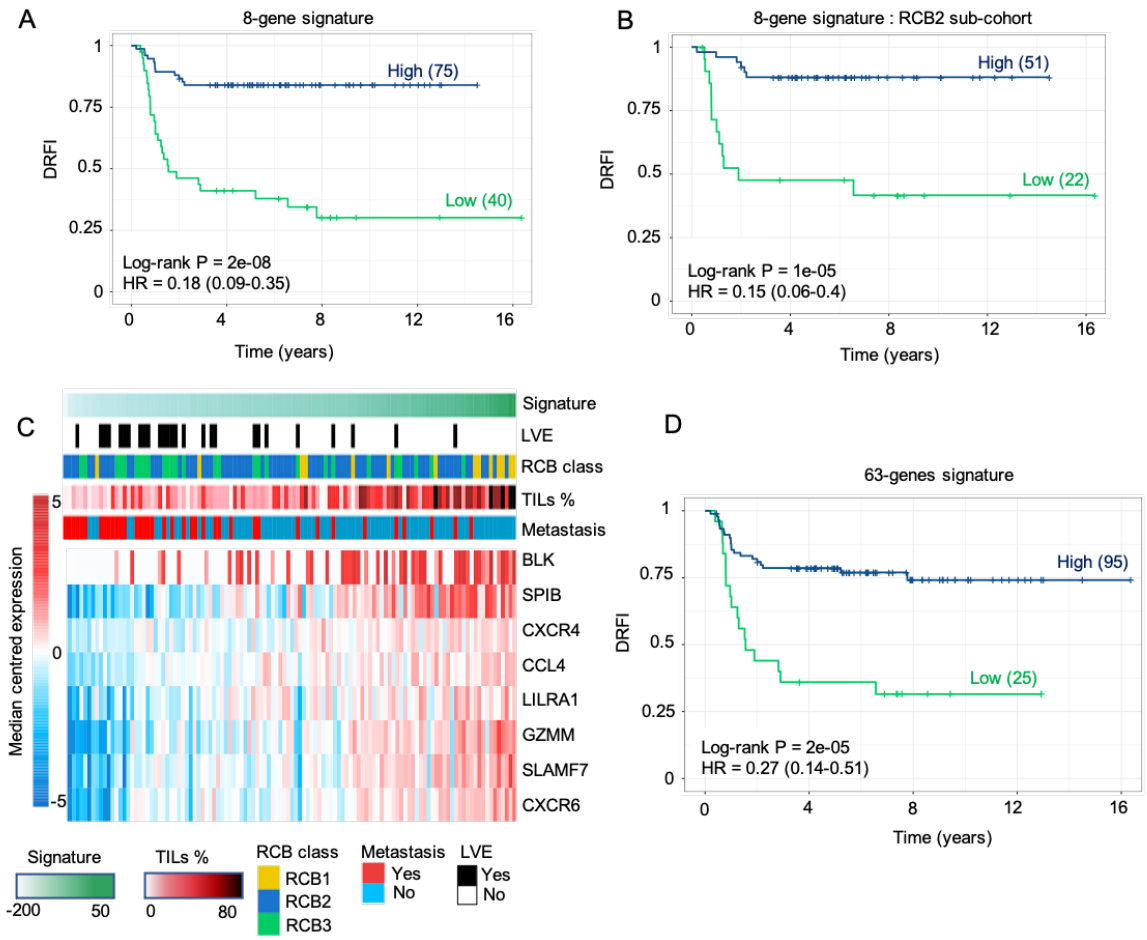
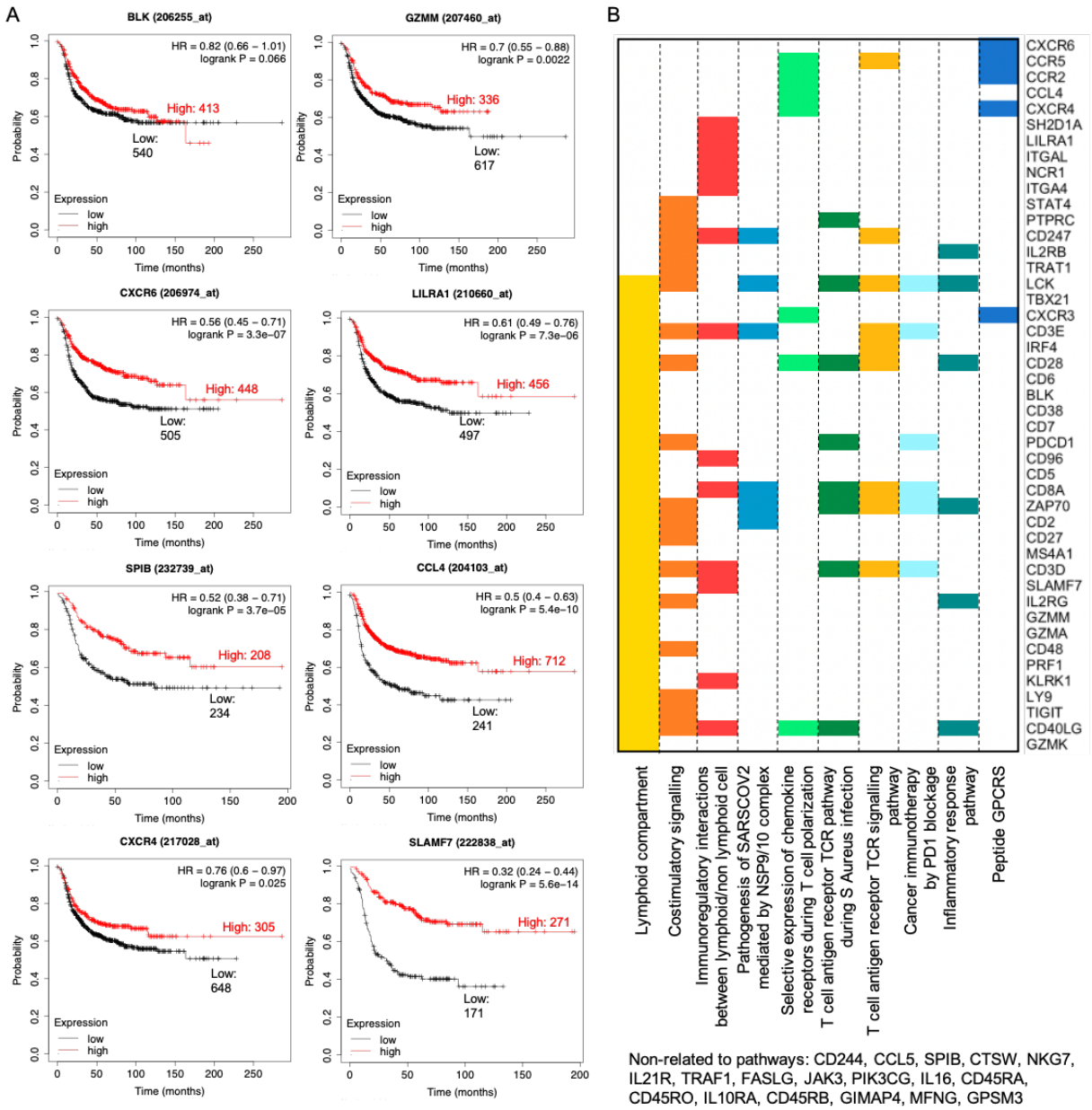


Figure 11: Design of an immune-related signature to predict survival from patients with residual disease after NACT. A-B/ KM plot of the 8-genes signature on total cohort and RCBII subgroup. C/ Heatmap representing the median centered gene expression of the 8 genes signature (rows) with patient (columns) ordered by the signature score; column annotations show the presence of metastases, of lymphovascular emboli (LVE), the RCB class and TILs levels. D/ Prognostic value of the extended signature on the cohort. For survival analysis, the cohorts are separated by the optimal cut-off. DRFI: Disease Relapse Free Interval.



Supplemental figure 3: A/ Kaplan-Meier plots of the relapse-free survival of patients from multiple gene datasets, from the KMplot website, using the 8 genes from our signature. Cut-off optimal. B/ Significantly overrepresented pathways (FDR<0.05) in the extended signature genes. Colored cells correspond to the presence of genes (rows) in pathways (columns). Genes not associated with any of the pathways appear in the box below.

Validation of the 8-gene signature and extended gene signature in external datasets.

To validate our results, we applied our signatures to the KMplot website selecting only the PAM50 basal subtype (32), and to the TNBC patients from the METABRIC cohort (33) via the synapse.org website. In the KMplot website, a high 8-gene signature score predicted a significantly better relapse-free survival (RFS) of patients with basal breast cancer: HR 0.54 (IC95 0.4 – 0.74), $p < 0.0001$, and the extended signature was even more accurate: HR 0.35 (IC95 0.26 – 0.49), $p < 0.0001$ (fig 4A and B). Similar observations were made after screening

the METABRIC cohort. A high signature score predicted a better disease-specific survival (DSS), and the extended signature was more precise than the 8-gene signature [HR 0.53 (IC95 0.35; 0.8), $p < 0.01$ and HR 0.43 (IC95 0.29; 0.64), $p < 0.01$, respectively, fig 4C and 4D]. Since several previous signatures have been developed to study the immune microenvironment of cancer, we checked the prognostic impact of the "immunologic constant of rejection" (ICR) (14) and the "Tumor inflammation signature" (14) on the METABRIC dataset (Fig 4 E to H). The 8-gene signature, extended signature, ICR and TIS showed equivalent predictive power. Overall, our signatures robustly predicted outcome in two independent cohorts other than our training set, the extended signature being more precise.

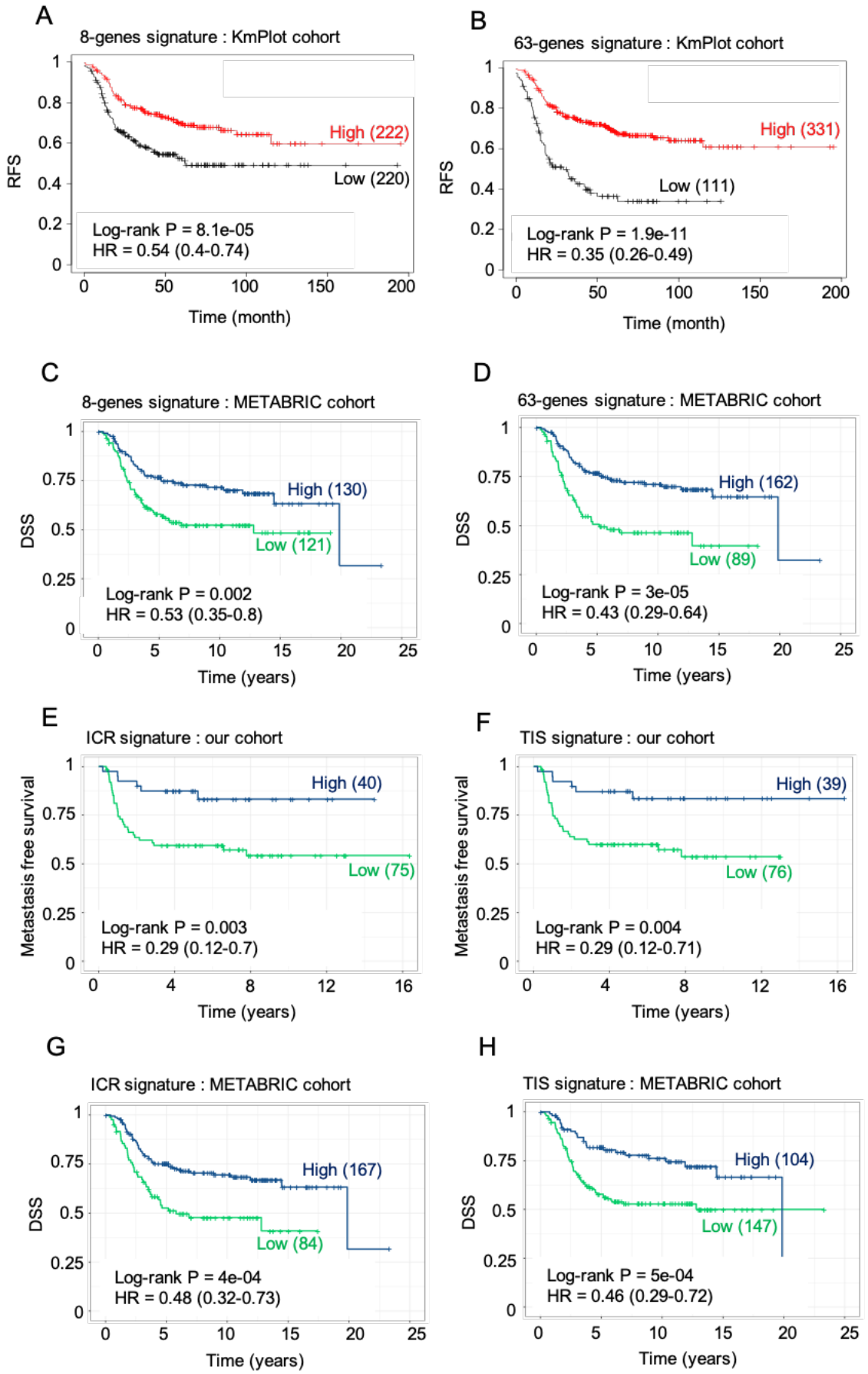

A
8-genes signature : KmPlot cohort
RFS
High (222)
Low (220)
Log-rank P = 8.1e-05
HR = 0.54 (0.4-0.74)
Time (month)
B
63-genes signature : KmPlot cohort
RFS
High (331)
Low (111)
Log-rank P = 1.9e-11
HR = 0.35 (0.26-0.49)
Time (month)
C
8-genes signature : METABRIC cohort
DSS
High (130)
Low (121)
Log-rank P = 0.002
HR = 0.53 (0.35-0.8)
Time (years)
D
63-genes signature : METABRIC cohort
DSS
High (162)
Low (89)
Log-rank P = 3e-05
HR = 0.43 (0.29-0.64)
Time (years)
E
ICR signature : our cohort
Metastasis free survival
High (40)
Low (75)
Log-rank P = 0.003
HR = 0.29 (0.12-0.7)
Time (years)
F
TIS signature : our cohort
Metastasis free survival
High (39)
Low (76)
Log-rank P = 0.004
HR = 0.29 (0.12-0.71)
Time (years)
G
ICR signature : METABRIC cohort
DSS
High (167)
Low (84)
Log-rank P = 4e-04
HR = 0.48 (0.32-0.73)
Time (years)
H
TIS signature : METABRIC cohort
DSS
High (104)
Low (147)
Log-rank P = 5e-04
HR = 0.46 (0.29-0.72)
Time (years)

Figure 12: Survival analysis of predictive signatures. A-B/ 8- and 63- genes signature on KMplot dataset with basal breast cancer. C-D/ 8- and 63- genes, Hendricks and TIS signature on METABRIC dataset selected for TNBC patients. Hendricks « immunologic constant of rejection » or ICR and F/ Ayers « Tumor inflammation signature » or TIS signatures on PRINCESSE cohort. E-H/ Cohorts are separated by the optimal score value obtained with ssGSEA on our and METABRIC cohorts and gene median in the KMplot cohort. DRFI: Disease Relapse Free Interval, RFS: Relapse Free Survival, DSS: Disease Specific Survival

Multivariate analysis of factors associated with relapse on TNBC post NACT residual disease.

We performed a multivariate analysis to compare the prognostic impact of TILs, the RCB score, our 8-gene signature (all as continuous variables) and the presence of lymphovascular emboli (all these factors but our signature appeared significantly associated with prognosis in univariate analysis in a previous study based on this cohort (36)). In this analysis, the RCB score and the signature appear as two independent predictive factors of metastatic relapse; the lymphovascular emboli were not significant (p = 0,059) but improved the predictive value of the model (table 2).

	N=115	univariate analysis (DRFS) (Cox)				multivariate analysis (DRFS) (Cox)			
	N	p(wald)	HR	IC95% HR		p(wald)	HR	IC95% HR	
Tils %									
N	115	0.0036	0.972	0.954	0.991	not retained p=0.86			
Median value	20								
Signature score									
N	115								
Median value	-63.16	<.0001	0.985	0.979	0.991	0.0019	0.988	0.980	0.995
RCB score									
N	115	<.0001	2.712	1.908	3.855	0.0020	1.910	1.266	2.881
Median value	2.1								
LVE									
N	114								
Not seen	87	<.0001	1			0.0591	1		
Present	27		6.088	3.166	11.71		2.090	0.972	4.493

Table 2: Multivariate analysis of factors associated with Distant-Relapse Free Survival (DRFS). LVE: lymphovascular emboli. RCB: Residual Cancer Burden. TILs: Tumor-Infiltrating Lymphocytes.

IV. Discussion

This study is, to the best of our knowledge, the first transcriptomic analysis to describe the immune microenvironment of the residual disease in post-NACT TNBC. Residual disease in post-NACT TNBC has been the subject of numerous publications in recent years, due to its particularly poor prognostic significance. Pathways such as cell-cycle alteration, PI3K/mTOR, DNA repair, Ras/MAPK and growth factor receptors were found to be altered in at least 10% of cases in a transcriptomic study from Balko et al.; a MEK-based signature was associated with worse RFS and OS on the 64 patients of the cohort (37). In our cohort, MAPK pathway was enriched in the residual disease of patients who later experience relapse. This MEK/MAPK/RAS pathway activation is of greatest interest, since it has been inversely correlated with TILs infiltration of residual disease from TNBC patients (38), and was found over-expressed in the less immunogenic module in the ICR classification (14). Moreover, MEK inhibition in association with immune agonists was shown to enhance anti-tumor immune response in preclinical models of TNBC, via the upregulation of MHC-I (38,39). These findings stress even more the importance of the immunological context of the residual disease, since they demonstrate, at the cancer cell level, that parts of resistance mechanisms are mediated through immune evasion.

We identified a combination of 8 immune-related genes whose expression accurately predicted relapse-free survival in our cohort of 115 TNBC patients with residual disease. Interestingly, these genes are strongly linked to major immune cell types. Indeed, four genes of the signature can be strongly associated with B-lymphocytes. **BLK**, also known as B lymphocyte kinase, is a non-receptor tyrosine kinase essentially involved in B-cell receptor signaling and B-cell development. **SPIB** (Spi-B transcription factor) is strongly associated with plasmacytoid dendritic cells and is expressed in B cells where it can be required for B-cell receptor (BCR) signaling, which is necessary for normal B-cell development and antigenic stimulation. Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor A1 or **LILRA1** is known to be predominantly expressed in B cells and to interact with major histocompatibility complex class I ligands; however, it appears to be also expressed on monocytes and macrophages based on the human protein atlas (www.proteinatlas.org). Signaling Lymphocytic Activation Molecule 7 or **SLAMF7** is known as a strong marker of plasma cells, though in our signature it seems mostly associated with cytotoxic activation as recently reported elsewhere (high correlations

with genes such as *CD27*, *ITGAL*, *CD96*, etc. data not shown) (40,41). Indeed, our signature also reflects a strong cytotoxic activation. Granzyme M or **GZMM** is one of the five human granzymes, mainly expressed by innate lymphoid cells (NK cells, NKT cells), gamma delta T cells and by one subtype of differentiated CD8 T cells (42). Significance of the chemokine receptors (CCL4, CXCR4, CXCR6) of the signature is more challenging to determine, since they are involved in many different signaling pathways. **CXCR4** is the chemokine receptor of CXCL12, also known as stromal-derived factor 1 (SDF-1). Many reports on CXCR4 in breast cancer point toward a pro-tumorigenic role of the CXCR4/CXCL12 axis. CXCR4 signaling has been shown to activate the PI3K/ATK pathway, the MAPK pathway and the JAK/STAT pathway leading to cell survival, proliferation, migration of cancer cells, etc. (43). CXCR4 is also expressed on the cell surface of most leukocytes including B cells, monocytes and most T lymphocyte subsets. In our study, the CXCR4 gene was correlated to *TNFAIP3* and *CD69* (correlation coefficients 0,69 and 0,62 respectively, data not shown), which are linked to lymphocyte activation. **CXCR6** is the exclusive chemokine receptor of CCL16; CXCR6/CCL16 are involved in the regulation of T lymphocyte migration to peripheral tissues. In preclinical models of cancer, CXCR6 was shown to mediate the recruitment of NKT cells and TCD4+ lymphocytes (44) and a specific subset of CXCR6-expressing T CD8+ resident memory subset (45), all of them carrying anti-tumorigenic functions. **CCL4**, also known as macrophage inflammatory protein-1α, interacts with CCR5 and is involved in the recruitment of many leukocytes to inflammatory sites and in the function of CD4 T cells. In tumors, it is secreted by B lymphocytes and basophils. However, it can also be associated with the pro-tumorigenic immune response (46). Since most genes are associated with several pathways, we developed an “extended signature” which includes 63 genes. Pathways involved in this signature were also strongly in favor of a lymphoid activation. This was in line with the analysis of immune cells of the residual disease, with a significant difference between non-metastatic and metastatic patients for all the anti-tumorigenic lymphocytic cells (T lymphocytes, cytotoxic cells, T CD8+ cells, B lymphocytes, NK cells, etc.). Bulk transcriptomic analysis cannot directly show the presence of organized structures such as tertiary lymphoid structures (TLS), however gene signatures of TLS have been proposed as a reflect of these structures’ formation (35,47). Since our findings, both on the immune cells infiltrates and of the signature, point toward a coordinated activation of cytotoxic cells, B lymphocytes/ plasma cells and Th1 cells, we applied

a 12-chemokine gene signature to our cohort and found a significant enrichment in patients who did not experience relapse, suggesting a role of these structures in our TNBC patients.

Our results are not surprising; indeed, chemotherapy and particularly Doxorubicin can induce an immunogenic cell death (ICD), a process that differs from apoptosis and leads to the release of numerous damage-associated molecular patterns (DAMPs) by cancer cells, which in turn induces immune response (48). This process was recently exploited in the TONIC trial, where Doxorubicin induction was the most efficient to induce a response to PD-1 blockade therapy (49). In our study, patients with residual disease with the best prognosis harbored tumors whose microenvironment expressed genes reflecting cytotoxic lymphocyte activation and B-cell response, advocating for an anti-tumor immune response induced by chemotherapy.

Another finding of this study is the significant domination of macrophages and/or monocytic cells on the total immune infiltrate. Indeed, macrophages/ monocytic cells were by far the most frequent population in our patients' samples. However, we were not able to show any prognostic difference with these cells. This can be explained by the limited number of genes from the panel we used, which did not allow a clear functional analysis of the macrophages. This finding stresses the need for further studies on the myeloid infiltrates of TNBC in this setting.

Our study has some limitations, one being the use of a very limited panel. This does not allow an exhaustive analysis of the metastatic relapse environment, whether it is the complete analysis of immune populations (many genes missing to use CIBERSORT-type deconvolution methods), or the exploration of signaling pathways not covered by the panel (such as stemness-related genes and their interactions with immune cells populations, etc.). However, the Nanostring technology with an 800 targeted gene panel was interesting in this cohort since it can be applied to FFPE samples, with usually more degraded RNA than RNA from other sources. Moreover, this technology does not require any amplification, which limits the risk of a bias of poor-quality RNA. The fact that we used older samples with decreased quality of RNA could be seen as another limitation of this study, leading to bias in the results; however, these samples are closer to what can be analyzed in clinical settings. Finally, we validated our signatures on external cohorts. However, the RNA expression range values vary between platforms and patient cohorts, thus preventing the definition of a

common threshold. Our signatures and their thresholds should be determined in a dedicated validation study to allow the utilization of these signatures in clinical practice.

Overall, we show here that metastatic relapse in TNBC patients with post-NACT residual disease is highly mediated by the immune infiltration, and propose an immunologic prognostic gene-signature for TNBC patients with residual disease. This signature can accurately identify high risk patients from the RCBII subgroup, which could allow the implementation of targeted therapeutic strategies to improve these patients' prognosis.

V. Acknowledgements

We wish to thank patients for their support in the realization of this study.

We thank the Comité Prévention Dépistage des Cancers who funded this work.

We thank Pippa McKelvie-Sebileau for medical editing in English and D. Quincy for manuscript submission. We would like to thank especially Erin Piazza and David Henderson Nanostring for our discussion regarding the Nanostring data analysis.

The results published here are in part based upon data generated by the TCGA Research Network: https://www.cancer.gov/tcga.

1. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA*, et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;**13**(15 Pt 1):4429-34 doi 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045.
2. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA*, et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;**26**(8):1275-81 doi 10.1200/JCO.2007.14.4147.
3. Symmans WF, Wei C, Gould R, Yu X, Zhang Y, Liu M*, et al.* Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. *J Clin Oncol* 2017;**35**(10):1049-60 doi 10.1200/JCO.2015.63.1010.
4. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, Im YH, Lee ES, Yokota I*, et al.* Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *N Engl J Med* 2017;**376**(22):2147-59 doi 10.1056/NEJMoa1612645.
5. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN*, et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol* 2014;**32**(27):2959-66 doi 10.1200/JCO.2013.55.0491.

6. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R*, et al.* 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* 2015;**33**(9):983-91 doi 10.1200/JCO.2014.58.1967.
7. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F*, et al.* 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* 2013;**31**(7):860-7 doi 10.1200/JCO.2011.41.0902.
8. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H*, et al.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2018;**379**(22):2108-21 doi 10.1056/NEJMoa1809615.
9. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kummel S, Bergh J*, et al.* Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2020;**382**(9):810-21 doi 10.1056/NEJMoa1910549.
10. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM*, et al.* Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet* 2020;**396**(10265):1817-28 doi 10.1016/S0140-6736(20)32531-9.
11. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F*, et al.* Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Semin Cancer Biol* 2017 doi 10.1016/j.semcancer.2017.10.003.
12. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011;**331**(6024):1565-70 doi 10.1126/science.1203486.
13. Bedognetti D, Hendrickx W, Marincola FM, Miller LD. Prognostic and predictive immune gene signatures in breast cancer. *Curr Opin Oncol* 2015;**27**(6):433-44 doi 10.1097/CCO.0000000000000234.
14. Hendrickx W, Simeone I, Anjum S, Mokrab Y, Bertucci F, Finetti P*, et al.* Identification of genetic determinants of breast cancer immune phenotypes by integrative genome-scale analysis. *Oncoimmunology* 2017;**6**(2):e1253654 doi 10.1080/2162402X.2016.1253654.
15. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S*, et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* 2010;**134**(7):e48-72 doi 10.1043/1543-2165-134.7.e48
10.5858/134.7.e48.
16. Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, MacGrogan G, Roger P, Treilleux I, Valent A*, et al.* [2014 update of the GEFPICS' recommendations for HER2 status determination in breast cancers in France]. *Ann Pathol* 2014;**34**(5):352-65 doi 10.1016/j.annpat.2014.08.018.

17. Provenzano E, Bossuyt V, Viale G, Cameron D, Badve S, Denkert C*, et al.* Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. *Mod Pathol* 2015;**28**(9):1185-201 doi 10.1038/modpathol.2015.74.
18. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR*, et al.* IFN-gamma-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest* 2017;**127**(8):2930-40 doi 10.1172/JCI91190.
19. Goldman MJ, Craft B, Hastie M, Repecka K, McDade F, Kamath A*, et al.* Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol* 2020;**38**(6):675-8 doi 10.1038/s41587-020-0546-8.
20. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL*, et al.* Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* 2006;**10**(6):529-41 doi 10.1016/j.ccr.2006.10.009.
21. Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA*, et al.* Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;**24**(26):4236-44 doi 10.1200/JCO.2006.05.6861.
22. Waggott D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. NanoStringNorm: an extensible R package for the pre-processing of NanoString mRNA and miRNA data. *Bioinformatics* 2012;**28**(11):1546-8 doi 10.1093/bioinformatics/bts188.
23. Csardi G, Nepusz T. The igraph software package for complex network research. *InterJournal* 2006;**Complex Systems**:1695.
24. Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *2008* 2008;**25**(1):18 doi 10.18637/jss.v025.i01.
25. Kolde R. Pretty Heatmaps 2019.
26. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 2012;**16**(5):284-7 doi 10.1089/omi.2011.0118.
27. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA*, et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**(43):15545-50 doi 10.1073/pnas.0506580102.
28. Hanzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 2013;**14**:7 doi 10.1186/1471-2105-14-7.
29. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F*, et al.* Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol* 2016;**17**(1):218 doi 10.1186/s13059-016-1070-5.
30. Therneau T. _A Package for Survival Analysis in R_. R package version 3.2-7 2020.
31. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P. survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2' 2020.
32. Gyorffy B. Survival analysis across the entire transcriptome identifies biomarkers with the highest prognostic power in breast cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2021;**19**(2021) doi 10.1016/j.csbj.2021.07.014.
33. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ*, et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012;**486**(7403):346-52 doi 10.1038/nature10983.
34. Gourgou-Bourgade S, Cameron D, Poortmans P, Asselain B, Azria D, Cardoso F*, et al.* Guidelines for time-to-event end point definitions in breast cancer trials: results of the

DATECAN initiative (Definition for the Assessment of Time-to-event Endpoints in CANcer trials). *Ann Oncol* 2015;**26**(12):2505-6 doi 10.1093/annonc/mdv478.

35. Coppola D, Nebozhyn M, Khalil F, Dai H, Yeatman T, Loboda A*, et al.* Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am J Pathol* 2011;**179**(1):37-45 doi 10.1016/j.ajpath.2011.03.007.
36. Pinard C, Debled M, Ben Rejeb H, Velasco V, Tunon de Lara C, Hoppe S*, et al.* Residual cancer burden index and tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in triple-negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2020;**179**(1):11-23 doi 10.1007/s10549-019-05437-z.
37. Balko JM, Giltnane JM, Wang K, Schwarz LJ, Young CD, Cook RS*, et al.* Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov* 2014;**4**(2):232-45 doi 10.1158/2159-8290.CD-13-0286.
38. Loi S, Dushyanthen S, Beavis PA, Salgado R, Denkert C, Savas P*, et al.* RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res* 2016;**22**(6):1499-509 doi 10.1158/1078-0432.CCR-15-1125.
39. Dushyanthen S, Teo ZL, Caramia F, Savas P, Mintoff CP, Virassamy B*, et al.* Agonist immunotherapy restores T cell function following MEK inhibition improving efficacy in breast cancer. *Nat Commun* 2017;**8**(1):606 doi 10.1038/s41467-017-00728-9.
40. Loyal L, Warth S, Jurchott K, Molder F, Nikolaou C, Babel N*, et al.* SLAMF7 and IL-6R define distinct cytotoxic versus helper memory CD8(+) T cells. *Nat Commun* 2020;**11**(1):6357 doi 10.1038/s41467-020-19002-6.
41. Cachot A, Bilous M, Liu YC, Li X, Saillard M, Cenerenti M*, et al.* Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer. *Sci Adv* 2021;**7**(9) doi 10.1126/sciadv.abe3348.
42. de Koning PJ, Tesselaar K, Bovenschen N, Colak S, Quadir R, Volman TJ*, et al.* The cytotoxic protease granzyme M is expressed by lymphocytes of both the innate and adaptive immune system. *Mol Immunol* 2010;**47**(4):903-11 doi 10.1016/j.molimm.2009.10.001.
43. Luker KE, Luker GD. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett* 2006;**238**(1):30-41 doi 10.1016/j.canlet.2005.06.021.
44. Mossanen JC, Kohlhepp M, Wehr A, Krenkel O, Liepelt A, Roeth AA*, et al.* CXCR6 Inhibits Hepatocarcinogenesis by Promoting Natural Killer T- and CD4(+) T-Cell-Dependent Control of Senescence. *Gastroenterology* 2019;**156**(6):1877-89 e4 doi 10.1053/j.gastro.2019.01.247.
45. Christian LS, Wang L, Lim B, Deng D, Wu H, Wang XF*, et al.* Resident memory T cells in tumor-distant tissues fortify against metastasis formation. *Cell Rep* 2021;**35**(6):109118 doi 10.1016/j.celrep.2021.109118.
46. Korbecki J, Grochans S, Gutowska I, Barczak K, Baranowska-Bosiacka I. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of Receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 Ligands. *Int J Mol Sci* 2020;**21**(20) doi 10.3390/ijms21207619.

47. Sautes-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2019;**19**(6):307-25 doi 10.1038/s41568-019-0144-6.
48. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N*, et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005;**202**(12):1691-701 doi 10.1084/jem.20050915.
49. Voorwerk L, Slagter M, Horlings HM, Sikorska K, van de Vijver KK, de Maaker M*, et al.* Immune induction strategies in metastatic triple-negative breast cancer to enhance the sensitivity to PD-1 blockade: the TONIC trial. *Nat Med* 2019;**25**(6):920-8 doi 10.1038/s41591-019-0432-4.

Perspectives et conclusion

Au cours de ce travail, nous avons pu développer une signature transcriptomique pronostique liée à l'immunité, ainsi qu'une version « étendue » potentiellement plus facilement exportable. Ces signatures classent de façon satisfaisante les patientes dans deux cohortes externes de patientes atteintes de cancers triple-négatifs et/ou basal-like (METABRIC, KMplot).

Au sein de notre cohorte, la signature ressort comme un facteur pronostique indépendant en analyse multivariée, bien que les TILs soient un concurrent sérieux. Ce résultat est bien sûr à valider dans une autre cohorte clinique, de même que les seuils idéaux restent à déterminer. En effet, les valeurs du score des signatures varient énormément selon les cohortes choisies, notamment parce que des techniques différentes ont été utilisées pour les analyses transcriptomiques. La prochaine étape de ce projet sera donc de valider les signatures (à 8 gènes et « étendue ») sur une cohorte externe, avec une technique d'analyse transcriptomique unique (soit RNA sequencing, soit panel custom Nanostring), et de remettre en concurrence la signature avec le RCB et les TILs en analyse multivariée pour vérifier l'apport de la signature dans cette situation clinique.

A moyen terme, cette signature pourrait permettre d'identifier les patientes qui bénéficieraient réellement d'une thérapie adjuvante, tout particulièrement dans la catégorie RCBII. Nos signatures se concentrant sur la présence ou non d'un infiltrat immunitaire à l'issue de la chimiothérapie, elles pourraient également guider la stratégie thérapeutique des patientes (association chimio-immunothérapie par exemple pour les patientes ayant un infiltrat immunitaire faible), mais cela reste à prouver dans des études dédiées.

Bibliographie

1. Defossez G. LGPS, Uhry Z., Grosclaude P., Colonna M., Dantony E. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Synthèse.; 2019.
2. Fumoleau PM, D. ; Lanta, M. Les cancers du sein. La ligue contre le cancer; 2018.
3. INCa. Les cancers du sein 2019 [
4. environnement Uce. Cancer environnement - cancer du sein 2019 [Available from: https://www.cancer-environnement.fr/144-Cancer-du-sein.ce.aspx#Les_facteurs_de_risques_environnementaux.
5. Hoon Tan P, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the breast. Histopathology. 2020.
6. GEFPICS-FNCLCC. [Recommendations for the immunohistochemistry of the hormonal receptors on paraffin sections in breast cancer. Update 1999. Group for Evaluation of Prognostic Factors using Immunohistochemistry in Breast Cancer (GEFPICS-FNCLCC)]. Ann Pathol. 1999;19(4):336-43.
7. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. J Clin Oncol. 2020;38(12):1346-66.
8. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. J Clin Oncol. 2018;36(20):2105-22.
9. Penault-Llorca F. [Breast cancer classification is evolving]. Biol Aujourdhui. 2014;208(4):251-9.
10. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000;406(6797):747-52.
11. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(19):10869-74.
12. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(14):8418-23.
13. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. J Clin Oncol. 2009;27(8):1160-7.
14. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Ann Oncol. 2013;24(9):2206-23.
15. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2019.

16. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. Oncogene. 2005;24(29):4660-71.
17. MacGrogan G, Vincent-Salomon A, Arnould L. EPU pathologie mammaire 2018. 2018.
18. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res. 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
19. Bonnefoi H, MacGrogan G, Poncet C, Iggo R, Pommeret F, Grellety T, et al. Molecular apocrine tumours in EORTC 10994/BIG 1-00 phase III study: pathological response after neoadjuvant chemotherapy and clinical outcomes. Br J Cancer. 2019;120(9):913-21.
20. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. N Engl J Med. 2010;363(20):1938-48.
21. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. Nature. 2012;486(7403):346-52.
22. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al. How basal are triple-negative breast cancers? Int J Cancer. 2008;123(1):236-40.
23. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. BMC Genomics. 2006;7:96.
24. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2012;490(7418):61-70.
25. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. J Clin Invest. 2011;121(7):2750-67.
26. Lehmann BD, Jovanovic B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. PLoS One. 2016;11(6):e0157368.
27. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. Clin Cancer Res. 2015;21(7):1688-98.
28. Jiang YZ, Ma D, Suo C, Shi J, Xue M, Hu X, et al. Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. Cancer Cell. 2019;35(3):428-40 e5.
29. Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. Ann Oncol. 2018;29(4):895-902.
30. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. Clin Cancer Res. 2013;19(19):5533-40.
31. Goncalves A, Sabatier R, Charafe-Jauffret E, Gilabert M, Provansal M, Tarpin C, et al. [Triple-negative breast cancer: histoclinical and molecular features, therapeutic management and perspectives]. Bull Cancer. 2013;100(5):453-64.
32. Petrelli F, Cabiddu M, Coinu A, Borgonovo K, Ghilardi M, Lonati V, et al. Adjuvant dose-dense chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. Breast Cancer Res Treat. 2015;151(2):251-9.
33. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Increasing the dose intensity of chemotherapy by more frequent administration or sequential scheduling: a patient-level

meta-analysis of 37 298 women with early breast cancer in 26 randomised trials. Lancet. 2019;393(10179):1440-52.
34. Fitzpatrick A, Tutt A. Controversial issues in the neoadjuvant treatment of triple-negative breast cancer. Ther Adv Med Oncol. 2019;11:1758835919882581.
35. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, Im YH, Lee ES, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. N Engl J Med. 2017;376(22):2147-59.
36. Arnould L, Coudert B, Coutant C, Cutuli B, Gairard B, Salze P, et al. Oncologik référentiel Sein (principes de prise en charge) 2016 [Available from: http://oncologik.fr/referentiels/interregion/sein-principes-de-prise-en-charge#section-4431.
37. Giuliano AE, Ballman KV, McCall L, Beitsch PD, Brennan MB, Kelemen PR, et al. Effect of Axillary Dissection vs No Axillary Dissection on 10-Year Overall Survival Among Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis: The ACOSOG Z0011 (Alliance) Randomized Clinical Trial. JAMA. 2017;318(10):918-26.
38. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. Lancet. 2011;378(9804):1707-16.
39. Bartelink H, Maingon P, Poortmans P, Weltens C, Fourquet A, Jager J, et al. Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 2015;16(1):47-56.
40. Group ST, Bentzen SM, Agrawal RK, Aird EG, Barrett JM, Barrett-Lee PJ, et al. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) Trial A of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: a randomised trial. Lancet Oncol. 2008;9(4):331-41.
41. Group ST, Bentzen SM, Agrawal RK, Aird EG, Barrett JM, Barrett-Lee PJ, et al. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) Trial B of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: a randomised trial. Lancet. 2008;371(9618):1098-107.
42. Ebctcg, McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, et al. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. Lancet. 2014;383(9935):2127-35.
43. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol. 2011;22(8):1736-47.
44. Offersen BV, Boersma LJ, Kirkove C, Hol S, Aznar MC, Biete Sola A, et al. ESTRO consensus guideline on target volume delineation for elective radiation therapy of early stage breast cancer. Radiother Oncol. 2015;114(1):3-10.
45. Cottu P, Delaloge S. Cancers et Pathologies du Sein : attitudes diagnostiques et thérapeutiques, protocoles de traitement. Remagus 2019-20212019.
46. Gobbini E, Ezzalfani M, Dieras V, Bachelot T, Brain E, Debled M, et al. Time trends of overall survival among metastatic breast cancer patients in the real-life ESME cohort. Eur J Cancer. 2018;96:17-24.
47. Grinda T, Antoine A, Jacot W, Blaye C, Cottu PH, Dieras V, et al. Evolution of overall survival and receipt of new therapies by subtype among 20 446 metastatic breast cancer patients in the 2008-2017 ESME cohort. ESMO Open. 2021;6(3):100114.

48. Cottu P, Delaloge S. Cancers et pathologies du sein, attitudes diagnostiques et traitements, protocoles de traitements 2019-20202019.
49. Tutt A, Tovey H, Cheang MCU, Kernaghan S, Kilburn L, Gazinska P, et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. Nat Med. 2018;24(5):628-37.
50. O'Shaughnessy J, Romieu G, Diéras V, Byrtek M, Duenne A-A, Miles D. Meta-Analysis of Patients with Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) from Three Randomized Trials of First-Line Bevacizumab (BV) and Chemotherapy Treatment for Metastatic Breast Cancer (MBC). Cancer Res. 2010;70(24):P6–P12.
51. Lang I, Brodowicz T, Ryvo L, Kahan Z, Greil R, Beslija S, et al. Bevacizumab plus paclitaxel versus bevacizumab plus capecitabine as first-line treatment for HER2-negative metastatic breast cancer: interim efficacy results of the randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 TURANDOT trial. Lancet Oncol. 2013;14(2):125-33.
52. Cardoso F, Senkus E, Costa A, Papadopoulos E, Aapro M, Andre F, et al. 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)dagger. Ann Oncol. 2018;29(8):1634-57.
53. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Goncalves A, Lee KH, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. N Engl J Med. 2018;379(8):753-63.
54. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. N Engl J Med. 2017;377(6):523-33.
55. Bonnefoi H, Grellety T, Tredan O, Saghatchian M, Dalenc F, Mailliez A, et al. A phase II trial of abiraterone acetate plus prednisone in patients with triple-negative androgen receptor positive locally advanced or metastatic breast cancer (UCBG 12-1). Ann Oncol. 2016;27(5):812-8.
56. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med. 2018;379(22):2108-21.
57. Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2020;21(1):44-59.
58. Miles DW, Gligorov J, Andre F, Cameron D, Schneeweiss A, Barrios CH, et al. Primary results from IMpassion 131, a double-blind placebo-controlled randomised phase III trial of first-line paclitaxel (PAC)+/- atezolizumab (atezo) for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC). Ann Oncol. 2020;31:S1147.
59. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. Lancet. 2020;396(10265):1817-28.
60. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kummel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med. 2020;382(9):810-21.
61. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.
62. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.

63. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. J Clin Oncol. 1999;17(7):2105-16.
64. Klapper JA, Downey SG, Smith FO, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, et al. High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma : a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006. Cancer. 2008;113(2):293-301.
65. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010;363(8):711-23.
66. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med. 2012;366(26):2443-54.
67. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol. 2004;22:329-60.
68. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity. 2013;39(1):1-10.
69. Ghiringhelli F. Surveillance immune antitumorale et échappement. Correspondances en Onco-Théranostic. 2013;II.
70. Liu Y, Cao X. Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis. J Mol Med (Berl). 2016;94(5):509-22.
71. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. J Clin Oncol. 2014;32(27):2959-66.
72. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. 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. 2013;31(7):860-7.
73. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. Lancet Oncol. 2018;19(1):40-50.
74. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. JAMA Oncol. 2016;2(10):1354-60.
75. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. Nature. 2013;500(7463):415-21.
76. Ibrahim EM, Al-Foheidi ME, Al-Mansour MM, Kazkaz GA. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. Breast Cancer Res Treat. 2014;148(3):467-76.
77. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. Ann Oncol. 2014;25(3):611-8.
78. Loi S, Dushyanthen S, Beavis PA, Salgado R, Denkert C, Savas P, et al. RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative

Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. Clin Cancer Res. 2016;22(6):1499-509.
79. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol. 2010;28(1):105-13.
80. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, et al. 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. 2015;33(9):983-91.
81. Ruan M, Tian T, Rao J, Xu X, Yu B, Yang W, et al. Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes to pathological complete response in neoadjuvant treated triple-negative breast cancers. Diagn Pathol. 2018;13(1):66.
82. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Ann Oncol. 2015;26(2):259-71.
83. Stovgaard ES, Nielsen D, Hogdall E, Balslev E. Triple negative breast cancer - prognostic role of immune-related factors: a systematic review. Acta Oncol. 2018;57(1):74-82.
84. Yeong J, Lim JCT, Lee B, Li H, Ong CCH, Thike AA, et al. Prognostic value of CD8 + PD-1+ immune infiltrates and PDCD1 gene expression in triple negative breast cancer. J Immunother Cancer. 2019;7(1):34.
85. Gruosso T, Gigoux M, Manem VSK, Bertos N, Zuo D, Perlitch I, et al. Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. J Clin Invest. 2019;129(4):1785-800.
86. Iglesia MD, Vincent BG, Parker JS, Hoadley KA, Carey LA, Perou CM, et al. Prognostic B-cell signatures using mRNA-seq in patients with subtype-specific breast and ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2014;20(14):3818-29.
87. Garaud S, Buisseret L, Solinas C, Gu-Trantien C, de Wind A, Van den Eynden G, et al. Tumor infiltrating B-cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. JCI Insight. 2019;5.
88. Yuan ZY, Luo RZ, Peng RJ, Wang SS, Xue C. High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. Onco Targets Ther. 2014;7:1475-80.
89. Pelekanou V, Villarroel-Espindola F, Schalper KA, Pusztai L, Rimm DL. CD68, CD163, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) co-localization in breast tumor microenvironment predicts survival differently in ER-positive and -negative cancers. Breast Cancer Res. 2018;20(1):154.
90. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol. 2002;23(11):549-55.
91. Hammerl D, Smid M, Timmermans AM, Sleijfer S, Martens JWM, Debets R. Breast cancer genomics and immuno-oncological markers to guide immune therapies. Semin Cancer Biol. 2018;52(Pt 2):178-88.
92. Wei B, Yao M, Xing C, Wang W, Yao J, Hong Y, et al. The neutrophil lymphocyte ratio is associated with breast cancer prognosis: an updated systematic review and meta-analysis. Onco Targets Ther. 2016;9:5567-75.
93. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including

recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. Semin Cancer Biol. 2017.
94. Keren L, Bosse M, Marquez D, Angoshtari R, Jain S, Varma S, et al. A Structured Tumor-Immune Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer Revealed by Multiplexed Ion Beam Imaging. Cell. 2018;174(6):1373-87 e19.
95. Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. Biomarkers of residual disease after neoadjuvant therapy for breast cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2016;13(8):487-503.
96. Bossuyt V, Provenzano E, Symmans WF, Boughey JC, Coles C, Curigliano G, et al. Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration. Ann Oncol. 2015;26(7):1280-91.
97. Provenzano E, Bossuyt V, Viale G, Cameron D, Badve S, Denkert C, et al. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. Mod Pathol. 2015;28(9):1185-201.
98. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurteloup P. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. Am J Clin Oncol. 1993;16(3):223-8.
99. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. J Am Coll Surg. 1995;180(3):297-306.
100. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol. 2007;25(28):4414-22.
101. Symmans WF, Wei C, Gould R, Yu X, Zhang Y, Liu M, et al. Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. J Clin Oncol. 2017;35(10):1049-60.
102. Administration UFaD. 2020 [Available from: https://www.fda.gov/drugs/development-resources/table-surrogate-endpoints-were-basis-drug-approval-or-licensure.
103. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. J Clin Oncol. 2012;30(15):1796-804.
104. Choi M, Park YH, Ahn JS, Im YH, Nam SJ, Cho SY, et al. Evaluation of Pathologic Complete Response in Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy: Experience in a Single Institution over a 10-Year Period. J Pathol Transl Med. 2017;51(1):69-78.
105. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. Lancet. 2014;384(9938):164-72.
106. Bonnefoi H, Litiere S, Piccart M, MacGrogan G, Fumoleau P, Brain E, et al. Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy is an independent predictive factor irrespective of simplified breast cancer intrinsic subtypes: a landmark and two-step approach analyses from the EORTC 10994/BIG 1-00 phase III trial. Ann Oncol. 2014;25(6):1128-36.

107. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. J Clin Oncol. 2008;26(8):1275-81.
108. Sheri A, Smith IE, Johnston SR, A'Hern R, Nerurkar A, Jones RL, et al. Residual proliferative cancer burden to predict long-term outcome following neoadjuvant chemotherapy. Ann Oncol. 2015;26(1):75-80.
109. von Minckwitz G, Schmitt WD, Loibl S, Muller BM, Blohmer JU, Sinn BV, et al. Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. Clin Cancer Res. 2013;19(16):4521-31.
110. Pinard C, Debled M, Ben Rejeb H, Velasco V, Tunon de Lara C, Hoppe S, et al. Residual cancer burden index and tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in triple-negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. Breast Cancer Res Treat. 2020;179(1):11-23.
111. Liu YL, Saraf A, Lee SM, Zhong X, Hibshoosh H, Kalinsky K, et al. Lymphovascular invasion is an independent predictor of survival in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. Breast Cancer Res Treat. 2016;157(3):555-64.
112. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Hirakawa H, Takahashi Y, Nakagawa S, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. Breast Cancer Res. 2015;17:124.
113. Luen SJ, Salgado R, Dieci MV, Vingiani A, Curigliano G, Gould RE, et al. Prognostic implications of residual disease tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden in triple-negative breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. Ann Oncol. 2019;30(2):236-42.
114. Wein L, Loi S. Mechanisms of resistance of chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer (TNBC). Breast. 2017;34 Suppl 1:S27-S30.
115. Balko JM, Giltnane JM, Wang K, Schwarz LJ, Young CD, Cook RS, et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. Cancer Discov. 2014;4(2):232-45.
116. Hancock BA, Chen YH, Solzak JP, Ahmad MN, Wedge DC, Brinza D, et al. Profiling molecular regulators of recurrence in chemorefractory triple-negative breast cancers. Breast Cancer Res. 2019;21(1):87.
117. Pinto JA, Araujo J, Cardenas NK, Morante Z, Doimi F, Vidaurre T, et al. A prognostic signature based on three-genes expression in triple-negative breast tumours with residual disease. NPJ Genom Med. 2016;1:15015.
118. Wishart GC, Rakha E, Green A, Ellis I, Ali HR, Provenzano E, et al. Inclusion of KI67 significantly improves performance of the PREDICT prognostication and prediction model for early breast cancer. BMC Cancer. 2014;14:908.
119. (HAS) HAdS. Utilité clinique des signatures génomiques dans le cancer du sein de stade précoce. Janvier 2019.
120. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. N Engl J Med. 2015;373(21):2005-14.
121. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. N Engl J Med. 2018;379(2):111-21.
122. Kalinsky K, Barlow WE, Meric-Bernstam F, Gralow JR, Albain KS, Hayes D, et al. First results from a phase III randomized clinical trial of standard adjuvant endocrine therapy (ET)

+/- chemotherapy (CT) in patients (pts) with 1-3 positive nodes, hormone receptor-positive (HR+) and HER2-negative (HER2-) breast cancer (BC) with recurrence score (RS) < 25: SWOG S1007 (RxPonder). San Antonio Breast Cancer Symposium2020.
123. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. N Engl J Med. 2016;375(8):717-29.
124. Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. Ann Oncol. 2014;25(2):339-45.
125. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsky P, Fitzal F, Singer CF, et al. A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. Clin Cancer Res. 2011;17(18):6012-20.
126. Varga Z, Sinn P, Seidman AD. Summary of head-to-head comparisons of patient risk classifications by the 21-gene Recurrence Score(R) (RS) assay and other genomic assays for early breast cancer. Int J Cancer. 2019;145(4):882-93.
127. Kwon MJ. Emerging immune gene signatures as prognostic or predictive biomarkers in breast cancer. Arch Pharm Res. 2019;42(11):947-61.
128. Zhu L, Narloch JL, Onkar S, Joy M, Broadwater G, Luedke C, et al. Metastatic breast cancers have reduced immune cell recruitment but harbor increased macrophages relative to their matched primary tumors. J Immunother Cancer. 2019;7(1):265.
129. Chen B, Khodadoust MS, Liu CL, Newman AM, Alizadeh AA. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT. Methods Mol Biol. 2018;1711:243-59.
130. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. Genome Biol. 2016;17(1):218.
131. Liu CC, Steen CB, Newman AM. Computational approaches for characterizing the tumor immune microenvironment. Immunology. 2019;158(2):70-84.
132. Hendrickx W, Simeone I, Anjum S, Mokrab Y, Bertucci F, Finetti P, et al. Identification of genetic determinants of breast cancer immune phenotypes by integrative genome-scale analysis. Oncoimmunology. 2017;6(2):e1253654.
133. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. Clin Cancer Res. 2008;14(16):5158-65.
134. Rody A, Karn T, Liedtke C, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Hanker L, et al. A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer. Breast Cancer Res. 2011;13(5):R97.
135. Bonsang-Kitzis H, Sadacca B, Hamy-Petit AS, Moarii M, Pinheiro A, Laurent C, et al. Biological network-driven gene selection identifies a stromal immune module as a key determinant of triple-negative breast carcinoma prognosis. Oncoimmunology. 2016;5(1):e1061176.
136. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN-gamma-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. J Clin Invest. 2017;127(8):2930-40.
137. Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, Ellis IO, Caldas C. An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. Genome Biol. 2007;8(8):R157.

138. Rody A, Holtrich U, Pusztai L, Liedtke C, Gaetje R, Ruckhaeberle E, et al. T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast cancers. Breast Cancer Res. 2009;11(2):R15.
139. West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. Breast Cancer Res. 2011;13(6):R126.
140. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. J Clin Invest. 2013;123(7):2873-92.
141. Jezequel P, Loussouarn D, Guerin-Charbonnel C, Campion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. Breast Cancer Res. 2015;17:43.
142. Lee HJ, Lee JJ, Song IH, Park IA, Kang J, Yu JH, et al. Prognostic and predictive value of NanoString-based immune-related gene signatures in a neoadjuvant setting of triple-negative breast cancer: relationship to tumor-infiltrating lymphocytes. Breast Cancer Res Treat. 2015;151(3):619-27.
143. Callari M, Cappelletti V, D'Aiuto F, Musella V, Lembo A, Petel F, et al. Subtype-Specific Metagene-Based Prediction of Outcome after Neoadjuvant and Adjuvant Treatment in Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2016;22(2):337-45.
144. Criscitiello C, Bayar MA, Curigliano G, Symmans FW, Desmedt C, Bonnefoi H, et al. A gene signature to predict high tumor-infiltrating lymphocytes after neoadjuvant chemotherapy and outcome in patients with triple-negative breast cancer. Ann Oncol. 2018;29(1):162-9.
145. Savas P, Virassamy B, Ye C, Salim A, Mintoff CP, Caramia F, et al. Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. Nat Med. 2018;24(7):986-93.
146. Perez-Pena J, Tibor Fekete J, Paez R, Baliu-Pique M, Garcia-Saenz JA, Garcia-Barberan V, et al. A Transcriptomic Immunologic Signature Predicts Favorable Outcome in Neoadjuvant Chemotherapy Treated Triple Negative Breast Tumors. Front Immunol. 2019;10:2802.
147. Stewart RL, Updike KL, Factor RE, Henry NL, Boucher KM, Bernard PS, et al. A Multigene Assay Determines Risk of Recurrence in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. Cancer Res. 2019;79(13):3466-78.
148. Zhang J, Wang L, Xu X, Li X, Guan W, Meng T, et al. Transcriptome-Based Network Analysis Unveils Eight Immune-Related Genes as Molecular Signatures in the Immunomodulatory Subtype of Triple-Negative Breast Cancer. Front Oncol. 2020;10:1787.
149. Kim JY, Jung HH, Sohn I, Woo SY, Cho H, Cho EY, et al. Prognostication of a 13-immune-related-gene signature in patients with early triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2020;184(2):325-34.
150. Noblejas-Lopez MDM, Baliu-Pique M, Nieto-Jimenez C, Cimas FJ, Morafraile EC, Pandiella A, et al. Transcriptomic Profiles of CD47 in Breast Tumors Predict Outcome and Are Associated with Immune Activation. Int J Mol Sci. 2021;22(8).
151. Sinn BV, Loibl S, Hanusch CA, Zahm DM, Sinn HP, Untch M, et al. Immune-related Gene Expression Predicts Response to Neoadjuvant Chemotherapy but not Additional Benefit from PD-L1 Inhibition in Women with Early Triple-negative Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2021;27(9):2584-91.

Serment d'Hippocrate

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

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

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

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

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

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

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

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

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

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

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

Objectif : Les patientes avec un cancer du sein triple-négatif (CSTN) ayant un résidu tumoral après chimiothérapie néo-adjuvante ont jusqu'à 75% de risque de rechute métastatique dans les années qui suivent la prise en charge initiale. L'infiltrat immunitaire des CSTN ayant été montré comme pronostique et prédictif de la réponse aux traitements, nous avons voulu développer une signature transcriptomique immunologique pour mieux prédire le risque de rechute chez ces patientes. **Méthode :** Nous avons identifié 115 cas de CSTN avec maladie résiduelle post traitement, sur lesquels nous avons testé le panel de 770 gènes liés au microenvironnement tumoral (PanCancer IO360, Nanostring). Nous avons développé une signature transcriptomique et analysé l'infiltrat immunitaire présent dans les tumeurs résiduelles. **Résultats :** 38 patientes (33%) ont présenté une rechute métastatique. La séparation des patientes via un clustering hiérarchisé identifiait cinq groupes avec des pronostics différents, selon des voies de signalisation liées à l'activation immunitaire, la transition épithélio-mésenchymateuse et le cycle cellulaire. Le microenvironnement immunitaire était significativement différent entre les patientes qui présentaient secondairement une rechute et celles qui ne rechutaient pas, les dernières ayant plus de cellules effectrices anti-tumorales lymphocytaires. Nous avons développé une signature de huit gènes liés à l'immunité (*BLK, GZMM, CXCR6, LILRA1, SPIB, CCL4, CXCR4, SLAMF7)* qui prédit le risque de rechute dans notre cohorte et en particulier dans le sous-groupe de patientes RCBII. Cette signature était également pronostique dans deux cohortes indépendantes (KMplot et METABRIC). **Conclusion :** L'absence d'activation immunitaire après chimiothérapie néo-adjuvante est lié à un haut risque de rechute métastatique. Nous proposons une signature transcriptomique pronostique liée à l'immunité qui pourrait permettre une meilleur identification et prise en charge des patientes.

Title: Prognostic value of the immune infiltrate in triple-negative breast cancer patients with residual disease after neoadjuvant chemotherapy

Purpose: Triple-negative breast cancer (TNBC) patients have up to 75% risk of metastatic relapse within the following years when they have residual disease (RD) after neo-adjuvant chemotherapy (NACT). The immune infiltrate in TNBC being prognostic and predictive of response to treatment, we sought to develop an immunologic transcriptomic signature to better predict relapse in these patients. **Experimental design:** We identified 115 samples of residual tumors from post-NACT TNBC patients. We profiled the expression of 770 genes related to cancer microenvironment using the Nanostring PanCancer IO360 panel to develop a prognostic transcriptomic signature, and describe the immune microenvironment of the residual tumor. **Results:** Thirty-eight (33%) of patients experienced metastatic relapse. Hierarchical clustering separated patients into 5 clusters with distinct prognosis, based on pathways linked to immune activation, epithelial to mesenchymal transition and cell cycle. The immune microenvironment of the residual disease was significantly different between patients who experienced relapse compared to those who did not, the latter having significantly more effector anti-tumoral immune cells, with significant differences in lymphoid subpopulations. We selected eight genes linked to immunity (*BLK, GZMM, CXCR6, LILRA1, SPIB, CCL4, CXCR4, SLAMF7) to* develop a transcriptomic signature which could predict relapse in our cohort and in the RCB2 subgroup. This signature was validated in two external cohorts (KMplot and METABRIC). **Conclusions:** Lack of immune activation after NACT appears to be a strong prognostic factor for metastatic relapse. We propose a prognostic signature based on immune infiltrate that could lead to targeted therapeutic strategies to improve patients' prognosis.

Discipline : oncologie médicale
Mots clés : cancer du sein, microenvironnement immunitaire, cancers du sein triple-négatifs, signature transcriptomique.