UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2020 2020 TOU3 1681

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Victor SARRADIN

le 28 octobre 2020

Etude des modifications du micro-environnement immun induites par la chimiothérapie néo-adjuvante dans les cancers du sein triple négatifs

« Etude MIMOSA »

Directrice de thèse : Pr Florence DALENC

JURY

Monsieur le Professeur Jean-Pierre DELORD	Président
Madame le Professeur Florence DALENC	Assesseur
Madame le Professeur Maha AYYOUB	Assesseur
Madame le Professeur Camille LAURENT	Assesseur
Monsieur le Docteur Camille FRANCHET	Suppléant
Monsieur le Docteur Thibaud VALENTIN	Membre invité

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER
Université de Toulouse
FACULTÉ DE MÉDECINE PURPAN

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

TABLEAU du PERSONNEL HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

des Facultés de Médecine de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

au 1er septembre 2019

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre
Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel
Doyen Honoraire	M. VINEL Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. ADER Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. ALBAREDE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques
Professeur Honoraire	M. ARLET Philippe
Professeur Honoraire	M. ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis
Professeur Honoraire	M. BOCCALON Henri
Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BONEU Bernard
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. BOUTAULT Franck
Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	M. CARATERO Claude
Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard
Professeur Honoraire	M. CHABANON Gérard
Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CLANET Michel
Professeur Honoraire	M. CONTE Jean
Professeur Honoraire	M. COSTAGLIOLA Michel
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean
Professeur Honoraire	M. DABERNAT Henri
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine
Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric
Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	Mme DELISLE Marie-Bernadette
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.
Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri
Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean
Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. FOURNIE Bernard
Professeur Honoraire	M. FOURTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	M. GHISOLFI Jacques
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. GUIRAUD CHAUMEIL Bernard
Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. JOFFRE Francis
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves
Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche
Professeur Honoraire	M. LARENG Louis
Professeur Honoraire	M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Yves
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul
Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. MANELFE Claude
Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. MASSIP Patrice
Professeur Honoraire	Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire	M. MAZIERES Bernard
Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. MURAT
Professeur Honoraire	M. OLIVES Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. PASCAL Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire	M. PONTONNIER Georges
Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline
Professeur Honoraire	M. PUEL Pierre
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel
Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. RAILHAC Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude
Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. ROCHE Henri
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre
Professeur Honoraire	M. ROLLAND Michel
Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel
Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. SARRAMON Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. SIMON Jacques
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. TKACZUK Jean
Professeur Honoraire	M. TREMOULET Michel
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre
Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Professeur Honoraire	M. VOIGT Jean-Jacques

Professeurs Émérites

Professeur ADER Jean-Louis
Professeur ALBAREDE Jean-Louis
Professeur ARBUS Louis
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur BOCCALON Henri
Professeur BONEU Bernard
Professeur CARATERO Claude
Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CHAP Hugues
Professeur CONTE Jean
Professeur COSTAGLIOLA Michel
Professeur DABERNAT Henri
Professeur FRAYSSE Bernard
Professeur DELISLE Marie-Bernadette
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard
Professeur JOFFRE Francis
Professeur LAGARRIGUE Jacques
Professeur LARENG Louis
Professeur LAURENT Guy
Professeur LAZORTHES Yves
Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur MANELFE Claude
Professeur MASSIP Patrice
Professeur MAZIERES Bernard
Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur RISCHMANN Pascal
Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur SALVAYRE Robert
Professeur SARRAMON Jean-Pierre
Professeur SIMON Jacques

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31000 TOULOUSE — **Doyen : Didier CARRIE**

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie
M. AMAR Jacques (C.E)	Thérapeutique
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie
M. AVET-LOISEAU Hervé (C.E.)	Hématologie, transfusion
Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)
M. BONNEVIALLE Paul (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.
M. BOSSAVY Jean-Pierre (C.E)	Chirurgie Vasculaire
M. BRASSAT David	Neurologie
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique
M. BUREAU Christophe	Hépato-Gastro-Entéro
M. CALVAS Patrick (C.E)	Génétique
M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie
M. CHAIX Yves	Pédiatrie
Mme CHARPENTIER Sandrine	Médecine d'urgence
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. DEGUINE Olivier (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie
M. FERRIERES Jean (C.E)	Epidémiologie, Santé Publique
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie
M. FOURNIÉ Pierre	Ophtalmologie
M. GAME Xavier	Urologie
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie
Mme LAMANT Laurence (C.E)	Anatomie Pathologique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale
M. LANGIN Dominique (C.E)	Nutrition
M. LAUWERS Frédéric	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine d'urgence
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie
M. MALAVAUD Bernard	Urologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique
M. MARCHOU Bruno (C.E)	Maladies Infectieuses
M. MAZIERES Julien	Pneumologie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie
M. OSWALD Eric (C.E)	Bactériologie-Virologie
M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
M. PARINAUD Jean (C.E)	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.
M. PAUL Carle	Dermatologie
M. PAYOUX Pierre	Biophysique
M. PAYRASTRE Bernard (C.E)	Hématologie
M. PERON Jean-Marie	Hépato-Gastro-Entérologie
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie
M. RASCOL Olivier (C.E)	Pharmacologie
M. RECHER Christian (C.E)	Hématologie
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie
M. SALES DE GAUZY Jérôme (C.E)	Chirurgie Infantile
M. SALLES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie
M. SANS Nicolas	Radiologie
Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire
M. TELMON Norbert (C.E)	Médecine Légale
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépato-Gastro-Entérologie

P.U. - P.H.

2ème classe

Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
M. BONNEVIALLE Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. LOPEZ Raphael	Anatomie
M. MARTIN-BLONDEL Guillaume	Maladies infectieuses, maladies tropicales
M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. PAGES Jean-Christophe	Biologie Cellulaire et Cytologie
M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
Mme RUYSSEN-WITRAND Adeline	Rhumatologie
Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

P.U. Médecine générale

M. MESTHÉ Pierre

M. OUSTRIC Stéphane (C.E)

Professeur Associé Médecine générale

M. ABITTEBOUL Yves

M. POUTRAIN Jean-Christophe

Professeur Associé en Neurologie

Mme PAVY-LE TRAON Anne

Professeur Associé en Bactériologie - Virologie ; Hygiène Hospitalière

Mme MALAVAUD Sandra

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex **Doyen : Elie SERRANO**

P.U. - P.H.
Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ALRIC Laurent (C.E)	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépato-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice (C.E)	Thérapeutique
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel (C.E)	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prév.
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis (C.E)	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. KAMAR Nassim (C.E)	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick (C.E)	Nutrition
M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel (C.E)	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

P.U. - P.H.
2ème classe

M. AUSSEIL Jérôme	Biochimie et biologie moléculaire
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
Mme DALENC Florence	Cancérologie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
Mme FARUCH-BILFELD Marie	Radiologie et Imagerie Médicale
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GARRIDO-STOWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
M. GATIMEL Nicolas	Médecine de la reproduction
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LE CAIGNEC Cédric	Génétique
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. REINA Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophtalmologie
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

P.U. Médecine générale

Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve

Professeur Associé de Médecine Générale

M. BOYER Pierre

M. STILLMUNKES André

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN
37, allées Jules Guesde – 31000 Toulouse

M.C.U. - P.H.

M. ABBO Olivier	Chirurgie infantile
M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
Mme AUSSEIL-TRUDEL Stéphanie	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme BELLIERE-FABRE Julie	Néphrologie
Mme BERTOLI Sarah	Hématologie, transfusion
M. BIETH Eric	Génétique
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAGNE Myriam	Ophtalmologie
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAIGNAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mme CHANTALAT Elodie	Anatomie
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDI Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
M. LHOMME Sébastien	Bactériologie-virologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
Mme PERROT Aurore	Hématologie ; Transfusion
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie
M. VIDAL Fabien	Gynécologie obstétrique

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry
Mme DUPOUY Julie

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE- RANGUEIL
133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE cedex

M.C.U. - P.H

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
Mme CAMARE Caroline	Biochimie et biologie moléculaire
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
Mme CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DEGBOE Yannick	Rhumatologie
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme FLOCH Pauline	Bactériologie-Virologie; Hygiène Hospit.
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GALLINI Adeline	Epidémiologie
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
M. GATIMEL Nicolas	Médecine de la reproduction
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
M. GUIBERT Nicolas	Pneumologie ; Addictologie
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. GUILLEMINAULT Laurent	Pneumologie
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS SCHWALM Françoise	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. MOULIS Guillaume	Médecine interne
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme QUELVEN Isabelle	Biophysique et Médecine Nucléaire
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
M. YRONDI Antoine	Psychiatrie d'Adultes ; Addictologie

M.C.U. Médecine générale

M. BISMUTH Michel
Mme ESCOURROU Brigitte

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr CHICOULAA Bruno
Dr FREYENS Anne
Dr PUECH Marielle

Dr BIREBENT Jordan
Dr BOURGEOIS Odile
Dr LATROUS Leila
Dr. BOUSSIER Nathalie

15/10/ 2019

Remerciements :

Tout d'abord je souhaite remercier les membres du jury :

A mon président du jury

Professeur Jean-Pierre DELORD

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Oncologue médical

Directeur général de l'Institut Claudius Regaud

Administrateur du GCS IUCT-Oncopole

Merci pour votre accompagnement tout au long de mon internat, merci pour vos conseils et merci de la confiance que vous m'accordez pour la suite. Votre parcours et votre engagement pour l'oncologie médicale sont un exemple pour moi.

A ma directrice de thèse

Professeur Florence DALENC

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Oncologue médical

Florence,

Merci de ton engagement pour les patientes et pour l'oncologie médicale. Merci infiniment d'avoir si bien encadré mon travail de thèse, d'avoir été si impliquée et si disponible. C'est toujours un très grand plaisir que de travailler avec toi. J'espère que nous pourrons poursuivre ces travaux qui ont été si riches d'enseignements.

Aux autres membres du jury :

Professeur Maha AYYOUB,

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Vice-Présidente de l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

Directrice de recherche au Centre de Recherche de Cancérologie de Toulouse (CRCT)

Pharmacienne et Immunologiste

Maha,

Merci de m'avoir accueilli dans l'équipe, et de me permettre d'y rester. J'apprends énormément grâce à toi, merci de ton enseignement, de ton encadrement, et surtout de ta bienveillance. C'est un honneur et un réel plaisir que de faire partie de ton équipe.

Professeur Camille LAURENT

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Anatomopathologiste

Merci d'avoir accepté de me faire l'honneur de faire partie de mon jury. Votre expertise en anatomopathologie et en immunologie qui apportera sur mes travaux un éclairage avisé.

Docteur Camille FRANCHET

Praticien Hospitalier

Anatomopathologiste

Camille,

Merci beaucoup d'avoir travaillé avec moi sur ma thèse. D'avoir accepté de lire les lames avec moi le soir, le dimanche et même les jours fériés. Même une chute de vélo sous la pluie ne t'a pas arrêté ! Merci pour ta disponibilité, pour ta sympathie, ta bonne humeur et pour ton expertise. J'espère qu'on pourra continuer ce travail engagé ensemble… mas sans le CD4 ;)

Docteur Thibaud VALENTIN

Praticien Hospitalier

Oncologue médical

Thibaud,

Je crois que je ne pouvais pas tomber mieux pour mon premier semestre. Merci de m'avoir si bien accueilli en oncologie médicale, merci de m'avoir fait autant aimer la spécialité, dès le 1er semestre. Par la suite, merci pour ta bienveillance, merci pour ta sympathie, merci pour ta confiance. Tu es un super oncologue médical.

Une mention spéciale à **Amélie LUSQUE** (biostatisticienne), qui a beaucoup travaillé avec moi sur cette thèse. Merci à toi pour la rapidité et la qualité de ton travail, et merci de ta sympathie. Au plaisir de retravailler avec toi. Merci également à **Léonor CHALTIEL** (biostatisticienne), merci pour ton aide dans les débuts du projet.

Je souhaite ensuite remercier les médecins qui m'ont formé pendant mon internat :

Aux Oncologues médicaux de l'IUCT-Oncopole :

Dr Laurence GLADIEFF, Dr Marion DESLANDRES, Dr Loïc MOUREY, Dr Nathalie CAUNES-HILARY, Dr Carlos GOMEZ-ROCA, Dr Jean Louis LACAZE, Dr Damien POUESSEL, Dr Marion MONTASTRUC, Dr Mony UNG, Dr Clémence BRAC DE LA PERRIERE, Dr Ewa COTTURA, Dr Sarah BETRIAN, Dr Eleonora DE MAIO et le Pr Henri ROCHE.

Une mention particulière au Dr Christine CHEVREAU, merci pour votre enseignement, pour votre rigueur, pour votre humour. Et merci de me rappeler que « la clinique » et le Patient doivent rester la priorité dans notre pratique d'oncologie médicale.

Aux médecins du CHU :

Pr Rosine GUIMBAUD, Pr Julien MAZIERES et le Dr Audrey RABEAU

Aux autres médecins de l'IUCT-Oncopole :

Dr Antoine BODEN, Dr Marie BOURGOUIN, Dr Valérie MAURIES, Dr Jacques POUYMAYOU, Dr Virgile PINELLI, Dr Audrey ECHE-GASS, Dr Delphine LARRIEU-CIRON, Pr Nicolas MEYER, Dr Cécile PAGES, Dr Vincent SIBAUD et le Dr Iphigénie KORAKIS.

A l'équipe médicale de l'HDJ 2B :

Bertille, la chocolatovore, merci beaucoup pour ta bonne humeur, quel plaisir de travailler avec toi ! Je n'oublierai pas de passer régulièrement dans le service pour le goûter !!

Vincent et Béatrice, je suis content de vous connaitre, bienvenue à l'Oncopole !

Aux médecins du centre hospitalier de Rodez :

Au Dr Laurent MOSSER : Laurent, merci beaucoup pour ton enseignement, pour ton engagement dans la formation des internes et pour ta sympathie (et pour le badminton bien sûr).

Aux Dr Guillermo REYES-ORTEGA, Dr Véronique FABRE, Dr Leila GHENIM et le Dr Natacha BRUN.

Aux médecins de l'hôpital Joseph Ducuing :

Vous êtes une équipe au top !

Au Dr Francis GACHES : Francis, tes compétences n'ont d'égales que ton humanisme.

Au Dr Martin MICHAUD : co-découvreur du syndrome Michaud-Sarradin, et avec un excellent goût pour les cadeaux de fin de stage.

Au Dr Florian CATROS : merci de ta sympathie et pour ton enseignement.

Au Dr Corinne COUTEAU : Corinne, je suis très content d'avoir pu travailler avec toi, merci pour ton enseignement, pour ton humour et pour ta sympathie.

Et au Dr Anne CELLA, merci de ta bonne humeur et de ton humour !

Aux radiothérapeutes :

Aux Pr Anne LAPRIE et au Pr Elisabeth MOYAL, merci pour votre enseignement de votre discipline pendant mon semestre en radiothérapie et plus largement tout au long de mon internat. Merci de votre engagement pour la formation des internes.

Merci à tous les médecins de radiothérapie, et en particulier à ceux qui ont été mes séniors pendant mon stage dans le service :

Au Dr Michel RIVES, merci pour votre bonne humeur et pour votre enseignement.

Au Dr Françoise IZAR, merci pour votre humour, votre énergie, votre bonne humeur, toutes vos histoires incroyables à nous raconter. Merci pour le travail que l'on a pu mener sur les ICT.

Et une mention particulière au Dr Jean-Marc BACHAUD, toujours extrêmement sympathique et toujours disponible pour la formation des internes et au Dr Anne DUCASSOU, merci de ta gentillesse.

Aux hématologues :

Merci à tous les médecins du service d'hématologie, et en particulier ceux avec qui je suis passé en stage : Dr Sarah BERTOLI, Dr Cécile BOREL, Dr Anne HUYNH, Dr Lucie OBERIC, Pr Loïc YSEBAERT et le Dr Pierre BORIES.

Et bien sûr les internes d'hémato : Noémie (avec qui on a aussi partagé FORCE1 et aussi les bancs du master 2), Léopoldine, Benoit, Martin, Caroline, Guillaume et Pierre-Luc.

Aux internistes :

Aux médecins du service de médecine interne de l'Oncopole, et en particulier ceux qui m'ont formé pendant mon stage dans le service : le Pr Odile BEYNE-RAUZY, le Dr Pierre COUGOUL, le Dr Karen DELAVIGNE et le Dr Sylvie OLLIER.

Et également :

Au Dr Anne Pascale LAURENTY, merci pour ton humour, ton énergie et ta bonne humeur, et au Dr Nadia AOULAD, merci de ta gentillesse, je suis content d'avoir pu travailler avec toi à Toulouse puis à Rodez.

A mon équipe au labo :

Maha, Françoise, Camille, Carlos GM, Virginie, Anna, Marie, Alejandra, Lucile, Diana, Christel, Jonathan, Carlos GR et Clara.

La meilleure équipe !! Une équipe internationale au top ! Il va falloir que je me mette à l'italien et à l'espagnol ! La team numéro 1 porte bien son nom :)

Merci pour votre accueil dans l'équipe, au CRCT et en dehors. Merci pour votre sympathie et pour tout ce que vous m'apprenez. Encore félicitations pour tous ces bébés qui sont nés cette année !!

Préparez-vous je reviens !

A mes co-internes :

A mes ainés : **Dr Sarah BETRIAN**, tu m'as beaucoup appris, merci de ta gentillesse et de ta disponibilité, **Dr Anne DUMONT**, toujours au courant de tous les potins ! j'espère qu'on pourra continuer de travailler ensemble, **Dr Elvire PONS**, bravo pour ton parcours impressionnant et qui ne fait que commencer, **Dr Romain DEJEAN**, le baroudeur, **Dr François COMPAGNON**, notre Papa à tous, **Dr Nouritza TOROSSIAN**, bonne continuation sur Paris !

A ceux qui ont fait un droit au remord : **Dr Charlotte SYRYKH**, **Dr Cécile LIFFRAUD**, **Dr Simon FREISS**, et **Léo PREISS**, je suis content d'avoir eu la chance de vous connaitre pendant votre passage en oncologie. Bonne continuation dans votre nouvelle spécialité !!

A ma promo : **Dr Marion JAFFRELOT**, notre triathlète ! Je suis content que tu ais finalement choisi l'oncologie médicale ! **Dr Vincent ESTEYRIE**, avec qui on a partagé de nombreux ASIO, **Dr Amélie ABOUDARAM**, j'espère que tu te plairas à Paris, et j'espère qu'on aura le plaisir de se revoir, **Dr Marion ROLLAND**, merci de m'avoir accompagné lors de toutes ces années de FAC.

Et à tous les autres :

Dr Céline DALMASSO, la patronne ! Avec qui on est allé dans des endroits sympas (Biarritz), et parfois plus étranges (Batofar), **Dr Laetitia COUARDE**, sportive, voyageuse et toujours partante pour faire la fête, **Samy RIGAL**, avec qui on a fait les 400 coups à travers la France !!, **Jacques DESROUSSEAUX**, que j'ai vu se marier, puis devenir papa une fois, puis une deuxième fois. Toujours aussi sympa et jamais contrarié ! Merci de m'avoir accompagné à Rodez, même si tu te traine un peu au jogging, **Dr Vincent NICOLAI**, le bourreau des cœurs, **Juliette POUEDRAS**, la footeuse, rappeuse et fan de maitre Gims, t'es au top !, **Ilfad BLAZEVIC**, tu nous fait bien rire ! On est parti un peu partout en France ensemble et aussi pour l'ESMO jusqu'à Munich et Barcelone, **Anaïs RATABOUL**, notre « Vaiana », qui malgré tous les défis ne s'est pas découragée à faire de l'oncologie médicale, **Emily ALOUANI**, merci pour ton engagement pour l'oncologie médicale, et pour tout ce que tu as organisé pour les internes pour faire de l'oncologie une « Fiesta Loca », **Auranne WINOCK**, toujours aussi sympa et drôle, **Benoit GUILLON**, le pâtissier-cuisto, **Gauthier GLEMAREC**, la veine du bibi !!, **Marion GENEAU**, toujours bronzée et partante pour faire la fête, **Ludovic HERNANDEZ**, n'oublie pas de boire de l'eau !, **Blandine DELAUNAY**, notre nouvelle onco med en herbe, **Corentin PASQUIER**, un pur produit nantais, **Charly JARROT**, l'étoile montante, **Marie DEGRANGE**, une future super onco med j'en suis sûr, **Caroline ZERBIB**, qui va prendre onco med oui oui on te veut dans la team, et **Maeva BONNEAU**, pour qui l'aventure ne fait que commencer (en onco med bien sûr).

A mes co-internes de Rodez : Avec qui j'ai passé un super semestre : Malo, Carlo, Asmaa, Marie, Elise, Ulysse, Tom, Louis, Célia, Dimitri, Audrey, Yohan, Manu, Betty, Alicia, Franck, Marion et Claude.

On retourne prendre une bière chez Gustave quand vous voulez !

A mes co-internes d'anapath, en particulier Justine, Guillaume et Anthony (alias « Antho Jack »), avec qui on a sillonné les nuits toulousaines.

A ma première co-interne : Mathilde, qui m'a permis de vivre un super premier semestre et m'a fait découvrir Toulouse. Bonne continuation, et j'espère pouvoir venir te voir à la Martinique !

Et à mes autres co-internes par la suite : Vladimir (Onco 3B), Clément (Onco 3B), Stella (Med Interne 3A), Eva (Joseph Ducuing), Vincent (Onco 3B), Tiphaine (Radiothérapie) et Laura (Radiothérapie).

Aux internes de gynéco, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : Caroline et Clélia. J'espère que vous reviendrez bosser avec nous sur l'Oncopole !

A ma toute première équipe soignante à l'Onco 3B : Maïlys, Laura, Camille, Marie, puis rejoint par Yoann et Marjorie.

Merci de m'avoir accueilli alors que je n'étais qu'un « bébé interne » en 1er semestre. Vous m'avez fait découvrir Toulouse ! J'espère qu'on pourra continuer à se suivre dans le futur (au travail et en dehors !).

Aux équipes des services (cadres, coordinatrices, programmatrices, infirmières, aide soignantes, manip radios, secrétaires, ASH, techniciens, dosimétristes, physiciens), en particulier les infirmières de l'Onco 3B : Charlotte, Cécilia, Alexia, Angélique ; mais aussi dans tous les autres services où j'ai pu travailler : Med Interne 3A, Radiothérapie, Médecine interne (Hôpital Joseph Ducuing), Hémato, Anapath, Onco 2A, Oncologie à Rodez, HDJ 2B et enfin HDJ 2A.

A Lilian, qui arrive à coordonner l'impossible avec le plus grand calme et la bonne humeur.

A Cathy, notre étoile du Berger de l'Oncopole !

Au gang des malouds : Pierre-Yves et Guillaume. La coupe du monde c'est grâce à nous ! Encore félicitations pour vos petit(e)s maloud(e)s ! Le gang s'agrandit.

A mes amis de Nantes :

En particulier mes amis depuis le collège et le lycée : Arslan, Léo, Xavier, Arthur, Aymeric et Raphaël.

A mes amis de la FAC :

En particulier à ceux que j'ai connu dès la P2, et avec qui on s'est suivi jusqu'à l'ECN : Benjamin, Quentin, Hélène et Camille.

<u>A ma famille</u>

A mon père,

Papa, il y a 12 ans tu m'emmenais à la faculté de médecine de Nantes pour faire ma première inscription. Aujourd'hui pour ma thèse de médecine tu es là aussi. Merci de m'avoir accompagné durant toutes ces années.

A ma mère,

Maman, je ne connais personne de plus courageux que toi. Merci pour ta sagesse, pour ta tendresse et pour l'amour que tu portes à notre famille.

A mon frère Paul,

Merci d'avoir été là pour Clara et pour moi. Je te souhaite de pleinement d'épanouir dans ta vie future.

A ma sœur Clara,

Ma Clara, je suis si fier de comment tu es devenue. Tu es forte, intelligente et courageuse, tu as toutes les clés en main pour la suite. Je te souhaite plein de bonheur avec Thibaut.

A mon frère Clément et sa femme Neeti,

Clément, on ne s'est pas vu beaucoup durant pas mal d'années, mais on reprend le fil. Je te souhaite plein de belles choses avec ta femme Neeti.

A ma sœur Julia, à son mari Manu, et à mes neveux Roméo et Léon,

Julia, Je suis très heureux qu'on ait pu se retrouver à Toulouse. Tu as une super belle famille, je vous souhaite plein de bonheur.

A mon frère Arnaud et à sa compagne Olga,

Arnaud, c'est cool qu'on puisse se voir un peu plus facilement maintenant. Je suis super heureux pour toi et Olga, je vous souhaite plein de belles choses pour la suite.

A mon frère Charles-Edouard, sa compagne Christelle, et mes neveux Thibaut et Louis,

Doudou, merci beaucoup de t'être démené pour être là pour ma thèse. Je crois que tu veux vérifier car depuis le temps que j'en parle de cette thèse tu veux être sûr que je l'ai !! Merci d'être là pour notre famille, bravo pour celle que tu t'es construite, bravo pour ta réussite. On aura l'occasion de se refaire un road-trip un jour j'espère !

A ma sœur Agathe,

Agathe, même si les choses sont parfois compliquées, reste motivée et le chemin finira par s'éclaircir.

A mon frère Ulysse,

Tu grandis vite, tu es déjà un grand garçon ! Un beau voyage se profile devant toi.

A ma belle-mère Nathalie,

Nath, merci de ta gentillesse, merci pour la bienveillance, pour tes conseils, pour ta sagesse. Merci de nous avoir accepté comme ta propre famille. Je te souhaite plein de bonheur avec Papa et avec notre Ulysse.

A Lucie,

Ma chérie merci d'être comme tu es, merci d'être qui tu es, et merci d'être à mes côtés chaque jour. Je t'aime.

A Rey, mon chat, soutien indéfectible tout au long de cette thèse.

Et à ceux qui ne sont plus avec nous, mais à qui je pense : à mon grand-père **Claude SARRADIN**, et à ma grand-mère **Madeleine SARRADIN**.

Enfin, merci aux patients et à leurs familles, avec qui j'ai partagé un bout du chemin pendant cet internat. J'admire votre courage. Merci pour votre confiance.

Table des matières

Partie I : revue de la littérature

A- Epidémiologie, classification moléculaire et pronostic des cancers du sein 24

A1- Une incidence en augmentation et une mortalité en baisse 24

A2- Une survie qui s'améliore 28

A3- Une participation au programme de dépistage dont la baisse ralentit 28

A4- Classification moléculaire et pronostic des cancers du sein 30

B- Les cancers du sein triple négatifs : incidence, pronostic, classification moléculaire et traitements médicaux 31

C- La chimiothérapie néo-adjuvante dans les cancers du sein, en particulier triple négatifs 34

C1- Indications et modalités dans les cancers du sein 34

C2- Méthodes d'évaluation de la réponse histologique à la chimiothérapie néo-adjuvante 35

C3- La réponse histologique complète (RHC) : un biomarqueur pronostique 35

C4- Stratégies de rattrapage après chimiothérapie néo-adjuvante 35

D- Le microenvironnement immun tumoral 36

D1- Généralités 36

D2- Les points de contrôle immunitaires (PCI) et l'avènement des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (IPCI) 37

D3- Valeur pronostique du microenvironnement tumoral immun dans les CSTN 43

1) TILs : valeur pronostique 43

2) Sous-types de TILs : valeur pronostique 46

3) PD-L1 : valeur pronostique 47

4) PCI secondaires : valeur pronostique 49

D4- Valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante du microenvironnement tumoral immun dans les CSTN 50

1) TILs : valeur prédictive 50

2) Sous-types de TILs : valeur prédictive 52

3) PD-L1 : valeur prédictive 54

4) PCI secondaires : valeur prédictive 55

D5- Effets immunogènes des cytotoxiques et des thérapies ciblées dans les cancers du sein 56

E- Traitement par immunothérapie des cancers du sein triple négatifs 60

E1- Résultats des essais cliniques en phase métastatique et en néo-adjuvant 60

1) En phase métastatique 60

2) En traitement néo-adjuvant 63

E2- Biomarqueurs de réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires dans les CSTN..... 66

1) Le TMB (« Tumor Mutational Burden », ou charge mutationnelle tumorale)..... 66

2) Les TILs 67

3) L'expression de PD-L1 67

4) L'Amplification du gène CD274 69

Bibliographie 70

Partie II : étude MIMOSA

Introduction 82

Conclusion et perspectives 107

Liste des tableaux

Tableau 1 - Les chiffres clés du cancer du sein en France 26
Tableau 2 - Résumé des résultats des essais cliniques d'immunothérapie en monothérapie dans les cancers du sein triple négatifs métastatiques 60
Tableau 3 - Résumé des résultats des essais cliniques d'immunothérapie associée à la chimiothérapie néo-adjuvante dans le traitement des CSTN 65

Liste des figures

Figure 1 - Taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein en France métropolitaine selon l'année 25
Figure 2 – Incidence et mortalité départementales du cancer du sein en France. 27
Figure 3 – Programme de dépistage organisé du cancer du sein : taux de participation départementaux standardisés 2018 29
Figure 4 - Pronostic des cancers du sein selon leur classification moléculaire, en tenant compte de leur histoire naturelle 31
Figure 5 - Mécanismes d'action de CTLA-4 et PD-1 40
Figure 6 - Mécanismes d'action des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire 41
Figure 7 - Mécanismes de mort immunogène des cellules tumorales induite par la chimiothérapie 58
Figure 8 - La chimiothérapie module l'immunité tumorale par des mécanismes distincts de la mort cellulaire immunogène 59

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

ASCO : American society of clinical oncology

ATP : Adenosine triphosphate

ATR : Ataxia telangiectasia mutated

CAFs : Cancer Associated Fibroblasts

CBNPC : Carcinome bronchique non à petites cellules

CDK4/6 : Cyclin-dependent kinase 4/6

CK5/6 : Cytokeratines 5/6

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CPS : Combined positive score

CRT : Calréticuline

CRTR : Calréticuline récepteur

CSTN : Cancer du sein triple négatif

CTNA : Chimiothérapie néo-adjuvante

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CXCL9 -10 -13 : C-X-C motif chemokine ligand 9 -10 -13

DC : Cellule dendritique

DROM : Départements et régions d'outre-mer

EGFR : Epidermal growth factor receptor

EI : Evènement indésirable

ESMO : European society for medical oncology

FAS : Fibroblast Activated Sequence

FGFR : fibroblast growth factor receptor

FOXP3 : Forkhead box P3

GRADE SBR : Grade de Scarff-Bloom et Richardson

HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2

HLA : Human leucocyte antigen

HMGB1 : High–mobility group box 1

HR : Hazard ratio

HRD : Homologous recombination deficiency

IC : Immune cell

IHC : Immunohistochimie

ITT : Intention de traiter

LAG-3 : Lymphocyte activation gene 3

LBA : Late breaking abstract

MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells

MI : Microenvironnement immunitaire

MSI : Microsatellite instability

NK : Natural killer

NRLP3 : Nucleotide-binding domain leucin-rich repeat [LRR] and pyrin-containing receptor 3

OR : Odds radio

PCI : Point de contrôle immunitaire

IC : Intervalle de confiance

IFN : Interferon

IL : Interleukine

IPCI : Inhibiteur de point de contrôle immunitaire

mTOR : Mechanistic target of rapamycin

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase

PD-1 : Programmed cell death 1

PD-L1 : Programmed cell death ligand 1

PD-L2 : Programmed cell death ligand 2

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

P2RX7 : P2X purinoceptor 7

QP : quadruple positive

qRT-PCR : Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR

RCB : Residual cancer burden

RE : Récepteur aux œstrogènes

RH : Récepteurs hormonaux

RHC : Réponse histologique complète

RP : Récepteur à la progestérone

SG : Survie globale

SIR : rapport standardisé d'incidence

SMR : rapport standardisé de mortalité

SSE : survie sans évènement

SSM : Survie sans maladie

SSP : Survie sans progression

TAM : Tumor associated macrophage

TC : Tumor cell

TCR : T cell receptor

T-DM1 : Trastuzumab emtansine

Th : Lymphocyte T helper

TIGIT : T-cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif [ITIM] domain

TILs : Lymphocytes infiltrant la tumeur

TIM-3 : T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3

TLR3 : Toll-like receptor 3

TLR4 ou TLR4R : Toll-like receptor 4

TMB : Tumor mutational burden

TNM : Tumor node metastasis

Treg : Lymphocyte T régulateur

Trm : Tissue resident memory

TSM : Taux standardisé monde

Partie I : revue de la littérature

« Les cancers du sein triple négatifs »

Introduction

Dans cette première partie de revue de la littérature est présenté un état des lieux des connaissances concernant le cancer du sein triple négatif, avec une attention particulière concernant les données publiées sur l'environnement immunologique de ces tumeurs et sur l'influence que la chimiothérapie cytotoxique peut avoir sur lui.

A- Epidémiologie, classification moléculaire et pronostic des cancers du sein (1)

A1- Une incidence en augmentation et une mortalité en baisse

Dans le monde, on estime à 2,08 millions le nombre de nouveaux cas survenus en 2018. Les taux d'incidence les plus élevés sont observés dans les pays les plus développés. On estime qu'une femme sur 8 aura un cancer du sein au cours de sa vie (2). L'incidence mondiale est en augmentation. On a ainsi constaté un accroissement de 3,1% par an entre 1980 à 2010, passant de 641 000 cas à 1,6 millions de cas annuels. En 2030, le nombre de cancers du sein diagnostiqués dans le monde devrait être aux alentours de 3,2 millions de cas (2).

En termes de mortalité, 626 000 décès ont été relevés en 2018. Les taux de mortalité sont les plus élevés dans les pays les moins développés.

Au sein de l'Union européenne, la France se situe au 8e rang parmi les pays ayant le plus haut niveau d'incidence et au 11e rang parmi les pays ayant les taux de mortalité les plus élevés.

En France métropolitaine (tableau 1)

- Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent devant les cancers de la prostate, du poumon et colorectal, et représente la 3ème cause de mortalité par cancer.
- C'est le cancer le plus fréquent chez la femme et la 1ère cause de décès par cancer féminin.
- L'incidence (taux standardisé) du cancer du sein a augmenté entre 1990 et 2018 (+1,1 % par an en moyenne, passant de 72,8 nouveaux cas pour 100 000 femmes à 99,9) alors que la mortalité (taux standardisé) a diminué (-1,3 % par an en moyenne, passant de 20,2 décès par cancer du sein pour 100 000 femmes à 14,0) (figure 1).

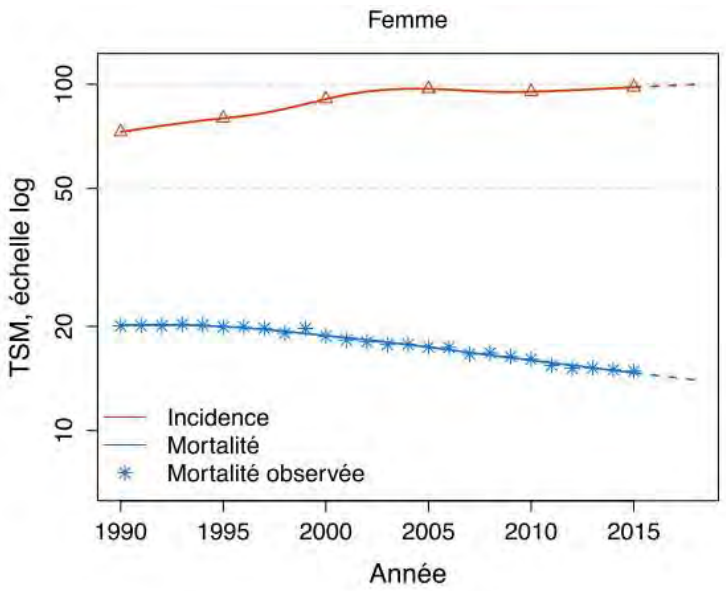

Figure 1 - Taux d'incidence et de mortalité du cancer du sein en France métropolitaine selon l'année (Taux Standardisé Monde – TSM) – Échelle logarithmique (selon santepubliquefrance.fr (1))

Les données des registres des cancers montrent que :

- 6 cancers du sein sur 10 sont diagnostiqués à un stade précoce
- 3 sur 10 à un stade intermédiaire (extension loco-régionale)
- 1 sur 10 à un stade avancé.

Ces chiffres sont stables sur toute la période allant de 2009 à 2012.

Les cancers précoces sont diagnostiqués plus fréquemment chez les femmes d'âge compris entre 50 et 74 ans (65%) contre 59 % chez les moins de 50 ans et 42 % chez les plus de 74 ans. Les cancers les plus avancés sont diagnostiqués plus fréquemment chez les femmes de plus de 74 ans.

Incidence	Mortalité	Survie	Prévalence	Prévention et dépistage
58 459 Nouveaux cas par an	12 146 décès par an	87 % à 5 ans	219 756 cas diagnostiqués lors des cinq dernières années et toujours vivants	50,3% des femmes dépistées dans le cadre du programme de dépistage organisé
France métropolitaine, 2018	France métropolitaine, 2018	Zone registres, personnes diagnostiquées en 2005-2010	France métropolitaine, 2008	France entière, 2018

Tableau 1 - Les chiffres clés du cancer du sein en France (d'après santepubliquefrance.fr (1))

Les disparités régionales et départementales d'incidence du cancer du sein sont peu marquées. Toutefois, il existe une sous incidence qui dépasse les 10% par rapport à la moyenne nationale dans le Jura, le Territoire de Belfort, le Doubs, le Finistère, les Côtes-d'Armor, en Ariège et en Corrèze. Paris est le seul département en sur-incidence qui dépasse les 10 % (Figure 2a).

Les disparités régionales et départementales de mortalité par cancer du sein sont plus prononcées : il existe une surmortalité qui dépasse les 10% par rapport à la moyenne nationale dans tous les départements des Hauts-de-France, dans les Ardennes, la Marne, en Seine-Maritime et dans l'Yonne alors que la mortalité est inférieure à la moyenne nationale dans de nombreux départements du Sud de la France et de Bretagne. Au total, 10 départements ont une mortalité inférieure d'au moins 10% à la moyenne nationale (Figure 2b).

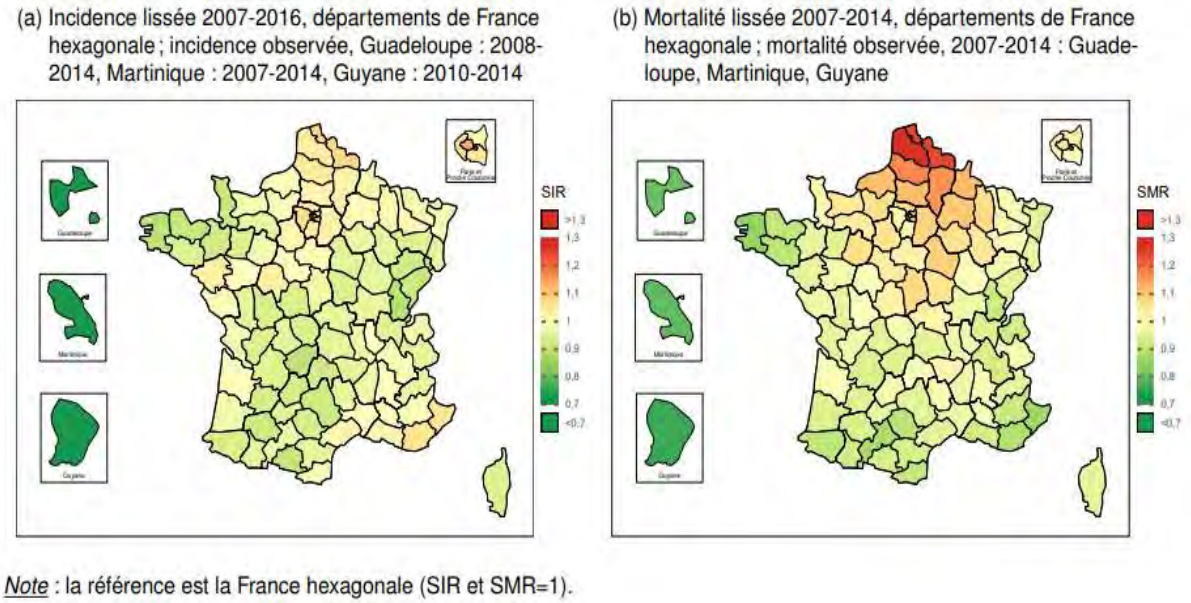

Figure 2 – Incidence (a) et mortalité (b) départementales du cancer du sein en France. SIR = rapport standardisé d'incidence. SMR = rapport standardisé de mortalité.

<u>En Occitanie</u>

Les estimations mettent en évidence une faible sous-incidence par rapport à la France métropolitaine chez les femmes sur la période 2007-2016 (SIR : 0,97 [0,95 ; 0,99]. Sur cette même période, le nombre moyen de nouveaux cas de cancer du sein est estimé à 4886 par an avec un taux d'incidence standardisé monde (TSM) de 96,4 pour 100000 personnes-années. L'Ariège est le seul département de la région qui présente une sous-incidence importante par rapport à la moyenne nationale (SIR : 0,89 [0,84 ; 0,95]).

Pour la période 2007-2014, le nombre moyen de décès annuel par cancer du sein est estimé à 1038. La mortalité par cancer du sein y est légèrement plus basse que la moyenne nationale (SMR : 0,92 [0,90 ; 0,94]). Tous les départements ont une mortalité basse mais seuls trois présentent une sous-mortalité importante (plus de 10%) par rapport à la France métropolitaine : la Haute-Garonne, les Pyrénées-Orientales et le Tarn.

Ces résultats ne concordent que partiellement avec les taux généralement bas de participation au programme de dépistage organisé dans la plupart des départements de notre région. Il est possible que cette faible participation explique la sous-incidence mais la situation de la mortalité devrait alors être moins favorable du fait de diagnostics plus tardifs. Or, ce n'est pas ce que l'on observe.

A2- Une survie qui s'améliore

La survie à 5 ans des femmes atteintes d'un cancer du sein s'est améliorée au cours du temps, passant de 80 % pour celles concernées entre 1989 et 1993 à 87 % entre 2005 et 2010 (survie nette standardisée) (tableau 1). Cette amélioration est liée d'une part, à une plus grande précocité des diagnostics (en lien avec le développement des pratiques de dépistage, mais également avec l'amélioration des pratiques et techniques diagnostiques) et, d'autre part, aux progrès thérapeutiques de ces dernières années.

La France se situe parmi les pays avec les taux de survie les plus élevés d'Europe.

A3- Une participation au programme de dépistage dont la baisse ralentit

En 2018, le taux national de participation était de 50,3 %, soit environ 2 595 000 femmes d'âge compris entre 50 et 74 ans dépistées au cours de l'année dans le cadre du programme national de dépistage organisé. Ce taux est relativement stable dans le temps depuis 2004. Concernant la région Occitanie, le taux de participation était de 47,7 % en 2017 et 47,4 % en 2018 (Haute-Garonne : 39,7 % en 2017 et 38,4 % en 2018).

Les données des structures de gestion du dépistage montrent qu'après avoir augmenté jusqu'en 2011-2012 pour atteindre un pic à 52,7 %, la participation au programme de dépistage organisé est depuis lors en diminution. Les derniers chiffres indiquent que cette diminution semble cependant se ralentir.

Ce ralentissement s'observe pour toutes les tranches d'âge et dans la plupart des régions, à l'exception des Pays de la Loire et de la Bretagne où, les taux de participation continuent de baisser alors qu'ils étaient parmi les plus élevés. A l'inverse, en Auvergne-Rhône-Alpes et dans le Grand-Est, les taux de participation augmentent. Dans les Départements et Régions d'Outre-Mer (DROM), des baisses importantes sont observées.

L'hétérogénéité de la participation au dépistage organisé sur le territoire français constatée les années précédentes, perdure pour la période 2017-2018, avec des écarts entre les régions allant de 35,2 % en Corse et 39,1 % en Ile de France, à 58,2 % dans les Pays de la Loire et 58,6 % en Centre-Val-de-Loire. En Outre-mer, les taux varient de 26,1 % en Guyane à 47,3 % à la Réunion. Cette hétérogénéité géographique se retrouve également à l'échelle départementale avec des taux variant de 28,5 % à Paris à 62,4 % en Indre-et-Loire (figure 3).

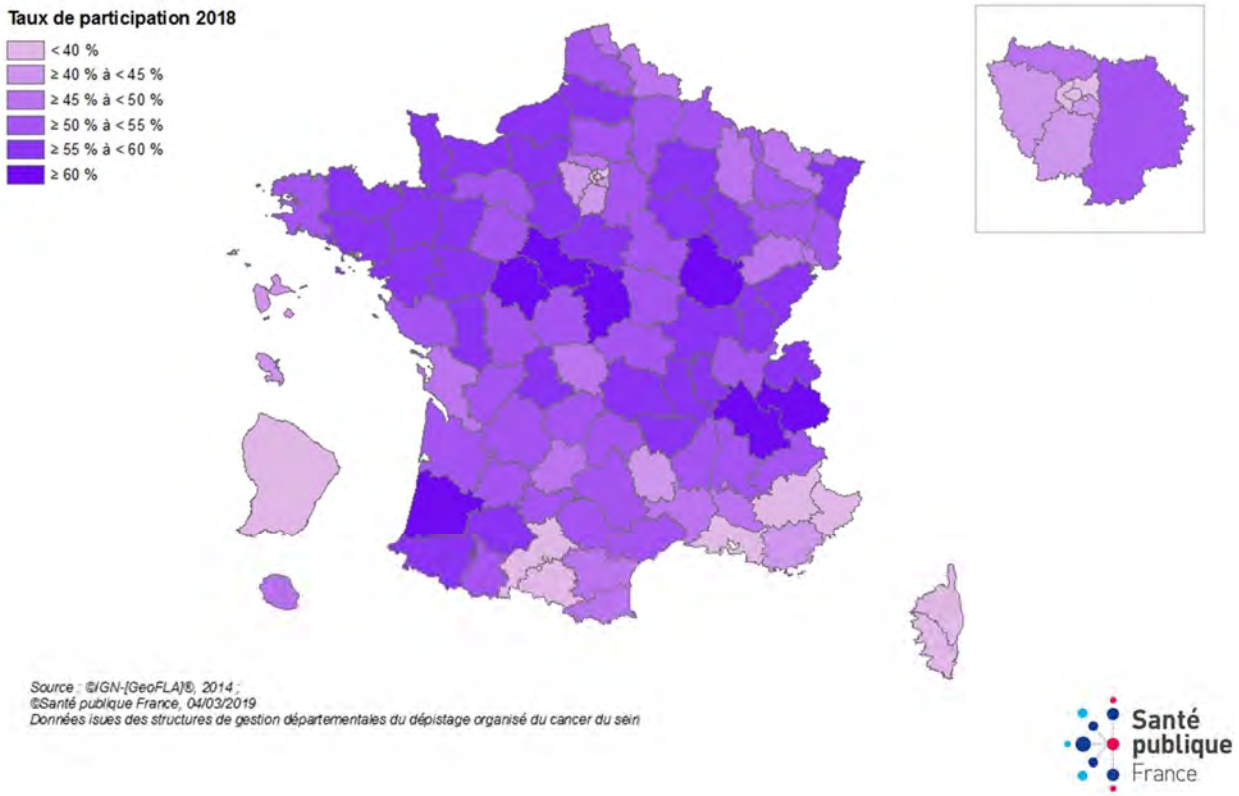

Figure 3 – Programme de dépistage organisé du cancer du sein : taux de participation départementaux standardisés 2018 (population de référence : France 2009), d'après santepubliquefrance.fr (1).

Il est difficile d'interpréter les tendances récentes de ces taux de participation au dépistage organisé (qui ne tienne pas compte du dépistage individuel). La baisse observée à partir de 2011-2012 pourrait être liée, pour partie, à la controverse sur les bénéfices et les risques du dépistage du cancer du sein. Sous cette hypothèse, le ralentissement en 2017-2018 montrerait que l'effet de la controverse sur la participation tend à s'estomper.

Il convient par ailleurs de comprendre ce qui se passe dans les régions où la participation continue de baisser alors que les niveaux de participation étaient relativement élevés et d'étudier ce qui se passe dans les régions d'Outre-mer.

Enfin, il est urgent de disposer d'outils permettant de mesurer précisément le recours au dépistage individuel afin de décrire d'éventuels phénomènes de transfert entre dépistage organisé et individuel, et de suivre les tendances globales de recours au dépistage du cancer du sein.

Une étude clinique de dépistage personnalisé, dénommée MyPeBS (My Personal Breast Screening), est actuellement en cours (ClinicalTrials.gov, identifiant : NCT03672331). Ce projet coordonné par le Dr Suzette Delaloge (Institut Gustave Roussy) pour la France et financé par l'Union européenne a pour but d'évaluer l'intérêt d'un dépistage personnalisé chez les femmes d'âge compris entre 40 à 70 ans en Europe. MyPeBS compare la méthode de dépistage organisée en cours dans chacun des pays participants à une nouvelle approche de dépistage personnalisé basée sur l'estimation du risque individuel. L'étude est mise en œuvre dans 5 pays (France, Belgique, Italie, Israël, Royaume-Uni) et l'objectif est de recruter 85 000 femmes volontaires**.** Le risque individuel est évalué par l'histoire personnelle et familiale de chaque femme, la densité mammaire mais aussi un test salivaire pour génotypage (analyse de 313 polymorphismes de l'ADN intégrés dans un score de risque).

A4- Classification moléculaire et pronostic des cancers du sein

Des classifications moléculaires, prenant en compte des analyses transcriptomiques, permettent de classer les cancers du sein en 4 groupes distincts (3) :

- Luminal A : tumeurs de bas grade (grade SBR 1 ou 2), exprimant le récepteur aux œstrogènes et à la progestérone, HER2 négatives, avec un index de prolifération faible (Ki67 < 15-20 %).
- Luminal B : tumeurs de haut grade (grade SBR 2 ou 3), exprimant le récepteur aux œstrogènes +/- celui à la progestérone, HER2 négatives ou positives, avec un index de prolifération plus élevé (Ki67 > 15-20 %).
- HER2 enrichis : tumeurs n'exprimant pas les récepteurs hormonaux, mais qui surexpriment et/ou amplifient HER2.
- Basal-like, caractérisées par une absence d'expression des récepteurs hormonaux et de HER2 non surexprimé et non amplifié, dites « tumeurs triple-négatives », objet de ce travail de thèse.

Les tumeurs « luminal A » sont celles qui ont le meilleur pronostic. Les tumeurs « luminal B » sont de pronostic intermédiaire. Les tumeurs HER2 enrichies ou basal-like sont celles qui ont le plus mauvais pronostic (si l'on tient compte de l'histoire naturelle) (Figure 3). Les traitements anti-HER2, en particulier le trastuzumab et plus récemment le pertuzumab et le T-DM1 ont très nettement amélioré le pronostic des tumeurs HER2-enrichies et luminales B HER2-positives (4–6).

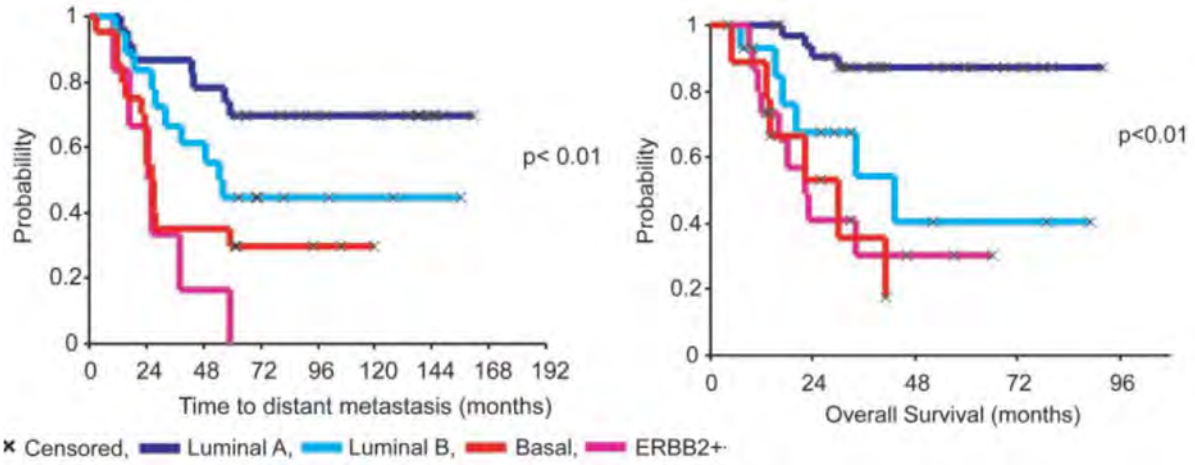

Figure 4 - Pronostic des cancers du sein selon leur classification moléculaire, en tenant compte de leur histoire naturelle (d'après T. Sorlie et al. (3)). A gauche, la survie sans métastase. A droite, la survie globale.

B- <u>Les cancers du sein triple négatifs : incidence, pronostic, classification moléculaire et traitements médicaux :</u>

Les cancers du sein triple négatifs (CSTN), représentent environ 15% des adénocarcinomes infiltrants et sont définis par l'absence d'expression du récepteur alpha aux œstrogènes, à la progestérone, et l'absence de surexpression ou d'amplification de HER2. Ce sous-type est associé à une évolutivité agressive et a un pronostic défavorable (7).

En effet, plus d'un tiers des patientes avec un CSTN localisé vont présenter des récidives loco-régionales non opérables et/ou des métastases à distance. Le risque de rechute est maximal 1 à 3 ans après le diagnostic et quasi nul au-delà de 5 ans. Dans la série publiée par R. Dent, 100% des rechutes sont survenues à 8 ans et la très grande majorité dans les 3 ans post-diagnostic (8). Les métastases ganglionnaires, pulmonaires, hépatiques et cérébrales sont très fréquentes. Les métastases osseuses sont plus rares.

Le pronostic d'un CSTN de stade IV est redoutable avec une médiane de survie globale d'environ 15 mois (9). La médiane est de 21 mois dans les séries les plus récentes, avec l'incorporation de l'immunothérapie (10).

L'âge médian au diagnostic est plus jeune (53 ans dans la série de R. Dent) que pour les autres sous types et la taille plus volumineuse (30 mm dans la série de R. Dent) (8).

Les CSTN sont enrichis de femmes ayant une prédisposition héréditaire pour *BRCA*, surtout BRCA1 (11,12). Une prédisposition BRCA1 est en effet retrouvée chez 15% des patientes ayant un CSTN et ce pourcentage augmente d'autant plus que la patiente est jeune. En cas de CSTN isolé sans antécédents familiaux, on retrouve une mutation constitutionnelle de *BRCA* dans 32.9% des cas avant 30 ans, 20.4% chez les trentenaires, 11.6% chez les quadragénaires et 6-7% au-delà (12). De plus, on estime que 80% des femmes ayant une prédisposition BRCA1 auront un CSTN au cours de leur vie.

Du fait d'une définition purement négative, la chimiothérapie a été le seul traitement pour les CSTN pendant très longtemps. Cependant, ceci pourrait prochainement changer avec l'incorporation des inhibiteurs de PARP pour les patientes présentant une mutation germinale *BRCA*, et également avec les résultats de la combinaison d'une chimiothérapie avec l'immunothérapie chez les patientes présentant une tumeur PD-L1 positive en métastatique (10,13), voire en néoadjuvant (14).

Les cytotoxiques les plus actifs sont les taxanes (paclitaxel, docétaxel), les anthracyclines (doxorubicine, épirubicine) et les alkylants dont le cyclophosphamide et les sels de platine. Les autres chimiothérapies pouvant être prescrites sont le 5-fluorouracile, la capécitabine, l'éribuline, la gemcitabine, la vinorelbine, le méthotrexate, l'étoposide et l'ixabepilone (pas d'AMM en France).

Cependant, il existe une importante hétérogénéité moléculaire et pronostic des CSTN. Plusieurs sous-groupes ont été identifiés permettant d'affiner le pronostic et dans l'espoir de proposer des traitements plus adaptés aux altérations moléculaires et génétiques identifiées (15).

Récemment, une classification moléculaire des CSTN, simplifiée par rapport à celle de BD. Lehmann publiée en 2011 (16) a été proposée, permettant de subdiviser les CSTN en 4 sous-groupes (17,18) :

- Basal-like (75% des cas), avec une activation des voies de signalisation du cycle cellulaire, de la réponse aux dommages de l'ADN (ex : ATR, BRCA) et de la division cellulaire.
- Mesenchymal, avec une activation de la mobilité cellulaire, de l'interaction avec la matrice extra-cellulaire, de la transition épithélio-mésenchymateuse et de voies de signalisation de facteurs de croissance.
- Luminal Androgen Receptor, avec une expression du récepteur aux androgènes (tumeurs dites « apocrines »).
- Immune-enriched, avec un enrichissement en gènes responsables de la réponse immunitaire anti-cancéreuse.

Le phénotype basal-like peut être identifié en immunohistochimie grâce à la positivité du marquage EGFR (epidermal growth factor receptor) et/ou CK5/6 (cytokeratines 5/6). Les tumeurs négatives pour l'EGFR et le CK5/6 sont considérées comme de phénotype non basal (19). Ce phénotype basal-like permet d'identifier des tumeurs de mauvais pronostic parmi les CSTN (19).

Cette classification moléculaire ouvre des perspectives thérapeutiques adaptées pour chacun des sous types moléculaires :

- Pour le groupe basal-like, pour lequel il existe des défauts de la recombinaison homologue, un ciblage des voies de signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN semble pertinent, avec par exemple l'utilisation des sels de platine ou des inhibiteurs de PARP.

Les gènes *BRCA* codent pour des protéines qui participent aux réparations des cassures double brins de l'ADN, dans le cadre du système de recombinaison homologue. Ainsi, les cellules porteuses d'une mutation délétère pour *BRCA* ont un défaut de leur système de réparation de l'ADN.

Les sels de platines sont des agents alkylants, qui exercent leurs effets en se liant à l'ADN et en induisant de multiples cassures simple brins, qui conduit à l'apoptose et à la mort cellulaire. Ces agents sont donc particulièrement efficaces contre les tumeurs ayant des défauts de réparation de l'ADN, et donc les tumeurs ayant des protéines BRCA non fonctionnelles. Le carboplatine a ainsi montré sa supériorité par rapport au docétaxel dans le traitement des CSTN métastatiques chez les femmes ayant une mutation germinale *BRCA* (20).

De même, les protéines du groupe PARP sont impliquées dans la réparation des cassures simple brin de l'ADN. Ainsi, les essais cliniques avec des inhibiteurs de PARP ont montré une supériorité par rapport à la chimiothérapie dans le traitement des CSTN métastatiques chez des femmes ayant une prédisposition héréditaire BRCA, avec un allongement significatif de la survie sans progression (21,22).

- Pour le groupe mesenchymal, il a été proposé l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR et d'AKT (23,24) car ces cancers ont une activation de la voie PI3K/AKT, secondaire à des mutations de *PIK3CA*, d'*AKT* et/ou à des pertes de PTEN. Il a également été proposé une chimiothérapie par éribuline, qui est efficace contre la transition épithélio-mésenchymateuse (25), ou l'utilisation d'inhibiteur de FGFR (fibroblast growth factor receptor).

- Pour le groupe Luminal Androgen Receptor, il a été proposé des traitements bloquants le récepteur aux androgènes, comme l'enzalutamide ou le bicalutamide (26–28). Il existe de surcroit dans ce sous-groupe, également souvent des mutations de *PIK3CA*, permettant d'envisager des combinaisons entre inhibiteurs de PIK3CA et blocage du récepteur aux androgènes.

- Pour le groupe Immune-enriched, les patientes pourraient bénéficier des traitements par immunothérapies modernes, par exemple les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires tel que PD-(L)1.

C- La chimiothérapie néo-adjuvante dans les cancers du sein, en particulier triple négatifs :

C1- Indications et modalités dans les cancers du sein

Outre qu'elle autorise souvent une chirurgie conservatrice qui d'emblée ne l'est pas en raison du rapport entre la taille de la tumeur et de la taille du sein, la chimiothérapie néo-adjuvante permet d'identifier les patientes qui ne sont pas en réponse histologique complète (RHC) et donc plus à risque de rechute. Ces patientes peuvent alors bénéficier, après la chirurgie, d'une stratégie de rattrapage éventuellement dans le cadre d'un essai clinique. Cette adaptation du traitement à la maladie résiduelle n'est pas possible si la chimiothérapie est effectuée après la chirurgie (chimiothérapie adjuvante). De fait, la plupart des tumeurs triple négatives (et HER2 positives) sont désormais traitées par une chimiothérapie première, même si elles sont d'emblée opérables au diagnostic, dès le stade pT2pN0 (29).

Le schéma standard consiste en l'administration séquentielle d'une chimiothérapie à base d'anthracycline, de cyclophosphamide et de taxane, selon préférentiellement un schéma dose-dense pour les CSTN.

Les taux de RHC sont meilleurs pour les tumeurs triples négatives et HER2-enrichies (avec ajout de trastuzumab) que pour les cancers du sein luminaux, atteignant jusqu'à 39% de RHC (30). Mais il existe une importante hétérogénéité du taux de RHC selon le sous-groupe moléculaire des CSTN : basal 36% contre non-basal 20% (31).

Les indications actuelles de la chimiothérapie néo-adjuvante sont donc les suivantes (32,33) :

- Cancer du sein localisé triple négatif ≥ 2 cm et/ou N+ (dès le stade II)
- Cancer du sein localisé HER2 positif ≥ 2 cm et/ou N+ (dès le stade II)
- Cancer du sein localisé localement évolué et potentiellement chimiosensible, dans le but de permettre une chirurgie conservatrice
- Cancer du sein non opérable d'emblée (cancer du sein inflammatoire).

C2- Méthodes d'évaluation de la réponse histologique à la chimiothérapie néo-adjuvante

Les classifications anciennement proposées par Chevallier et Sataloff ne sont plus utilisées actuellement.

Aujourd'hui, on évalue la maladie résiduelle :
- Soit selon le RCB (« Residual Cancer Burden »), qui est un index continu combinant la mesure de la tumeur primitive (taille et cellularité) et des métastases ganglionnaires (nombre et taille). Cet index est ensuite divisé en 4 classes : RCB-0 à RCB-III. Le RCB-0 indique une RHC et le RCB-III une importante maladie résiduelle. Ces différentes classes de RCB sont fortement corrélées à la survie sans rechute à distance (risque très faible pour les classes RCB-0 ou I, intermédiaire pour le RCB-II et important pour le RCB-III) (34).

- Soit selon la classification TNM effectuée après la chimiothérapie néo-adjuvante (appelée ypTNM) permettant d'identifier les tumeurs en RHC (ypT0/is et ypN0) et celles non en RHC (tous les autres cas) (35).

C3- La réponse histologique complète (RHC) : un biomarqueur pronostique

La RHC à la chimiothérapie néo-adjuvante, définie par un statut anatomopathologique ypT0/is et ypN0, c'est-à-dire l'absence de cellules tumorales infiltrantes dans le sein et dans les ganglions axillaires, est associée à une amélioration nette de la survie sans évènement (HR 0,18-0,24) et de la survie globale (HR 0,16-0,20) pour les CSTN. C'est également le cas pour les cancers HER2 enrichis qui reçoivent du trastuzumab en termes de survie sans évènement (HR 0,15-0,31) comme de survie globale (HR 0,08-0,13) (36,37).

C4- Stratégies de rattrapage après chimiothérapie néo-adjuvante

En cas de réponse histologique incomplète à la chimiothérapie néo-adjuvante, il peut être proposé une chimiothérapie adjuvante pour les CSTN par capécitabine pour 6 à 8 cycles. Cette dernière augmente la survie sans maladie à 5 ans (69,8% vs 56,1%, HR = 0,58 ; 95% IC, 0,39-0,87), et la survie globale à 5 ans (78,8% vs 70,3%, HR = 0,52 ; 95% IC, 0,30-0,90) dans une analyse en sous-groupe d'une étude clinique prospective asiatique non dédiée aux CSTN (38).

Actuellement, des essais cliniques prospectifs évaluent d'autres stratégies de rattrapage pour les CSTN, par exemple :

- SWOG 1418 : Phase III, R1:1 (stratification selon le statut PD-L1), **observation *versus* pembrolizumab** (1an) en adjuvant post-néoadjuvant si résidu >10 mm et/ou pN+

- A-BRAVE : Phase III, R1:1 **observation *versus* avélumab** (1 an) pour les CSTN à haut risque (≥ 4N+)

- ECOG-ACRIN 1131 : Phase III, **capécitabine versus sel de platine**, en adjuvant post néoadjuvant si résidu > 10mm et/ou pN+, pour les CSTN basal-like (selon la signature moléculaire PAM50)

- OLYMPIA : +/- olaparib en cas de prédisposition héréditaire BRCA (résultats attendus pour fin 2020)

Concernant les tumeurs HER2 positives, il doit être proposé en l'absence de RHC après chimiothérapie néo-adjuvante comprenant du trastuzumab, un traitement par T-DM1 pour 14 cycles, permettant de diminuer le risque de rechute de 50% par rapport à la poursuite du trastuzumab pour 14 cycles. La survie sans maladie invasive à 3 ans est de 88,3% avec le T-DM1 contre 77% avec le trastuzumab (HR 0,50, 95% IC 0,39-0,64, p < 0,001) (6).

D- Le microenvironnement immun tumoral

D1- Généralités

Le système immunitaire est capable de reconnaître les tumeurs et élimine de nombreuses cellules malignes précoces. Cependant, les tumeurs évoluent pour échapper à la réponse immunitaire et le microenvironnement tumoral devient immunosuppresseur.

Les réponses immunitaires sont régulées par un certain nombre de points de contrôle immunitaires qui limitent l'intensité et la durée des réponses immunitaires physiologiques, réduisant les dommages tissulaires liés à la réponse immunitaire, contrôlant la résolution de l'inflammation et maintenant la tolérance pour prévenir l'auto-immunité. Les tumeurs exploitent ces voies inhibitrices pour échapper au système immunitaire. Ainsi, le blocage des points de contrôle PD-1 (Programmed cell death 1) et CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) s'est révélé être une stratégie d'immunothérapie anticancéreuse efficace et durable chez un sous-ensemble de patients présentant une variété de types de tumeurs, et des combinaisons entre différentes immunothérapies améliorent les taux de réponse (39).

Le microenvironnement tumoral est composé :

- de cellules anti-tumorales (ou immuno-activatrices) : les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes de type NK (Natural Killer), les lymphocytes T CD4+ de type helper (Th), les macrophages de type 1 et les cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes - CPA) ;
- mais aussi de cellules pro-tumorales (ou immuno-suppressives) : lymphocytes T CD4+ de type régulateur (Foxp3+ ou Treg), macrophages associés aux tumeurs (macrophages de type 2, TAM ou M2), de cellules myéloïdes appelées MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells) et de fibroblastes associés aux tumeurs (CAFs = Cancer Associated Fibroblasts).

Il apparait également que l'infiltration lymphocytaire par les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) est plus importante au niveau de la tumeur primitive qu'au niveau des métastases dans les cancers du sein, indiquant un probable rôle de l'échappement au système immunitaire dans la progression métastatique de ces cancers (40). Ceci a été particulièrement bien décrit pour les CSTN, où il apparait que l'infiltrat immunitaire de la tumeur primitive est plus important qu'au niveau des métastases (réduction par rapport aux métastases du nombre de lymphocytes T CD8+, de lymphocytes T CD8+ PD-1+ et de lymphocytes T PD-1+). Ceci est en faveur d'une utilisation préférentiellement précoce de l'immunothérapie dans les CSTN (41).
La progression du cancer du sein a également été montré comme associée à une diminution de la fonction des lymphocytes NK infiltrant la tumeur (42).

Bien que souvent plus efficaces et mieux tolérés que les thérapies traditionnelles et ciblées, de nombreux patients ont une résistance innée ou acquise aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (IPCI). L'immuno-édition du cancer est le processus par lequel le système immunitaire peut à la fois contraindre et favoriser le développement tumoral, qui se déroule en trois phases appelées élimination, équilibre et évasion. Tout au long de ces phases, l'immunogénicité tumorale est éditée et les mécanismes immunosuppresseurs qui permettent la progression de la maladie sont acquis (43). Les IPCI sont donc d'autant plus efficaces qu'ils sont administrés tôt dans la prise en charge (1ère ligne métastatique), les mécanismes immunosuppressifs étant alors moindres.

D2- Les points de contrôle immunitaires (PCI) et l'avènement des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (IPCI)

La capacité du système immunitaire à reconnaître et à éliminer les cellules tumorales naissantes, et donc la surveillance du développement tumoral a été reconnu il y a près d'un siècle par Paul Ehrlich (1957) puis étudié plus en détail par Lewis Thomas et MacFarlane Burnet (Burnet, 1957; Lawrence, 1959). Étant donné la fonction physiologique de suppression tumorale par un système immunitaire sain, un diagnostic de cancer peut également être

considéré comme un diagnostic d'un système immunitaire dysfonctionnel. L'évolution des interactions immuno-tumorales – de protection anti-tumorale à pro-tumorale - pendant la progression du cancer a été conceptualisée dans la théorie de l'immuno-édition par Robert Schreiber, par laquelle le système immunitaire, qui contrôle initialement et élimine les cellules malignes, exerce inévitablement un effet de pression sélectif favorisant la croissance de clones peu immunogènes qui peuvent échapper à la reconnaissance immunitaire.

Des approches pour réactiver les fonctions immunitaires anti-tumorales et améliorer la capacité du système immunitaire à reconnaître les tumeurs malignes ont ainsi été conçues pour tenter d'éradiquer le cancer (immunothérapie anti-cancéreuse). Les rémissions de tumeurs obtenues par la stratégie de William Coley en injectant des tumeurs avec un mélange de bactéries dans le but de réactiver les fonctions immunitaires anti-cancéreuses, constituent la première preuve que l'évasion immunitaire des tumeurs peut être un processus réversible (Coley, 1891).

L'immunothérapie contre le cancer a été profondément inspirée par les études immunitaires dans deux domaines principaux : les maladies infectieuses et la greffe de moelle osseuse allogénique. Ces études ont fourni la preuve, respectivement, que le système immunitaire humain peut être « formé » pour reconnaître et éliminer les agents pathogènes par le développement d'une immunité spécifique, et qu'un système immunitaire allogénique peut induire des réponses immunitaires anti-tumorales et des rémissions cliniques dans un hôte différent (à savoir les effets du greffon contre la leucémie). Ces deux observations indiquent clairement que l'immunité peut être établie avec succès contre des « cibles » d'origines différentes (différents organismes ou individus). La reconnaissance que les cellules tumorales constituent une altération d'une forme du « soi » a donc conduit à l'utilisation de matériel antigénique tumoral comme stratégie de vaccination contre le cancer pour favoriser les réponses et l'éradication des maladies par les cellules T spécifiques des tumeurs. Cependant, en dépit de sporadiques activités dans des sous-groupes de patients atteints de certaines tumeurs malignes, les vaccins anti-cancer ont largement échoué à avoir un important impact dans les essais cliniques de phase tardive.

Le développement ultérieur d'une approche alternative pour susciter des réponses immunitaires anti-tumorales en inactivant les récepteurs immunitaires inhibiteurs (points de contrôle immunitaires = PCI) a récemment permis de démontrer que l'immunothérapie peut contrôler durablement le cancer avancé. La désinhibition des réponses immunitaires préexistantes en bloquant le PCI **CTLA-4** et / ou **PD-1** (ou son ligand **PD-L1**) pour permettre l'activation immunitaire prolonge considérablement la survie des patients atteints de certains cancers avancés.

Les succès du blocage des PCI, initialement obtenus chez les patients atteints de mélanome avancé, se sont rapidement étendus aux patients atteints d'autres types de tumeurs solides et même pour certaines hémopathies. À ce jour, le traitement par blocage des PCI fait partie des standards de soins pour les patients atteints de mélanome avancé, de cancer du poumon non à petites cellules, de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, de carcinomes urothéliaux,

de cancers du rein à cellules claires, de cancers avec une instabilité microsatellitaire élevée (MSI) (tels que le cancer colorectal à indice MSI élevé) et du lymphome hodgkinien réfractaire. De nombreux autres cancers, dont le cancer du sein, font l'objet actuellement d'essais cliniques. Ces résultats positifs, en plus de raviver l'enthousiasme et l'intérêt pour l'immunothérapie anticancéreuse, ont souligné le fait que, chez une fraction substantielle des patients, le système immunitaire peut toujours reconnaître les cellules tumorales si suffisamment de signaux co-stimulants sont correctement délivrés. La réduction de la suppression immunitaire en bloquant les PCI peut ainsi fournir une stimulation immunitaire suffisante pour déclencher une immunité thérapeutique anti-tumorale. Cependant, l'expérience clinique accumulée jusqu'à présent avec le blocage des PCI a également clairement montré que la résistance tumorale primaire et la résistance tumorale acquise à ces agents sont des facteurs communs qui empêchent l'obtention d'un bénéfice clinique prolongé pour la majorité des patients. En outre, les événements indésirables d'origine immunitaire de haut grade, en particulier avec le double blocage CTLA-4 et PD-1, doivent être pris en compte lors de la prise de décisions thérapeutiques (44).

L'expression et la fonction de CTLA-4 sont intrinsèquement liées à l'activation des lymphocytes T. CTLA-4 est immédiatement régulé à la hausse après l'engagement du récepteur des cellules T (TCR) (signal 1), son expression atteignant un pic 2 à 3 jours après l'activation. CTLA-4 atténue la signalisation TCR par compétition avec la molécule co-stimulatrice CD28 avec les ligands B7 : B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86), pour lesquels CTLA-4 a une avidité et une affinité plus élevées. Parce que B7-1 et B7-2 fournissent tous deux des signaux de co-stimulation positifs via CD28 (signal 2), l'inhibition compétitive des deux molécules par CTLA-4 est nécessaire pour atténuer efficacement l'activation des lymphocytes T (Figure 5).

Les fonctions biologiques primaires de PD-1 sont de maintenir la tolérance périphérique ainsi que les réponses des lymphocytes T dans une plage physiologique souhaitée. Parce que le système régulateur PD-1 / PD-L1 est induit par les réponses immunitaires, cela forme une boucle de rétroaction négative pour atténuer les réponses locales des lymphocytes T et minimiser les dommages tissulaires. PD-1 régule l'activation des cellules T par l'interaction avec PD-L1 et PD-L2. PD-1 est exprimé lors de l'activation des lymphocytes T et B. En raison de l'expression de ses ligands, qui sont largement exprimés dans les tissus non lymphoïdes, PD-1 agit principalement en atténuant l'activation des lymphocytes T à la périphérie (Figure 5).

L'inhibition de PD-1 (ou PD-L1) et de CTLA-4 permet de restaurer la réponse immunitaire qui a été inhibée (45). Des anticorps monoclonaux ont ainsi été développés, d'abord dirigés contre CTLA-4, puis contre PD-1 (ou son ligand PD-L1), pour lever ce frein immunologique et permettre une réponse immunitaire anti-tumorale efficace et durable (46) (Figure 6).

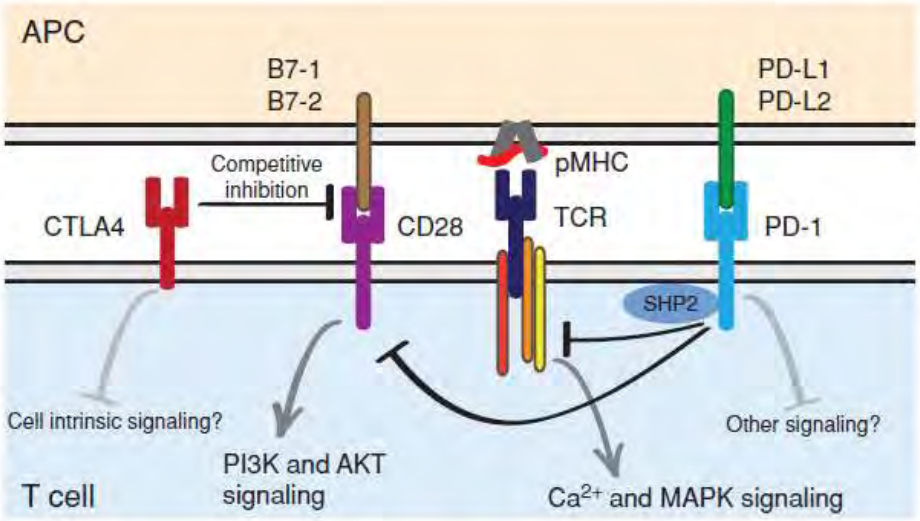

Figure 5 - Mécanismes d'action de CTLA-4 et PD-1. CTLA-4 agit de façon compétitive avec les ligands activateurs (B7-1 et B7-2) en se liant de façon inhibitrice au récepteur co-activateur CD28. La liaison de PD-1 avec son ligand PD-L1, exprimé dans les tissus périphériques (et dans les tumeurs), délivre un signal inhibiteur sur le TCR (récepteur des lymphocytes T) et sur le récepteur de co-stimulation CD28 (d'après R. Zappasodi et al. (43)).

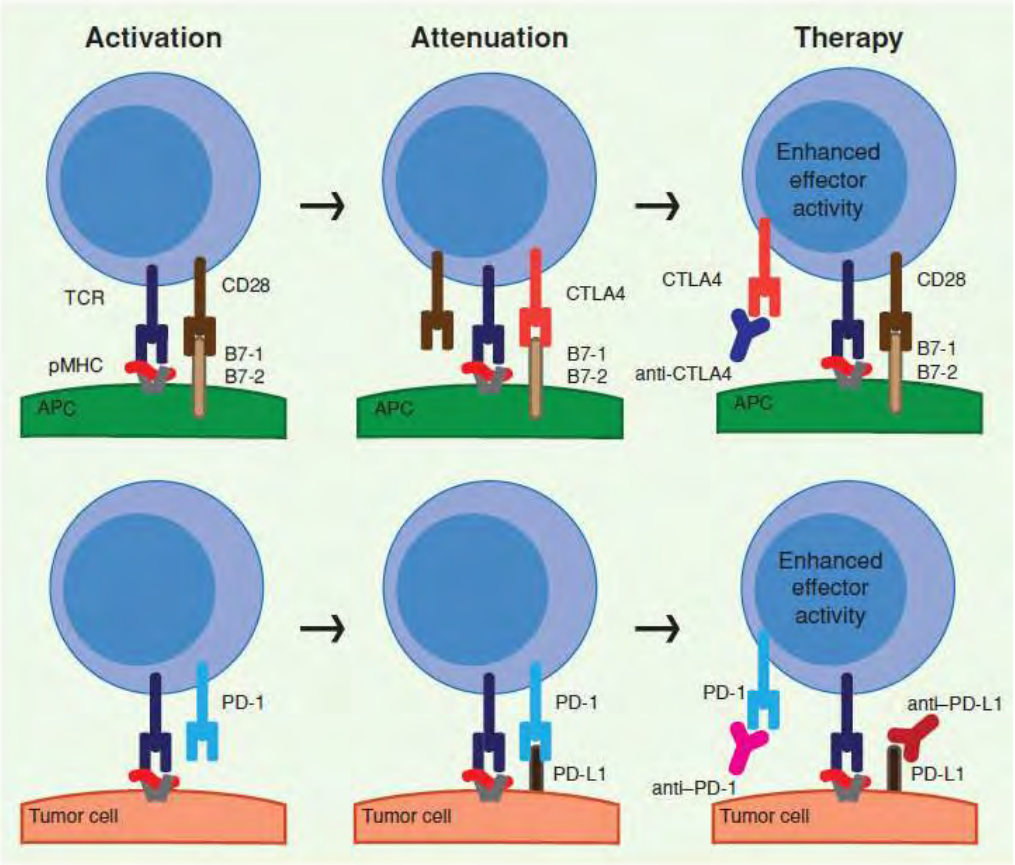

Figure 6 - Mécanismes d'action des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire. L'inhibition des points de contrôle immunitaires CTLA-4 et PD-1 (ou PD-L1) par des anticorps monoclonaux (appelés « inhibiteurs des points de contrôle immunitaires ») permet de restaurer la réponse immunitaire anti-cancéreuse (d'après R. Zappasodi et al. (43)).

Des études plus récentes ont montré que PD-1 et CTLA-4 ne sont pas les seuls PCI présents à la surface des cellules immunitaires, et qu'il existe également d'autres points de contrôles dits « secondaires », tels que : TIGIT (T-cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif [ITIM] domain), TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3*)* et LAG-3 (Lymphocyte activation gene 3) (47,48).

Parmi les lymphocytes T CD8 infiltrant la tumeur, certains, identifiés par la présence du marqueur CD103 et du marqueur CD39, représentent une catégorie de cellules mémoires présentes dans les tissus et faiblement dans la circulation sanguine, qui pourraient être la catégorie ayant le plus grand potentiel de rejet des tumeurs. Toutefois, leurs fonctions tumoricides sont inhibées au sein de l'environnement tumoral (49).

Une étude très récente, publiée par C-C. Balança et al. en 2020 (50), a montré que les lymphocytes T CD8+ mémoires spécifiques des antigènes tumoraux, acquièrent de façon séquentielle au site tumoral les différents PCI (PD-1 et TIGIT, puis CTLA-4 et enfin TIM-3), conduisant à l'acquisition d'un phénotype « exhausted » (épuisement cellulaire). Les cellules acquièrent également des marqueurs de lymphocytes « tissue resident memory – Trm » tels que CD103 et CD39 (CD39 étant davantage présent sur les cellules spécifiques de l'antigène), leur permettant de rester au sein de la tumeur (acquisition d'un phénotype dit « Trm-like »). Ce sont ces cellules qui ont le plus grand potentiel cytotoxique au sein de la tumeur, mais elles sont inhibées du fait de l'expression des PCI. L'utilisation d'un anticorps anti-PD-1 permet de libérer leur potentiel cytotoxique au sein de la tumeur et d'augmenter la prolifération des lymphocytes T CD8+ mémoires spécifiques de la tumeur dans la circulation sanguine. Les cellules spécifiques de l'antigène tumoral au sein de la tumeur, exprimant les 4 PCI sont nommées « cellules quadruple-positives (QP) Trm-like », et seraient les cellules avec le potentiel immunologique anti-tumoral le plus important au sein de la tumeur. **Ces cellules peuvent être identifiées par le marqueur TIM-3 en immunohistochimie (IHC) sur la tumeur.** Dans une cohorte de 30 patients avec un cancer ORL en rechute ou métastatique, traités par immunothérapie anti-PD-(L)1, une forte infiltration (égale ou supérieure à la médiane) par des lymphocytes CD8+ TIM-3+ était significativement corrélée à une meilleure réponse et à une meilleure survie globale, alors que l'infiltrat total en cellules CD8+ ne l'était pas significativement. Cette étude identifie donc une nouvelle population de lymphocytes T CD8+ spécifiques de la tumeur, ayant un fort potentiel immunologique anti-tumoral, pouvant être ré-activée par l'immunothérapie anti PD-(L)1 (prolifération des cellules T mémoires circulantes qui viendront renforcer la réponse immunitaire au site tumoral, et réversion de l'épuisement lymphocytaire des cellules QP Trm-like au site tumoral), permettant de renforcer le contrôle immunitaire anti-tumoral.

TIM-3 a également été rapporté comme un marqueur d'exhaustion (épuisement) des lymphocytes T CD4 follicular helper, avec une fréquente co-expression de PD-1 (51).

Des données préliminaires (52) montrent que les lymphocytes CD4 infiltrants les tumeurs pourraient être définis par un haut niveau d'expression de PD-1 et de CD39. Contrairement aux lymphocytes CD8, l'épuisement des lymphocytes CD4 s'installerait indépendamment de TIM-3. Un traitement par anti-PD-1 permet, *in vitro*, d'activer ces lymphocytes, permettant d'améliorer la maturation des cellules dendritiques et par conséquence une plus importante prolifération des lymphocytes CD8 spécifiques de la tumeur.

Enfin, des données *in vitro* montrent que le blocage d'un autre point de contrôle secondaire, TIGIT, majore l'effet anti-tumoral immunitaire contre des lignées de cellules de cancer du sein (53).

D3- Valeur pronostique du microenvironnement tumoral immun dans les CSTN

1) TILs : valeur pronostique

Actuellement, l'évaluation du nombre de TILs dans les tumeurs mammaires peut être réalisée selon une méthode décrite par Salgado et al. en 2015 (54) et mise à jour par Dieci et al. en 2018 (55). Cette méthode constitue la référence pour le compte des TILs par les anatomopathologistes.

Des TILS sont souvent présents dans les CSTN, ce qui en fait une tumeur d'intérêt pour le développement de traitement par immunothérapies (7). **Une revue systématique de la littérature, réalisée par S. E. Stanton et al., incluant 15 études (13 914 patientes),** a montré que c'est dans les CSTN qu'il existe la plus importante proportion de tumeurs mammaires fortement infiltrées en TILs, contrairement aux tumeurs RH positives/HER2 négatives qui en ont une faible proportion. Les tumeurs HER2 positives en ont un niveau intermédiaire par rapport aux autre types de cancers du sein (56).

Mais s'il existe un consensus pour la quantification des TILs, il n'y a cependant pas de standard pour la définition d'une tumeur faiblement ou fortement infiltrée en TILs. Les différentes études utilisent des seuils souvent arbitraires : 30% (57,58), 50% (59) ou 60% (60), ou dans d'autres études, les TILs sont utilisés comme une variable continue (57,58,60,61).
Ceci pose des problèmes pour l'utilisation des TILs pour définir le pronostic ou pour prédire la RHC. Il n'est pas établi si les TILs doivent être utilisés comme un marqueur continu (comme pour le Ki67), ou bien avec un seuil défini. Ceci explique que le compte des TILs ne soit actuellement pas utilisé pour la décision thérapeutique en routine.

Si la densité de TILs est un facteur de bon pronostic, **la répartition** joue également un rôle important. En effet, une répartition diffuse des TILs dans les CSTN est un facteur de bon pronostic également (par rapport à une répartition hétérogène, ou uniquement périphérique par exemple) (62).

L'organisation des lymphocytes dans la tumeur, **en structure lymphoïdes tertiaires**, est un élément qui semble positivement corrélé avec la densité d'infiltration lymphocytaire dans la tumeur (densité de TILs), mais son impact propre sur le pronostic, tout comme la réponse au traitement, n'est pas connu pour les cancers du sein (63).

De façon intéressante, il a également été montré qu'il existe une plus forte densité de TILs dans les biopsies de cancer du sein chez les patientes fumeuses, que chez les patientes non ou peu fumeuses. Les patientes fumeuses avaient un taux plus élevé de RHC après chimiothérapie néo-adjuvante, mais la survie sans rechute et la survie globale n'étaient pas différentes (64).

En situation adjuvante :

Dans l'étude de M. V. Dieci et al. (57)**,** les auteurs ont étudié les TILs, PD-L1, CD8 et Foxp3 chez 244 patientes avec un CSTN localisé, ayant reçu une chimiothérapie adjuvante (n = 145) ou néo-adjuvante (n = 99).
Les TILs étaient significativement associés à une amélioration de la survie sans maladie (SSM), avec un HR = 0,81 (p = 0,006) pour chaque augmentation de 10% des TILS. Les patientes avec plus de 30% de TILs avaient une SSM à 5 ans à 89,5% contre 70% pour les patientes avec ≤ 30% de TILs (p = 0,002). PD-L1 (évalué sur les cellules stromales) était également un facteur de bon pronostic, en utilisant un seuil à 21%. En effet, les patientes avec un PD-L1 > 21% avaient une SSM à 5 ans de 87,1% contre 70,3% si ≤ 21%.
Concernant les patientes ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante, l'augmentation des TILs sur la microbiopsie (par tranche de 10%) était associé à une augmentation de la RHC. Concernant la SSM, elle était meilleure en cas d'augmentation des TILs, de TILs élevés (> 30%) et de PD-L1 élevé.
Concernant les patientes n'ayant pas une RHC après chimiothérapie néo-adjuvante (72 patientes), il y avait une augmentation significative de PD-L1 en post chimiothérapie par rapport en pré-chimiothérapie. Une augmentation des TILs était associée à une meilleure SSM.

Plusieurs autres études ont confirmé le bon pronostic des TILs en situation adjuvante (58,59,65).

Dans la méta-analyse de S. Loi et al. (58)**, les données de 2148 patientes avec un CSTN issues de 9 études de chimiothérapie adjuvante ont été collectées.** Chaque augmentation de 10% des TILs était significativement associée à une amélioration de la survie sans maladie invasive (HR 0,87), de la survie sans maladie à distance (HR 0,83) et de la survie globale (HR 0,84). La médiane des TILs était de 15%. Le bon pronostic des TILs était également retrouvé de façon significative en prenant un seuil à 30% (≥ 30% de TILs).

Concernant les tumeurs HER2-positives, le pourcentage de TILs avant chimiothérapie adjuvante a également été décrit comme indépendamment associé à une meilleure survie sans rechute à distance. La survie à 5 ans sans rechute à distance était ainsi de 91,1% pour les patients avec moins de 20% de TILs, contre 95,7% pour ceux avec 20% ou plus de TILs (p = 0.025) (66).

En situation de néo-adjuvante :

Une large étude récente, conduite par C. Denkert et al. (60)**,** a confirmé le bon pronostic des TILs évalués sur la biopsie avant chimiothérapie néo-adjuvante. L'analyse compilée de 6 larges essais cliniques randomisés de chimiothérapie néo-adjuvante, regroupant 3771 patientes (dont 906 CSTN), a confirmé une amélioration de la SSM pour les CSTN pour chaque augmentation

des TILs par tranche de 10% (HR 0,93, p = 0,011). Il existait également une amélioration de la survie globale (HR 0,92, p = 0,032). L'augmentation des TILs était également corrélée à une augmentation du taux de RHC à la chimiothérapie néo-adjuvante, pour les patientes ayant un fort infiltrat en TILs (≥ 60 %), avec un taux de RHC de 50% contre 31% (p < 0.001).

Une signature génétique a été développée dans les CSTN pour prédire à partir de la tumeur initiale chez quelles patientes sera obtenu un enrichissement en TILs dans la tumeur résiduelle après chimiothérapie néo-adjuvante à base d'anthracyclines, dans une population non en RHC. Cette signature était associée à un bon pronostic (réduction de la survie sans rechute à distance) (67).

Pour les patientes ayant un CSTN, chez qui une RHC n'a pas été obtenu par une chimiothérapie néoadjuvante, un nombre élevé de TILs au sein de la tumeur résiduelle est un facteur de bon pronostic (68), permettant d'affiner le pronostic à partir de la classification RCB (en particulier pour les classes RCB-II et RCB-III) (69), aussi bien pour la survie sans rechute à distance que pour la survie globale (70).

L'étude de V. Pelekanou et al. (71), publiée en 2017, s'est intéressé aux modifications du micro-environnement immun induites par la chimiothérapie néo-adjuvante et leur impact sur le pronostic. Cinquante-huit patientes ont été incluses (les patientes avec une RHC ont été exclues). Il a été réalisé un compte des TILs dans le stroma et un marquage de PD-L1. Près de 80% des patientes avaient une tumeur qui exprimaient les récepteurs hormonaux, et 20,6% une tumeur HER2+. Une augmentation du nombre de TILs après chimiothérapie était significativement associée avec une meilleure survie sans rechute (HR = 3,9 ; IC = 1,17-15,39). On observe également une diminution significative de l'expression de PD-L1 (stromal et tumoral) après la chimiothérapie, mais sans impact sur le pronostic.

<u>Au total,</u> de nombreuses études et de larges méta-analyses ont confirmé le rôle pronostic favorable d'un fort infiltrat en TILs, que ce soit en situation adjuvante ou néo-adjuvante (avant ou après chimiothérapie), avec une amélioration du taux de RHC, de la SSM et de la survie globale (SG).
Cependant, il n'est pas clairement défini si les TILs doivent être utilisés comme un marqueur continu, ou avec un seuil (30 ou 60 % par exemple).

2) Sous-types de TILs : valeur pronostique

La présence d'un fort infiltrat en lymphocytes **T CD8** est associée à une meilleure survie spécifique si l'on considère l'ensemble des cancers du sein localisés (72). Plus spécifiquement, dans les CSTN de stade localisé, un faible infiltrat en TILs ou en CD8+ est un facteur indépendant de plus forte mortalité alors qu'une proportion élevée de CD8+ parmi les TILs est associée à une meilleure survie (73).

Tsiatas et al. ont quantifié l'expression de CD3 et de CD8 par qRT-PCR et étudié leur association avec la survie sans maladie dans les cancers du sein. En analyse univariée, une forte expression de l'ARNm CD3 et CD8 était associée à une augmentation de la survie sans maladie ($p = 0,007$ et $p = 0,016$ respectivement). Mais, en analyse multivariée, seule l'expression élevée de l'ARNm CD8 est associée significativement à une augmentation de la survie sans maladie ($HR = 0,77$, $p = 0,048$) (74).

Si les lymphocytes T CD8 sont associés à un bon pronostic, ce n'est pas le cas de tous les lymphocytes T CD4 : en effet, certains sont associés à un bon pronostic (lymphocytes Th1), et d'autres sont associés à un pronostic variable selon les études (parfois considérés comme de bon, de mauvais ou sans incidence sur le pronostic) : lymphocytes Th2, Th17 et Treg (T régulateurs) (75). Après chimiothérapie néo-adjuvante, les lymphocytes CD4 semblent être associés à un bon pronostic (69).

Certaines sous-populations de lymphocytes CD4, comme les lymphocytes CD4 follicular helper CXCL13+ (impliqués dans le développement des centres germinatifs et la maturation des lymphocytes B spécifiques de l'antigènes en cellules mémoires sécrétrices d'anticorps), sont associées à un meilleur pronostic et à une meilleure réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante (76,77).

En cas de chirurgie d'emblée, le ratio CD8+/Foxp3+ dans la tumeur est significativement plus élevé chez les patientes qui n'ont pas de métastases ganglionnaires, et qui ont un stade tumoral plus précoce (stade IA versus stade II ou III) (78).

Il a été rapporté qu'un taux élevé de lymphocytes T régulateurs (Treg) est associé à un grade tumoral plus élevé et à la négativité d'expression des récepteurs aux œstrogènes. De plus, il a été montré une corrélation positive avec l'expression d'HER2 et un phénotype basal. En analyse univariée, un taux élevé de cellules Treg est associé à un plus mauvais pronostic selon Mahmoud et al. (mais pas en analyse multivariée) (79). Le pronostic péjoratif lié à une forte infiltration en lymphocytes Treg a également été rapporté dans une étude publiée par Bates et al., où un fort infiltrat en lymphocytes Foxp3+ était associé à une survie sans rechute et une survie globale plus courtes (80). Enfin, une méta analyse a été réalisée retrouvant qu'un infiltrat élevé en TILs Foxp3+ était associé à une survie globale moins bonne, à un statut HER2 positif, à

la présence de métastases ganglionnaires et à une négativité d'expression des récepteurs hormonaux dans les cancers du sein (81).

Le rôle des lymphocytes B n'a été que peu exploré, mais pourrait avoir un rôle anti-tumoral également (82,83). Ces lymphocytes B se localiseraient dans les structures lymphoïdes tertiaires au sein des tumeurs (83). Une étude a notamment montré qu'une infiltration élevée par des lymphocytes B était associée à une meilleure survie spécifique et une meilleure survie sans maladie pour les cancers du sein localisés (84).

Il a par ailleurs été montré qu'un fort infiltrat en CD8 et faible en Foxp3 (**rapport CD8/Foxp3 élevé**) après chimiothérapie néo-adjuvante pour un cancer du sein était significativement associé à un taux plus élevé de RHC ($p < 0.0001$), à une meilleure survie sans rechute ($p = 0,02$) et à une meilleure survie globale ($p = 0,002$) (85).

Dans l'étude de M.Miyashita et al., publiée en 2015, les modifications du microenvironnement immun (marqueurs CD8 et Foxp3) induites par la chimiothérapie néo-adjuvante (à base d'anthracycline et de taxane) ont été analysé chez 131 patientes. Les marquages ont été effectués chez celles n'ayant pas obtenu une RHC (101 patientes, dont 78 paires biopsie et pièce opératoire). Un nombre élevé de CD8+ et un ratio élevé CD8+/Foxp3+ après la chimiothérapie étaient significativement associés à une meilleure réponse à la chimiothérapie (score RCB plus faible), à une meilleure survie spécifique et à une meilleure survie sans rechute. En analyse multivariée, CD8+ et le rapport CD8+/Foxp3+ étaient des marqueurs indépendants de meilleure survie sans rechute, et de survie spécifique pour CD8. Enfin, chez les patientes qui avait un taux élevé de modification de CD8 et du ratio CD8+/Foxp3+ comparativement avant et après la chimiothérapie (une forte augmentation), la survie sans rechute était significativement meilleure, et pour le rapport CD8+/Foxp3+ la survie spécifique était meilleure également (86).

<u>Au total</u>, les lymphocytes CD8 et CD4 (de type helper) semblent associés à un bon pronostic, alors que les lymphocytes CD4 Foxp3+ (lymphocytes Treg) semblent associés à un mauvais pronostic. Le ratio CD8+/Foxp3+ peut être utilisé, permettant de rendre compte de ces deux populations lymphocytaires.

3) PD-L1 : valeur pronostique

Pour PD-L1, contrairement au TILs, il n'y a pas de méthode consensuelle pour évaluer ce marqueur pour les cancers du sein. Selon les études, il peut être évalué sur les cellules tumorales, sur les cellules immunes ou sur les deux. Plusieurs anticorps peuvent être utilisés, aucun d'entre eux ne faisant référence, et plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour la quantification (pourcentage de cellules marquées, détermination d'un score combiné comme le CPS « Combined Positive Score », ou encore par analyse semi-quantitative en classes de

positivité). Enfin, il n'y a pas de seuil de positivité clairement établi, mais le seuil de positivité le plus communément utilisé est de 1%.
Ainsi, la comparaison entre les différentes études doit être réalisée avec précaution.

L'expression de PD-L1, le plus souvent évaluée en immunohistochimie (IHC), est hétérogène dans les cancers du sein. Elle est associée à l'existence de caractéristiques histo-cliniques défavorables tels qu'un grade tumoral élevé, la négativité d'expression des récepteurs aux œstrogènes, un phénotype triple négatif et un envahissement ganglionnaire métastatique plus fréquent (87)**.** La corrélation de PD-L1 avec un index de prolifération élevé et des sous-types plus proliférants pourrait s'expliquer par une charge mutationnelle plus importante des cellules tumorales hyperproliférantes, potentiellement responsable d'une immunogénicité plus forte par apparition rapide de néo-antigènes. À noter également que les lignées cellulaires de cancers du sein basales ou mésenchymales surexpriment plus fréquemment PD-L1 que les lignées luminales (88). **Du fait de cette association avec des critères clinico-pathologiques défavorables, la méta-analyse de M. Zhang et al. montre que l'expression de PD-L1 est associée à un pronostic plus défavorable en terme de survie globale pour les cancers du sein dans leur ensemble (HR = 1,76, p = 0,02)** (87).

Malgré les différences en termes d'évaluation de PD-L1, sa positivité semble de bon pronostic dans les CSTN :

- Deux études rapportent qu'une proportion élevée (> 50%) de TILs PD-L1+ (PD-L1 ≥ 1%) est associé avec une meilleure survie chez les patientes ayant un CSTN. Chez ces dernières, la présence de TILs et l'expression de PD-L1 ne semblent pas corrélés au statut BRCA1/2 muté, ni à la charge mutationnelle (89,90).

- Une étude montre qu'un nombre élevé de cellules immunitaires PD-1+ dans la tumeur serait un facteur de bon pronostic en cas de chimiothérapie adjuvante (à noter qu'un infiltrat élevé en TILs est corrélé à une forte expression en PD-1 sur les cellules immunes et en PD-L1 sur les cellules immunes et les cellules tumorales) (91).

- Une étude montre que l'expression de PD-L1, évaluée par une autre méthode (quantité de ARNm PD-L1), est également associée de façon significative avec un plus grand nombre de TILs, et une meilleure survie sans rechute (92).

<u>Au total,</u> dans les cancers du sein triple négatifs, PD-L1 serait associé à un meilleur pronostic. Cela pourrait s'expliquer par la corrélation avec le nombre de TILs.

4) PCI secondaires : valeur pronostique :

Bottai et al ont réalisé les marquages de certains PCI sur les TILs de CSTN rapportant que 30% des patientes ont une tumeur PD-L1 positive (≥ 5% des TILs PD-L1+), 18% LAG-3 positive (≥ 5% des TILs LAG-3+), et que 15.4% ont des tumeurs positives pour les 2. Cependant, leur expression n'était pas corrélée au pronostic (93).

Le PCI TIM-3 (T-Cell immunoglubulin and mucin domain-containing molecule 3) et son ligand Galectin-9 sont plus souvent exprimés par les tumeurs du sein que dans le tissu mammaire sain, indiquant sa probable implication dans l'inhibition de la réponse immune anti-tumorale (94). Une première étude rapporte que TIM-3 exprimé par les TILs intra-tumoraux (avant traitement systémique) est un facteur indépendant de bon pronostic dans le cancer du sein localisé, en particulier RE-négatif (95). En 2018, Kyung Do Byun et al. (96) ont étudié l'expression de TIM-3 comme facteur pronostic dans une cohorte de 109 CSTN localisés, avant traitement systémique. Une forte expression de TIM-3 était significativement associée à un âge plus jeune, à un stade tumoral plus avancé, à une infiltration plus forte en TILs, à une expression plus importante de PD-L1 sur les cellules tumorales et de PD-1 par les TILs. **Dans cette étude, les patientes ayant une tumeur avec une forte expression de TIM-3 avaient significativement un meilleur pronostic en termes de survie sans maladie et de survie globale.** C'était également le cas pour les patientes avec un niveau élevé de TILs et de PD-1, mais cela n'était pas significatif pour PD-L1 (malgré une tendance en faveur d'un meilleur pronostic). En analyse multivariée, TIM-3 restait significativement associé de façon indépendante à une meilleure survie sans maladie et une meilleure survie globale (alors que les TILs, PD-1 et PD-L1 ne l'étaient plus). Cette étude souligne l'intérêt pronostic de TIM-3 dans les CSTN localisés.

La présence d'un infiltrat en TILs **LAG-3 positifs** (≥ 1 cellule marquée/0.3 mm^2) intra-tumoral serait également un facteur de bon pronostic dans les cancers du sein, en particulier chez ceux n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes (97).

Au total, les PCI TIM-3 et LAG-3, évalués avant chimiothérapie, pourraient être associés à un bon pronostic dans les CSTN.

En synthèse :
- Les TILs sont associés de façon démontrée à un bon pronostic dans les CSTN.
- Certains marqueurs seraient associés à un bon pronostic : PD-L1, CD8, CD4 (Th), TIM-3 et LAG-3
- Un marqueur serait associé à un mauvais pronostic : Foxp3 (Treg)

D4- Valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante du microenvironnement tumoral immun dans les CSTN

1) TILs : valeur prédictive :

Un micro-environnement tumoral riche en TILs, constitue un facteur prédictif de RHC à la chimiothérapie néo-adjuvante dans les cancers du sein (60,98,99) et plus particulièrement pour ceux de phénotype triple négatifs et HER2 positifs (100,101).

Dans une méta-analyse publiée en 2014 par Y. Mao et al. (102)**, incluant 13 études, regroupant 3251 patientes,** un pourcentage élevé de TILs sur la biopsie réalisée avant la chimiothérapie néo-adjuvante était un facteur prédictif indépendant d'un taux plus élevé de RHC en analyse multivariée (OR = 1,41, 95% IC 1,19-1,66) pour l'ensemble des cancers du sein, qu'il soit étudié dans le stroma, dans la tumeur, ou dans les deux. Concernant les différents sous-types de cancers du sein, un pourcentage élevé de TILs était significativement prédictif de la RHC pour les CSTN (OR = 2,49, 95% IC 1,61-3,83) et pour les tumeurs HER2+ (OR = 5,05, 95% IC 2,86-8,92), mais pas pour les tumeurs exprimant le récepteur aux œstrogènes (OR = 6,21, 95% IC 0,86-45,15).

Dans un article publié en 2018 par V. Pelekanou et al. (61), les auteurs ont analysé une cohorte de cancers du sein localement avancés HER2 négatifs, traités par chimiothérapie néo-adjuvante (comprenant du nab-paclitaxel, de la doxorubicine, du cyclophosphamide, et pour la moitié d'entre eux du bevacizumab) et étudié plusieurs éléments : l'association entre le nombre de TILs et l'expression de PD-L1 avant chimiothérapie et la RHC, les modifications du nombre de TILs et d'expression de PD-L1 induites par la chimiothérapie et enfin l'association entre ces marqueurs immunitaires et la survie sans évènement et la survie globale. Cent trente-quatre biopsies avant chimiothérapie étaient disponibles, et 63 pièces opératoires post chimiothérapie, comprenant 59 paires (biopsie et pièce opératoire pour la même patiente). Le compte des TILs a pu être effectué sur 59 paires, mais le marquage PD-L1 (anticorps 22C3) uniquement sur 39 paires. Parmi la cohorte, 30,6% des patientes avaient un CSTN et 69,4% une tumeur qui exprimaient au minimum l'un des récepteurs hormonaux (RE+ et/ou RP+). Les principaux enseignements de cette étude ont les suivants :

- Un nombre plus élevé de TILs (évalué comme une variable continue) et une expression positive (≥ 1% des cellules tumorales et/ou stromales) ou plus élevée (selon une variable continue) de PD-L1 avant la chimiothérapie étaient significativement associés au taux de RHC, mais n'étaient pas associés à la survie sans évènement, ni à la survie globale (avec les limites du petit nombre de patients).

- Il existait une baisse moyenne de 15% du nombre de TILs après chimiothérapie, mais l'expression de PD-L1 restait stable.
- La variation du nombre de TILs et de l'expression de PD-L1 n'était pas associée au taux de RHC.

Cette étude suggère donc que le nombre de TILs et l'expression initiale de PD-L1 sont importants pour prédire la RHC.

Dans un article publié en 2016, C. A. Castaneda et al. (103) ont étudié les variations du micro-environnement immun induites par la chimiothérapie néo-adjuvante (taxane, adriamycine et cyclophosphamide) chez 98 patientes ayant un CSTN (nombre de paires non précisé). Ils ont quantifié le nombre de TILs, et ont réalisé les immunomarquages suivants : CD3, CD4, CD8 et Foxp3. Les principaux messages sont les suivants :

- Un pourcentage plus élevé de TILs avant chimiothérapie était là encore significativement associé, en analyse univariée, au taux de RHC (40% vs 30%), à la survie sans maladie (40% vs 20%) et à la survie globale (40% vs 30%).
- Il existait (comme dans l'étude précédemment citée) une diminution significative de la médiane du pourcentage de TILs après chimiothérapie (-20 %) mais il n'y avait pas de corrélation entre la variation de TILs et la RHC.
- Il n'a pas été constaté de variation significative de l'expression des différents sous-types de marqueurs immunologiques après la chimiothérapie (CD3, CD4, CD8 et Foxp3).
- Un nombre plus élevé de CD3, CD4, CD8 et Foxp3 avant chimiothérapie était associé à une survie sans maladie plus longue, et pour CD3 une meilleure survie globale.
- Le nombre plus élevé de CD4 après chimiothérapie était associé à la RHC, ainsi qu'un ratio plus élevé CD8/CD4 avant et après la chimiothérapie.
- Un ratio plus élevé CD4/Foxp3 avant la chimiothérapie était associé avec une survie sans maladie plus longue.
- Enfin, un ratio plus élevé CD4/Foxp3 et CD4/CD3 après la chimiothérapie était associé à la RHC.

Cette étude montre elle aussi le rôle prédictif, mais aussi le rôle pronostique du nombre de TILs avant la chimiothérapie néo-adjuvante dans les CSTN.

H. Lee et al., dans un article publié en 2020 (104), se sont intéressés aux modifications de l'infiltrat en TILs induites pas la chimiothérapie néo-adjuvante dans les CSTN. Une évaluation des TILs a été réalisée sur 157 biopsies et sur 104 pièces opératoires (évaluation uniquement pour les patientes non en RHC). Les conclusions sont les suivantes :

- Là encore, **en pré-chimiothérapie, l'infiltrat en TILs était significativement plus important pour les patientes qui ont ensuite obtenu une RHC, et la survie sans maladie était meilleure. De même, un infiltrat plus important en TILs après la chimiothérapie était associé à une meilleure survie sans maladie.**
- Une modification de l'infiltrat en TILs (augmentation ou diminution) était significativement associée à un meilleur pronostic (meilleure survie sans maladie) que l'absence de changement (stabilité du nombre de TILs). On observait dans le groupe avec une augmentation du nombre de TILs une meilleure survie sans maladie par rapport au groupe avec une diminution du nombre de TILs, mais de façon non significative.

Une densité élevée de TILs et le statut HRD (Déficit de Recombinaison Homologue), sont associés à une meilleure réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante. Toutefois, la densité de TILs n'est pas associée au statut HRD, suggérant que ces biomarqueurs doivent être étudiés séparément (90).

<u>Au total,</u> un important infiltrat en TILs est pour les cancers du sein au stade précoce (en particulier TN et HER2 positifs) un facteur de <u>bon pronostic</u> et prédictif d'une <u>bonne réponse</u> à la chimiothérapie néo-adjuvante (105).

2) <u>Sous-types de TILs : valeur prédictive</u>

Dans une étude publiée en 2016, un ratio élevé de lymphocytes T CD8+/lymphocytes T Foxp3+ (Treg) sur la biopsie était significativement associé à un taux plus élevé de RHC (106). C'est également la conclusion de l'étude de M. Miyashita et al. où le ratio CD8+/Foxp3+, associé à un Ki67 élevé, semblait fortement prédictif d'une RHC (107).

L'impact positif sur la RHC d'un fort infiltrat en lymphocytes CD8+ semble perdu si la tumeur n'exprime que faiblement ou a perdu l'expression de l'HLA de classe 1 (qui permet la présentation de l'antigène aux cellules CD8+) (108).

Dans un article publié en 2019, A. G. Waks et al. (109) ont étudié les modifications du microenvironnement immunitaire induites par la chimiothérapie néo-adjuvante (adriamycine, cyclophosphamide et paclitaxel) dans une cohorte de cancers du sein RH+/HER2-. Environ la

moitié des patientes avaient également reçu du bevacizumab. Un marquage CD8, CD68 (marqueur macrophagique) et PD-L1 a été réalisé en IHC, et un compte des TILs a été effectué dans le stroma. Quatre-vingt-seize patientes ont été incluses, presque toutes n'ayant pas obtenues une RHC après la chimiothérapie. Les enseignements sont les suivants :

- Tous les biomarqueurs immuns étudiés étaient corrélés à un meilleur score de réponse à la chimiothérapie (score RCB).
- En revanche, le score RCB n'était pas corrélé aux modifications des biomarqueurs avant et après chimiothérapie.
- Les biomarqueurs étudiés n'étaient pas corrélés à la survie sans maladie.
- Concernant les modifications après la chimiothérapie néo-adjuvante (étudiés uniquement chez les patientes ayant reçu du bevacizumab), il était constaté une diminution significative après la chimiothérapie du nombre de TILs dans le stroma et de lymphocytes T CD8+ ainsi qu'une tendance non significative à la diminution pour PD-L1 sur les cellules tumorales et pas de modification pour CD68.

Une étude de l'expression génique (étude de l'expression de l'ARN) chez l'ensemble des patientes a également été réalisée pour étudier les différents types de macrophages : après la chimiothérapie, il y avait une augmentation d'expression des gènes associés aux macrophages de type M2. L'étude de signatures immunologiques (signatures d'expression génique) montrait quant à elle, une diminution de la signature associée aux lymphocytes T régulateurs, et une augmentation des signatures pour les macrophages, les cellules dendritiques ainsi que les cellules myéloïdes après la chimiothérapie. **Cette étude suggère donc un rôle des cellules immunosuppressives du micro-environnement tumoral dans la chimio-résistance des tumeurs RH+/HER2**-.

Dans l'étude de Sylvain Ladoire et al., publiée en 2008 (110), 56 patientes avec un cancer du sein localisé ont été incluses. Les patientes ont reçu une chimiothérapie néo-adjuvante (chimiothérapie à base d'anthracycline et de trastuzumab pour les tumeurs HER2+). Un marquage CD3, CD8 et Foxp3 a été réalisé avant et après chimiothérapie.

- Une expression élevée de CD8 avant et après la chimiothérapie était associée à un taux plus élevé de RHC.
- Une expression plus faible de Foxp3 après la chimiothérapie était également associée à un taux plus élevé de RHC.
- Les patientes répondeuses (en RHC) étaient caractérisées par une diminution après la chimiothérapie de Foxp3 et une augmentation du ratio CD8/Foxp3 (par rapport à l'expression avant la chimiothérapie), alors que les patientes non répondeuses avaient une expression stable de Foxp3 et du ratio CD8/Foxp3.

Enfin, Y. Hou et al., dans une étude publiée en 2018 (111), se sont intéressés aux cancers du sein HER2+. L'étude a inclu 64 patientes ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante avec traitement anti-HER2, et un marquage PD-L1, CD8 et CD163 a été réalisé sur les biopsies pré-chimiothérapie. En analyse multivariée, il existait un taux de RHC significativement plus élevé pour les tumeurs infiltrées en CD8.

Au total, les CD8 semblent être prédictifs de la RHC pour les cancers du sein traités par chimiothérapie néo-adjuvante.

3) PD-L1 : valeur prédictive

Il existe une corrélation entre l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et l'expression de PD-1 par les TILs. L'expression de PD-L1 et celle de PD-1 sont toutes deux significativement corrélées à une infiltration plus importante en TILs, et à un taux plus élevé de RHC (112,113).

Dans l'étude de Y. Asano et al., publiée en 2018, 177 patientes ayant un cancer du sein localisé traitées par chimiothérapie néo-adjuvante ont été incluses (schéma séquentiel : 4 cycles de FEC100 puis 12 injections de paclitaxel hebdomadaires avec +/- trastuzumab si tumeur HER2+). Les tumeurs ont été marquées avec PD-1, PD-L1 et PD-L2 sur les biopsies avant la chimiothérapie. Parmi les patientes, 61 avaient une tumeur de phénotype triple négatif. Pour ces patientes, les auteurs ont observé un taux significativement plus faible de RHC, et une survie sans maladie plus courte, en cas d'expression élevée de PD-1 et PD-L1 au niveau de la tumeur primitive. En analyse multivariée, seul PD-L1 était un facteur pronostic indépendant de survie sans maladie. **Cette étude suggère qu'une expression élevée de PD-1 et de PD-L1 avant la chimiothérapie néo-adjuvante est un facteur prédictif de mauvaise réponse à la chimiothérapie, et un facteur de mauvais pronostic**. A noter que l'expression de PD-L1 a été évalué sur les cellules tumorales (avec le clone 27A2) (114).

A l'inverse, dans l'étude de H. Wimberly et al., publiée en 2015, qui portait sur 94 biopsies de patientes (tout phénotype immunohistochimique confondu) avant chimiothérapie néo-adjuvante, PD-L1 (évalué sur les cellules tumorales et les cellules stromales) était prédictif de la RHC (115).

Deux études plus récentes se sont intéressées à la question et ont été communiquées sous forme de poster lors de l'ASCO 2020 :

A) Dans un 1er poster présenté par G. Bianchini et al. (116), les CSTN PD-L1 positifs (IC ≥ 1 % en IHC) avaient un taux de RHC significativement supérieur (54,7 vs 32,5 %, p = 0,004), et ceci restait significatif après ajustement sur le taux de TILs dans le stroma.

B) De façon intéressante, dans un autre poster présenté par C. Yam et al. (117), 4 éléments évalués sur la biopsie prétraitement étaient associés significativement à la RHC :

- la positivité de PD-L1 (IC ≥ 1 % en IHC),
- une plus grande clonalité du répertoire des lymphocytes T,
- une plus grande proximité des lymphocytes T avec les cellules tumorales,
- et enfin un ratio lymphocytes T (CD3+) sur macrophages (CD68+) plus important.

<u>Au total,</u> PD-L1 (évalué sur les cellules <u>immunes</u> dans le stroma) semble prédictif de la RHC dans les CSTN.

4) <u>PCI secondaires : valeur prédictive</u>

La valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante n'a pas été évaluée pour les PCI secondaires (comme TIM-3 et LAG-3).

<u>En synthèse,</u> les facteurs suivants sont associés à une meilleure réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante (association à la RHC) :

- **Un infiltrat important en TILs**
- **Un infiltrat important en lymphocytes CD8+ et faible en lymphocytes Foxp3+ (ratio CD8+/Foxp3+ élevé)**
- **La positivité de PD-L1 (lorsqu'elle est évaluée sur les cellules <u>immunes</u> dans le stroma)**

D5- Effets immunogènes des cytotoxiques et des thérapies ciblées dans les cancers du sein

La réduction de la masse tumorale par la chimiothérapie peut avoir deux effets favorisant la réponse immune anti-tumorale : d'abord la réduction de l'immuno-suppression induite par la tumeur et ensuite, la libération d'antigènes tumoraux. De plus, certains agents ont montré des capacités plus spécifiques d'immuno-modulation, comme l'augmentation de la présentation antigénique, l'activation de l'immunité anti-tumorale, ou encore l'inhibition de mécanismes immunosuppressifs (44).

La chimiothérapie est une thérapie systémique avec des effets secondaires lympho / myélo-ablatifs. Cependant, au cours des dix dernières années, il est devenu clair que les cytotoxiques qui entraînent la mort des cellules tumorales peuvent différer dans leur capacité à fournir des signaux immunogènes.

Certaines chimiothérapies induisent les cellules tumorales mourantes à exposer des chaperons moléculaires immunogènes à la surface des cellules (telle que la calréticuline) et à libérer des médiateurs immunogènes solubles (tels que HMGB1) qui attirent et activent les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) pour une présentation croisée efficace aux lymphocytes T des antigènes tumoraux. L'effet de la chimiothérapie en détruisant directement la tumeur de manière immunogène peut conduire à une vaccination *in vivo*, qui peut être renforcée par les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires (IPCI) (figure 7). En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que l'oxaliplatine, le cyclophosphamide, la doxorubicine et le paclitaxel, qui ont tous démontré ces caractéristiques immunogènes, potentialisent l'activité du blocage des PCI dans plusieurs modèles de tumeurs précliniques de souris. La FDA a récemment approuvé l'utilisation du pembrolizumab en association avec la chimiothérapie pour le traitement de première ligne du le carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC) (44).

La chimiothérapie a aussi la capacité d'augmenter la libération d'antigènes tumoraux, et donc d'augmenter l'immunogénicité des tumeurs (Figure 7).

Dans le CSTN, il a été montré dans des modèles murins que la chimiothérapie pouvait avoir une influence sur les cellules immunitaires circulantes, mais aussi sur les cellules immunitaires intra-tumorales (118).

Une partie de l'effet anti-tumoral des anthracyclines est dû à l'induction de la réponse immunitaire innée et de la réponse lymphocytaire T anti-tumorale, via notamment la production d'interféron de type 1 par les cellules tumorales, suite à l'activation du TLR3 (Toll-like receptor 3), conduisant au relargage de chemokine CXCL10 par les cellules tumorales (119) (Figure 7).

Le paclitaxel, l'étoposide et le 5-Fluorouracile ont été décrits comme pouvant induire l'expression de PD-L1 à la surface des cellules de cancer du sein (120). Le docétaxel (dans le cancer du sein et de prostate métastatiques) et l'association cisplatine + vinorelbine (dans le

cancer du poumon non à petites cellules) ont montré une capacité à augmenter significativement le ratio entre lymphocytes T effecteurs et lymphocytes T régulateurs, et à réduire l'activité immunosuppressive des lymphocytes T régulateurs (121).

Les chimiothérapies peuvent également moduler la réponse immunitaire anti-tumorale, par des mécanismes distincts de la mort cellulaire immunogène, via notamment : l'augmentation de l'activation des cellules dendritiques, l'augmentation de la présentation antigénique, la réduction de l'activité des cellules immunosuppressives (comme les lymphocytes Treg et les MDSC) (Figure 8).

Certaines thérapies ciblées, utilisées dans le cancer du sein, sont également intéressantes, comme les inhibiteurs de CDK4/6, qui ont montré qu'ils permettaient le recrutement des TILs dans le contexte néo-adjuvant, ou encore les inhibiteurs de PARP, qui ont montré leur capacité à augmenter l'expression de PD-L1 sur des modèles de cancers du sein (122).

Des points de contrôle immunitaire secondaires, comme TIM-3, pourraient permettre d'augmenter la réponse à la chimiothérapie. En effet, les cellules dendritiques intra-tumorales expriment fortement TIM-3, et dans un modèle murin de cancer du sein, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-TIM-3, en combinaison avec une chimiothérapie par paclitaxel, permet d'augmenter la fonction des lymphocytes T CD8+ (via l'augmentation d'expression de CXCL9 par les cellules dendritiques), et ainsi d'augmenter l'efficacité du paclitaxel (123).

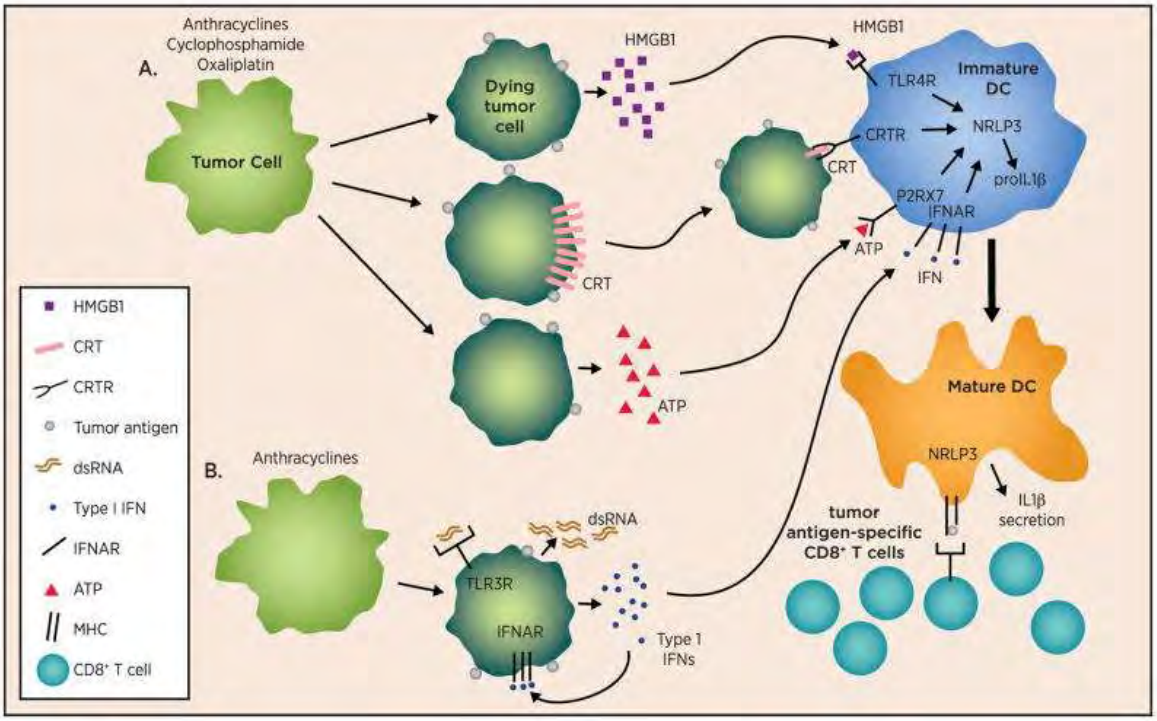

Figure 7 - Mécanismes de mort immunogène des cellules tumorales induite par la chimiothérapie (d'après L. A. Emens et G. Middleton (124))

Certains agents de chimiothérapie peuvent provoquer la mort cellulaire immunogène par diverses voies : (A) Les anthracyclines, le cyclophosphamide et l'oxaliplatine induisent la mort immunogène des cellules par la libération d'antigènes tumoraux, la translocation de la CRT (un signal pour la phagocytose par les DC) à la surface cellulaire et la sécrétion des molécules associées au danger HMGB1 et ATP (un signal de recherche de phagocytose par les DC). Ces molécules associées à la mort cellulaire se lient à leurs récepteurs respectifs, le récepteur de la calréticuline (CRTR), le récepteur TLR4 (TLR4R) et le récepteur P2RX7. Cela entraîne l'activation de l'inflammasome NRLP3, la production de pro-IL1β, la maturation des DC et la sécrétion d'IL1β pour soutenir l'évolution des cellules T CD8 + spécifiques de la tumeur. (B) La mort des cellules tumorales induite par les anthracylines entraîne la libération d'ARNdb, qui se lie au TLR3 et entraîne la sécrétion autonome par les cellules tumorales des IFN de type I. Cette voie est analogue à la réponse à une infection virale et soutient l'évolution de l'immunité anti-tumorale. Abréviations : CRT = calreticuline ; DC = cellules dendritiques ; HMGB1 = high mobility binding box 1 ; ATP = adenosine triphosphate ; TLR = toll-like receptor ; IFN = interferon ; IL = interleukine ; NRLP3 = inflammasome.

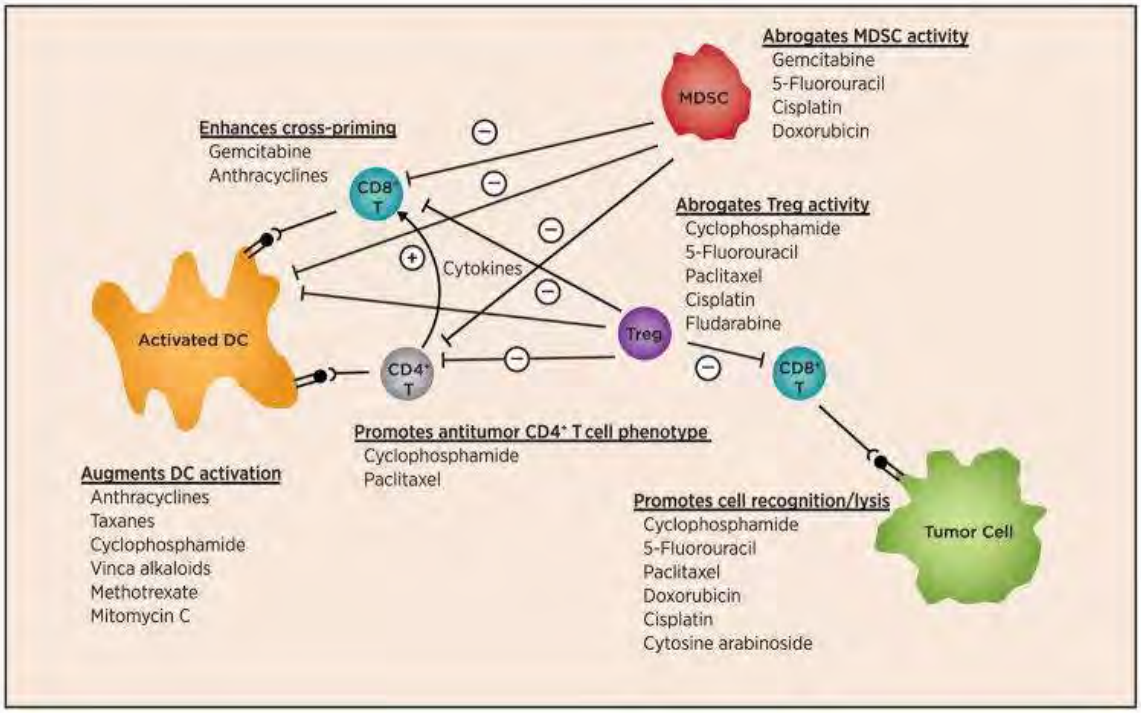

Figure 8 - La chimiothérapie module l'immunité tumorale par des mécanismes distincts de la mort cellulaire immunogène (d'après L. A. Emens et G. Middleton (124)).

Divers médicaments de chimiothérapie peuvent moduler l'activité de sous-ensembles de cellules immunitaires distinctes ou le phénotype immunitaire des cellules tumorales en améliorant la présentation de l'antigène, en améliorant l'expression des molécules co-stimulantes, notamment B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86), régulant à la baisse les molécules des points de contrôle comme PD-L1 ou en induisant la mort des cellules tumorales par les voies fas, perforine ou granzyme B. Abréviations : DC = cellules dendritiques ; MDSC = myeloid-derived suppressor cell ; Treg = lymphocyte T régulateur.

E- Traitement par immunothérapie des cancers du sein triple négatifs :

E1- Résultats des essais cliniques en phase métastatique et en néo-adjuvant

1) En phase métastatique :

En ce qui concerne les CSTN métastatiques, le taux de réponse aux anti-PD-(L)1 en monothérapie varie de 5,3 à 24% selon les études. Le taux de réponse est plus élevé si le traitement est délivré en 1ère ligne et quand la tumeur est PD-L1 positive (122,125–129).

Les CSTN affichent un taux de réponse faible aux anti-PD-1 en monothérapie (Tableau 2), mais il a été suggeré dans une étude de phase II qu'une courte induction par 2 semaines de chimiothérapie peut permettre de majorer les taux de réponse (sans induction = 17%, avec cisplatine = 23%, avec doxorubicine = 35%) (130).

Etude	Phase	Molécule	Patientes	Nombre de patientes	Taux de réponse	Réf.
JAVELIN	Phase 1b	Avelumab	Cancers du sein métastatiques multitraités	158 (dont 58 CSTN)	3% (global) 5,2% (CSTN) 16,7% (PD-L1+) 22,2% (CSTN PD-L1+)	(125)
KEYNOTE-012	Phase 1b	Pembrolizumab	CSTN métastatiques multitraités, PD-L1+	32	18,5%	(126)
KEYNOTE-086 (cohorte A)	Phase 2	Pembrolizumab	CSTN métastatiques, 2ème ligne ou +	170	5,3% (global) 5,7% (PD-L1+)	(127)
KEYNOTE-086 (cohorte B)	Phase 2	Pembrolizumab	CSTN métastatiques, 1ère ligne, PD-L1+	84	21,4%	(128)
NCT01375842	Phase 1	Atezolizumab	CSTN métastatiques	116	24% (1ère ligne) 6% (≥ 2ème ligne) 12% (PD-L1+)	(129)

Tableau 2 - Résumé des résultats des essais cliniques d'immunothérapie en monothérapie dans les cancers du sein triple négatifs métastatiques.

En raison de ces faibles taux de réponse, l'approche a ensuite été de combiner les IPCI à la chimiothérapie conventionnelle, dans l'objectif de transformer des tumeurs non immunogènes (tumeurs froides) en tumeurs qui le sont (tumeurs chaudes) afin d'améliorer les résultats.

Ainsi, les premières études de phase I dans le cadre de la maladie métastatique ont montré une augmentation du taux de réponse jusqu'à 26,4 à 42%, avec des combinaisons à des chimiothérapies (nab-paclitaxel, éribuline, capécitabine) (122). En phase II, en association avec la capécitabine, le taux de réponse n'était que de 13% (131).

Récemment, l'étude de phase III IMPASSION130 (10,132)**, étude randomisée contre placebo, a évalué l'intérêt de l'ajout de l'atézolizumab à la chimiothérapie par nab-paclitaxel, chez des patientes ayant un CSTN métastatique ou localement avancés en 1ère ligne.** L'étude a inclus 902 patientes (451 dans chaque groupe). Elle avait un double objectif primaire : la survie sans progression (SSP) et la survie globale (SG) pour l'ensemble de la population et pour la population ayant une tumeur PD-L1+ (au moins 1% de cellules immunes PD-L1+ en IHC réalisée avec l'anticorps Ventana SP142). Le plan d'analyse statistique prévoyait d'analyser la différence en SSP et en SG d'abord pour l'ensemble de la population puis pour celle ayant une tumeur PD-L1+ uniquement en cas de différence significative pour l'ensemble de la population. Les résultats actualisés de l'étude ont montré après un suivi médian de 18 mois (8,4-22,8) que :

- Dans la population en intention de traiter :

* la médiane de SSP était de 7,2 mois avec l'atézolizumab contre 5,5 mois avec le placebo (HR = 0,80 ; 95% IC 0,69-0,92, p = 0,0021)
* la médiane de survie globale n'est pas significativement allongée par l'atézolizumab puisqu'elle passait de 18,7 mois dans le groupe placebo à 21 mois pour le groupe atézolizumab (HR = 0,86 ; 95% IC, 0,72-1,02 ; p = 0.078).

- Malgré tout, l'analyse a été effectuée chez les patients ayant des tumeurs PD-L1+ :

* la médiane de SSP était de 7,5 mois contre 5,3 mois (HR 0,53 ; 95% IC 0,50-0,80, p < 0.0001)
* la médiane de SG était de 25 mois contre 18 mois (HR = 0.71 ; 95% IC 0.54-0.94).

Ces résultats ne respectant pas le plan d'analyse statistique initial, doivent être considérés avec prudence, mais semblent tout de même témoigner du fait qu'une proportion de patientes ayant un CSTN métastatique pourrait bénéficier de l'atézolizumab.

Actualité ESMO 2020 :

Lors de l'ESMO 2020, les résultats actualisés de l'étude IMPASSION 130 ont fait l'objet d'une présentation orale (LBA16). Avec une médiane de suivi de 20 mois, la médiane de SG n'est pas significativement allongée dans la population globale : 21 mois contre 18.7 mois, soit +2.3 mois (HR 0.87 ; IC 95% 0.75-1.02 ; p = 0.077). **Si l'on considère les patientes PD-L1+, la médiane de SG reste allongée dans les mêmes proportions que lors de l'analyse précédente : 25.4 mois contre 17.9 mois, soit +7.5 mois** (HR 0.67 ; IC 95% 0.53-0.86). Le bénéfice en SG de l'ajout de l'atézolizumab au nab-paclitaxel se maintient donc dans le temps dans la population PD-L1+.

Une autre étude, conduite avec le pembrolizumab cette fois, vient d'être présentée au congrès de l'ASCO 2020 (13) : les patientes ont été randomisées 2:1 entre pembrolizumab + chimiothérapie (nab-paclitaxel ou paclitaxel ou gemcitabine + carboplatine) ou placebo + chimiothérapie jusqu'à un maximum de 35 administrations de pembrolizumab / placebo ou jusqu'à progression / toxicité non acceptable. Les patientes ont été stratifiés par type de chimiothérapie (taxane vs gemcitabine + carboplatine), statut PD-L1 (CPS ≥1 vs <1) et traitement (neo)adjuvant antérieur avec une chimiothérapie de même classe (oui versus non). Les critères d'évaluation primaires étaient la SSP et la SG pour l'ensemble des patientes et selon l'expression tumorale de PD-L1 (CPS ≥10 et ≥1).
Le suivi médian était de 17,5 mois pour les patientes du bras pembrolizumab (n = 566) et de 15,5 mois pour les patientes du bras placebo (n = 281). Le pembrolizumab a significativement amélioré la SSP par rapport à la chimiothérapie seule chez les patients avec des tumeurs CPS ≥ 10 (tableau), répondant à l'un des objectifs principaux définis par le protocole. Bien que la limite d'un avantage statistiquement significatif de l'ajout du pembrolizumab chez les patientes avec des tumeurs CPS ≥ 1 n'ait pas été respectée et qu'aucun test formel en ITT n'ait été effectué, l'effet du traitement par pembrolizumab a augmenté avec l'enrichissement en PD-L1 (tableau). Les données en termes de SG ne sont pas matures. Les taux d'évènements indésirables (EI) liés au traitement de grade 3 à 5 étaient de 68,1 % dans le bras pembrolizumab (2 décès) contre 66,9 % dans le bras placebo (0 décès) ; les taux d'EI immuno-médiés de grade 3-4 et les réactions à la perfusion étaient de 5,5% vs 0%.

Population	Treatment	Median PFS, mo	HR (95% CI)	*P*-value	*P*-value boundary
CPS ≥10	P + C (n=220) vs C (n=103)	9.7 vs 5.6	0.65 (0.49-0.86)	0.0012	0.00411
CPS ≥1	P + C (n=425) vs C (n=211)	7.6 vs 5.6	0.74 (0.61-0.90)	0.0014	0.00111
ITT	P + C (n=566) vs C (n=281)	7.5 vs 5.6	0.82 (0.69-0.97)	-	n/a

Les résultats de 2 études de phase III supplémentaires dans la même indication sont en attente :

- IMPASSION 131 qui évalue atézolizumab + paclitaxel
- IMPASSION 132 qui évalue atézolizumab + chimiothérapie (carboplatine + gemcitabine, ou capécitabine)

Actualité ESMO 2020 :

Lors de l'ESMO 2020, les premiers résultats de l'étude IMPASSION 131 ont fait l'objet d'une présentation orale (LBA15). Il s'agit d'une étude qui évalue l'ajout de l'atézolizumab au paclitaxel (et non au nab-paclitaxel comme dans IMPASSION 130), en 1ère ligne de traitement des CSTN métastatiques. L'objectif principal était la SSP dans la population PD-L1+. Après un suivi médian court de 8.6 mois, les résultats sont décevants puisque **la médiane de SSP n'est pas allongée dans le groupe atezolizumab chez les patientes PD-L1+ : elle passe de 5.7 à 6 mois** (HR = 0.82 ; 95% IC 0.60-1.12 ; p = 0.20). L'étude est donc négative pour son objectif principal. Si l'on considère l'ensemble de la population, la médiane de SSP était respectivement de 5.5 et 5.7 mois dans les bras atézolizumab et placebo. Les données en termes de SG ne sont pas totalement matures mais la 1° analyse affiche une tendance, certes non significative, à une meilleure SG dans le bras placebo. La médiane est de 19.2 versus 22.8 mois (HR 1.31) respectivement avec et sans atézolizumab pour les patientes PD-L1+, ainsi que de 18.1 versus 22.8 mois (HR 1.11) pour l'ensemble des patientes. L'exposition au paclitaxel a été la même dans les deux bras ne pouvant pas expliquer les résultats obtenus et très peu d'effets secondaires sévères en lien avec l'immunothérapie ont été rapportées ; la toxicité la plus fréquente étant une dysthyroïdie (13% versus 4%). Cette étude échoue donc à montrer un bénéfice à l'ajout de l'atézolizumab au paclitaxel, source d'un retrait de l'ATU en France. Se pose la question des raisons de la discordance avec les résultats obtenus dans l'étude IMPASSION 130, même si cette dernière reste critiquable sur le plan méthodologique.

2) En traitement néo-adjuvant : (Tableau 3)

Une étude de phase II (I-SPY2) de combinaison du pembrolizumab à la chimiothérapie néo-adjuvante a montré une augmentation du taux de RHC qui passait de 22,3% sans IPCI à 62,4% avec le pembrolizumab (133).

Cependant, une autre étude conduite avec le durvalumab (GeparNuevo) n'a pas montré de différence significative en terme de RHC sauf si l'immunothérapie était débutée avant de débuter la chimiothérapie (mais il s'agissait d'une analyse exploratoire) (134).

Récemment, il a été présenté lors du congrès de l'ESMO 2019 les résultats de l'étude KEYNOTE-522 (135)**. Ces résultats ont ensuite fait l'objet d'une publication dans le New England Journal of Medicine en février 2020 (14).**

Il s'agit d'une étude de phase III, qui a évalué l'ajout du pembrolizumab à une chimiothérapie néo-adjuvante par 4 cycles de carboplatine + paclitaxel puis 4 cycles de doxorubicine (ou épirubicine) + cyclophosphamide, sur le taux de RHC. Après la chirurgie, les patients recevaient 9 cycles supplémentaires en adjuvant de pembrolizumab ou placebo. Mille cent soixante-quatorze patientes ont été randomisées dans l'étude.

Après un suivi médian de 15,5 mois (2,7-25 mois), l'ajout du pembrolizumab a montré une augmentation significative du taux de RHC (ypT0/Tis et ypN0) : 64,8 % vs 51,2 %, $p < 0.001$ (la majoration du taux de RHC était visible aussi bien dans le groupe PD-L1 positif que négatif). L'étude n'est pas encore suffisamment mature pour les résultats de survie sans évènement (SSE), mais il existait une tendance en faveur du pembrolizumab, avec une survie sans évènement à 18 mois de 91,3% contre 85,3% avec le placebo (HR 0,63 [95% IC, 0,43-0,93]).

Enfin, l'essai clinique NeoTRIP, présentée par Luca Gianni au congrès San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) en 2019 (136), portant sur un nombre de patientes plus modeste (n = 280) ne montre pas de gain en termes de RHC à l'addition de l'atézolizumab à une chimiothérapie néo-adjuvante par carboplatine + nab-paclitaxel pour le traitement des CSTN (43,5 % vs 40,8 %, NS). A noter que l'objectif principal de cette étude n'était pas la RHC, mais la survie sans évènement (évaluation en cours). On notera enfin que dans cette étude, la chimiothérapie par anthracyclines (4 cycles) était délivrée après la chirurgie.

Etude	Phase	Molécule	Patientes	RHC	Survie
I-SPY2	Phase 2	Pembrolizumab	104	22,3% (contrôle) 62,4% (Pembro)	En cours
GeparNuevo	Phase 2	Durvalumab	174	44,2% (contrôle) 53,4% (Durva)	En cours
KEYNOTE-522	Phase 3	Pembrolizumab	1174	**51,2% (contrôle)** **64,8% (Pembro)** **P < 0.001**	En cours. Résultats préliminaires (NS) : SSE à 18 mois : 85,3% (contrôle) 91,3% (Pembro)
NeoTRIP	Phase 3	Atezolizumab	280	40,8% (contrôle) 43,5% (Atezo) NS	En cours

Tableau 3 - Résumé des résultats des essais cliniques d'immunothérapie associée à la chimiothérapie néo-adjuvante dans le traitement des CSTN.

Actualité ESMO 2020 :

Lors de l'ESMO 2020, les premiers résultats de l'étude IMPASSION 031 ont fait l'objet d'une présentation orale (LBA11). Il s'agit d'une étude de phase 3 randomisée (1:1), en double aveugle contre placebo. L'objectif principal était le taux de RHC dans la population en intention de traiter (ITT) et PD-L1+. L'atézolizumab était délivré toutes les 2 semaines en néo-adjuvant (avec une chimiothérapie dose dense par nab-paclitaxel puis adriamycine et cyclophosphamide), puis en adjuvant pour 11 injections supplémentaires toutes les 3 semaines. Trois cent trente-trois patientes ont participé à cette étude. **En ITT, le taux de RHC était majoré par l'adjonction de l'atézolizumab de 16.5%** (IC 95% : 5.9-27.1 ; p = 0.0044) passant de 41.1 à 57.6%. La différence est à peu près la même si l'on considère la population de patientes PD-L1+ : + 19.5% (IC 95% : 4.2-35.8 ; p = 0.021), le taux de RHC passant de 49.3 à 68.8%. Contre toute attente, l'amélioration du taux de RHC est observée quel que soit le sous-groupe de patientes et notamment le statut PD-L1 avec un delta de +13.3% pour les patientes PD-L1 <1%. Après un suivi médian un peu inférieur à 20 mois, l'analyse préliminaire de la survie sans évènement montre une tendance à l'amélioration dans le bras atézolizumab avec 17/165 (10.3%) évènements dans ce bras contre 22/168 (13.1%) dans le bras placebo. Les données de tolérance sont sans surprise : la toxicité de la chimiothérapie (principalement hématologique) n'est pas majorée par l'immunothérapie et les effets secondaires en lien avec cette dernière sont

essentiellement des rashs cutanés (48%) et des dysthyroïdies (10%). **Ces résultats ont été publiés dans le Lancet** (137)**.** Il s'agit donc de la deuxième étude prospective qui, après la KEYNOTE-522, montre un bénéfice en taux de RHC à l'adjonction d'un anti-PD-(L)1 à la chimiothérapie, mais un suivi plus long est nécessaire avant de les incorporer dans notre pratique courante car nous ne disposons pas encore de données matures en survie sans évènement. La meilleure chimiothérapie partenaire reste également à définir : carboplatine ou pas ? paclitaxel ou nab-paclitaxel ? Un autre enseignement important de cet essai est que la valeur prédictive du statut PD-L1 pour la sensibilité à l'atézolizumab pourrait ne pas être la même à la phase précoce et métastatique des CSTN.

E2- Biomarqueurs de réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires dans les CSTN

1) Le TMB (« Tumor Mutational Burden », ou charge mutationnelle tumorale)

Les CSTN ont le plus haut niveau de charge mutationnelle tumorale (« TMB ») parmi l'ensemble des sous-types de cancer du sein. Un plus grand nombre de mutations peut conduire à plus de protéines anormales, qui peuvent être reconnues comme néo-antigènes par les CPA, ce qui peut aboutir à l'initiation d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Les tumeurs qui ont un système de recombinaison homologue déficient (HRD, tumeurs mutées BRCA par exemple) ont une instabilité génomique plus importante qui conduit à la création d'un plus grand nombre de néo-antigènes pouvant être présentés pas la tumeur, et donc potentiellement à une réaction immunitaire plus importante (138).

A l'ASCO 2020, une communication a rapporté l'intérêt du TMB dans la population de l'essai KEYNOTE-119 (139) :
Dans l'étude randomisée, ouverte, de phase 3 KEYNOTE-119, la SG n'était pas significativement différente avec le pembrolizumab délivré en monothérapie par rapport à une chimiothérapie de deuxième ou troisième ligne en traitement des CSTN métastatiques. Cependant, l'effet du traitement par pembrolizumab augmentait avec l'enrichissement en PD-L1. L'étude a évalué l'association du TMB avec l'efficacité du pembrolizumab par rapport à la chimiothérapie.
L'objectif était l'association de la réponse avec le TMB, tel que mesuré par Foundation One CDx (Foundation Medicine). Les estimations de l'efficacité basées sur le TMB ont utilisé un seuil prédéterminé de 10 mut / Mb.
Les données de TMB étaient disponibles pour 253/601 (42,1%) patientes traitées (pembrolizumab, n = 132 ; chimiothérapie, n = 121). Vingt-six patients avaient un TMB ≥10 mut / Mb. Ainsi, la prévalence d'un TMB ≥10 mut / Mb était d'environ 10%. Les résultats basés sur le TMB sont rapportés dans le tableau ci-dessous. **Les données de cette analyse exploratoire de l'étude KEYNOTE-119 suggèrent une association positive potentielle entre le TMB et le**

bénéfice clinique obtenu avec le pembrolizumab mais pas avec la chimiothérapie. Bien que la précision soit limitée par la taille de l'échantillon et le nombre de patientes avec un TMB ≥10 mut / Mb, le taux de réponse et les HR pour la SG suggèrent une tendance vers un bénéfice accru du pembrolizumab par rapport à la chimiothérapie chez les patientes avec un TMB ≥10 mut / Mb.

	TMB ≥10, pembro (n = 14)	TMB ≥10, chemo (n = 12)	TMB < 10, pembro (n = 118)	TMB < 10, chemo (n = 109)
ORR, % (95% CI)	14.3% (4.0-39.9)	8.3% (0.4-35.4)	12.7% (7.9-19.9)	12.8% (7.8-20.4)
PFS, HR (95% CI)	1.14 (0.42-3.07)	–	1.24 (0.92-1.67)	–
OS, HR (95% CI)	0.58 (0.21-1.57)	–	0.81 (0.61-1.07)	–

2) Les TILs :

Lors de l'ESMO 2020, G. Bianchini a présenté une analyse complémentaire de l'essai clinique NEOTRIP (LBA13). Dans cet essai d'ajout de l'atézolizumab à la chimiothérapie néo-adjuvante dans les CSTN, une analyse de TILs a été réalisé sur les biopsies avant traitement. Un nombre élevé de TILs était significativement associé avec la RHC dans le groupe atézolizumab, mais pas dans le groupe chimiothérapie.

Dans l'étude GeparNuevo (134), les auteurs ont réalisé une analyse similaire, et les TILs était prédictif de la RHC dans les 2 bras de l'étude (chimiothérapie néo-adjuvante avec ou sans durvalumab).

La valeur prédictive des TILs pour la réponse à l'immunothérapie doit donc encore faire l'objet d'explorations complémentaires.

3) L'expression de PD-L1 :

L'expression de PD-L1 en IHC est également un outil utile, prédictif de la réponse à l'immunothérapie. Cependant, cet outil n'est pas parfait, car des tumeurs PD-L1 négatives peuvent également présenter des réponses aux immunothérapies anti-PD-1 (122). De plus, le seuil n'est pas clairement défini et diffère entre les différentes études, tout comme les techniques de sa réalisation : différences entre les anticorps utilisés et différences dans la définition de la positivité (pourcentage ou CPS).

Pour mémoire, anticorps utilisés en IHC :
SP142 = utilisé pour IMPASSION 130 (Atézolizumab)
22C3 = utilisé pour KEYNOTE-522 (Pembrolizumab)
SP263 = utilisé pour GeparNuevo (Durvalumab)
28-8 = utilisé pour le Nivolumab

Au congrès de l'ESMO 2019, M. Scott a présenté les différences d'identification des populations de CSTN en fonction de l'anticorps anti-PD-1 et de la méthodologie utilisée (ABSTRACT 556) : 196 cas de CSTN ont été marqués par IHC en utilisant les tests VENTANA PD-L1 (SP263), VENTANA PD-L1 (SP142), Dako PD-L1 IHC 28-8 pharmDx et Dako PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. Les tests SP263, 22C3 et 28-8 ont montré une bonne corrélation analytique pour la coloration des cellules tumorales (TC) (ρ = 0,84-0,89), mais inférieure pour SP142 (0,44-0,46), tandis que tous les tests ont montré une bonne corrélation pour cellules immunitaires (IC) (0,77-0,96) et le CPS [score combiné] (0,78-0,95). Les performances analytiques entre SP263, 22C3 et 28-8 étaient très similaires ; **SP142 colorait moins de TC et d'IC**. Contrairement à d'autres types de cancer, dans le CSTN, les scores TC sont inférieurs et les scores IC sont plus élevés. Des précautions doivent être prises lors de l'échange de tests PD-L1 et de l'interprétation des données d'efficacité qui en découlent dans les CSTN. Alors que SP263 identifierait en grande partie la même population de patients PD-L1 que sur KEYNOTE-086, il pourrait potentiellement identifier 22% de cas supplémentaires comme PD-L1 élevé que sur IMPASSION 130.

Au congrès de l'ESMO 2019, H. S. Rugo a présenté l'impact de l'évaluation de PD-L1 sur la réponse au traitement (140) : dans une analyse post-hoc exploratoire, l'étude a évalué la concordance analytique de SP142 avec 2 autres tests IHC PD-L1, et leur capacité à prédire l'activité clinique. Les échantillons disponibles d'IMPASSION 130 ont été évalués pour le statut PD-L1 en utilisant le test VENTANA SP142 ou SP263 (IC ≥ 1%, SP142+ ou SP263+) ou Dako PD-L1 IHC 22C3 (score de proportion combiné [CPS] ≥ 1, 22C3+). 614 patientes (68% de la population en ITT) était évaluable pour le statut PD-L1 en utilisant les 3 tests. **La prévalence de positivité de PD-L1 était de 46% pour SP142, 81% pour 22C3 et 75% pour SP263. 98% de marquages SP142 positifs étaient identifiés par chacun des deux autres tests.** Le HR pour la SSP (IC à 95%) était de 0,60 (0,47-0,78) pour les patientes SP142 positives, 0,68 (0,56-0,82) pour les patientes 22C3 positives, et 0,64 (0,53-0,79) pour les patientes SP263 positives.
Le HR pour la survie globale (IC à 95%) était de 0,74 (0,54-1,01) pour les patientes SP142 positives, 0,78 (0,62-0,99) pour les patientes 22C3 positives, et 0,75 (0,59-0,96) pour les patientes SP263 positives. Aux seuils évalués, les tests 22C3 et SP263 ont identifié plus de patientes avec des tumeurs PD-L1+. **Les patientes dans la population SP142 PD-L1 positif, qui est incluse dans les populations 22C3 et SP263 PD-L1 positives, ont obtenu le plus grand bénéfice clinique avec l'ajout de l'atézolizumab.**

<u>Au total,</u> il ressort que le test SP142 identifie moins de patientes comme PD-L1+ que les autres tests, mais ces patientes ont le plus de bénéfice à l'ajout de l'immunothérapie (atézolizumab) à la chimiothérapie.

Comme nous l'avons vu précédemment, PD-L1 a montré ses limites pour identifier les patientes avec un CSTN susceptibles de répondre à l'immunothérapie. En phase métastatique, PD-L1 n'était pas prédictif de la réponse à l'atézolizumab dans l'étude IMPASSION 131, et en phase néo-adjuvante, PD-L1 n'était pas prédictif de la réponse au pembrolizumab dans l'essai KEYNOTE-522 et dans l'essai IMPASSION 031. **De nouveaux biomarqueurs sont donc nécessaires pour mieux prédire la réponse à l'immunothérapie dans les CSTN.**

4) <u>L'Amplification du gène CD274 :</u>

L'étude SAFIR02-BREAST IMMUNO a récemment montré, dans une analyse exploratoire, que l'amplification du gène CD274 (qui code pour PD-L1) était fortement prédictif de la réponse au durvalumab (HR = 0,17, 95% IC [0,05 ; 0,55], logrank test p = 0.0009), alors que d'autres marqueurs immunitaires (marquage en IHC de CD8, Foxp3 et CD103), et le déficit de recombinaison homologue ne l'étaient pas (141).

<u>En synthèse,</u> il n'y a actuellement pas de biomarqueur clairement validé pour prédire la réponse à l'immunothérapie. C'est actuellement PD-L1 qui est le plus utilisé, mais sa méthode d'évaluation n'est pas standardisée et varie selon les études.

Bibliographie :

1. Official website of the French National Public Health Agency. Updated on June 17, 2019. [Internet]. Available from: https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-sein/la-maladie/#tabs

2. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;151:1–32.

3. 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 Jul 8;100(14):8418–23.

4. Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. BMC Cancer. 2007 Dec;7(1):153.

5. von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, Zardavas D, Benyunes M, Viale G, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med. 2017 Jul 13;377(2):122–31.

6. von Minckwitz G, Huang C-S, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. N Engl J Med. 2019 14;380(7):617–28.

7. Caparica R, Lambertini M, de Azambuja E. How I treat metastatic triple-negative breast cancer. ESMO Open. 2019;4(Suppl 2):e000504.

8. 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 Aug 1;13(15):4429–34.

9. 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 Jun;96:17–24.

10. 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 29;379(22):2108–21.

11. Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, et al. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. J Clin Oncol. 2016 May 1;34(13):1460–8.

12. on behalf of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer (GC-HBOC), Engel C, Rhiem K, Hahnen E, Loibl S, Weber KE, et al. Prevalence of pathogenic BRCA1/2 germline mutations among 802 women with unilateral triple-negative breast cancer without family cancer history. BMC Cancer. 2018 Dec;18(1):265.

13. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im S-A, Yusof MM, et al. KEYNOTE-355: Randomized, double-blind, phase III study of pembrolizumab + chemotherapy versus placebo + chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer. J Clin Oncol. 2020 May 20;38(15_suppl):1000–1000.

14. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med. 2020 Feb 27;382(9):810–21.

15. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. Cancer Discov. 2019;9(2):176–98.

16. 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 Jul 1;121(7):2750–67.

17. Ahn SG, Kim SJ, Kim C, Jeong J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. J Breast Cancer. 2016 Sep;19(3):223–30.

18. Hubalek M, Czech T, Müller H. Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. Breast Care Basel Switz. 2017 Mar;12(1):8–14.

19. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. Clin Cancer Res. 2008 Mar 1;14(5):1368–76.

20. 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 May;24(5):628–37.

21. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Gonçalves A, Lee K-H, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline *BRCA* Mutation. N Engl J Med. 2018 Aug 23;379(8):753–63.

22. Robson M, Im S-A, 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 Aug 10;377(6):523–33.

23. Kim S-B, Dent R, Im S-A, Espié M, Blau S, Tan AR, et al. Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2017 Oct;18(10):1360–72.

24. Schmid P, Abraham J, Chan S, Wheatley D, Brunt AM, Nemsadze G, et al. Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial. J Clin Oncol. 2020 Feb 10;38(5):423–33.

25. Yoshida T, Ozawa Y, Kimura T, Sato Y, Kuznetsov G, Xu S, et al. Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial–mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal–epithelial transition (MET) states. Br J Cancer. 2014 Mar;110(6):1497–505.

26. Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, et al. Phase II Trial of Bicalutamide in Patients with Androgen Receptor-Positive, Estrogen Receptor-Negative Metastatic Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2013 Oct 1;19(19):5505–12.

27. 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 May;27(5):812–8.

28. Traina TA, Miller K, Yardley DA, Eakle J, Schwartzberg LS, O'Shaughnessy J, et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor–Expressing Triple-Negative Breast Cancer. J Clin Oncol. 2018 Mar 20;36(9):884–90.

29. Pusztai L, Foldi J, Dhawan A, DiGiovanna MP, Mamounas EP. Changing frameworks in treatment sequencing of triple-negative and HER2-positive, early-stage breast cancers. Lancet Oncol. 2019 Jul;20(7):e390–6.

30. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. Arch Gynecol Obstet. 2016 Feb;293(2):247–69.

31. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada MV, Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. Sapino A, editor. PLOS ONE. 2016 Jun 16;11(6):e0157368.

32. 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 Off J Eur Soc Med Oncol. 2019 Jun 4;

33. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsky P, Gnant M, Poortmans P, et al. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. Ann Oncol. 2019 Oct;30(10):1541–57.

34. 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 Off J Am Soc Clin Oncol. 2007 Oct 1;25(28):4414–22.

35. Lakhani SR, International Agency for Research on Cancer, Weltgesundheitsorganisation, editors. WHO classification of tumours of the breast: views of a working group that convened for a consensus and editorial meeting at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, September 1 - 3, 2011. 4. ed. Lyon: Internat. Agency for Research on Cancer; 2012. 240 p. (World Health Organization Classification of tumours).

36. 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 Lond Engl. 2014 Jul 12;384(9938):164–72.

37. Spring LM, Fell G, Arfe A, Sharma C, Greenup R, Reynolds KL, et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. Clin Cancer Res. 2020 Jun 15;26(12):2838–48.

38. Masuda N, Lee S-J, Ohtani S, Im Y-H, Lee E-S, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. N Engl J Med. 2017 01;376(22):2147–59.

39. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. Annu Rev Immunol. 2016 20;34:539–73.

40. Ogiya R, Niikura N, Kumaki N, Bianchini G, Kitano S, Iwamoto T, et al. Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients. Cancer Sci. 2016 Dec;107(12):1730–5.

41. He T-F, Yost SE, Frankel PH, Dagis A, Cao Y, Wang R, et al. Multi-panel immunofluorescence analysis of tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer: Evolution of tumor immune profiles and patient prognosis. PloS One. 2020;15(3):e0229955.

42. Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. J Clin Invest. 2011 Sep;121(9):3609–22.

43. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. Nat Rev Clin Oncol. 2019 Mar;16(3):151–67.

44. Zappasodi R, Merghoub T, Wolchok JD. Emerging Concepts for Immune Checkpoint Blockade-Based Combination Therapies. Cancer Cell. 2018 Apr;33(4):581–98.

45. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. Cancer Discov. 2018;8(9):1069–86.

46. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2012 Apr;12(4):252–64.

47. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. Immunity. 2016 May;44(5):989–1004.

48. Śledzińska A, Menger L, Bergerhoff K, Peggs KS, Quezada SA. Negative immune checkpoints on T lymphocytes and their relevance to cancer immunotherapy. Mol Oncol. 2015 Dec;9(10):1936–65.

49. Duhen T, Duhen R, Montler R, Moses J, Moudgil T, de Miranda NF, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. Nat Commun [Internet]. 2018 Dec [cited 2019 Jun 21];9(1). Available from: http://www.nature.com/articles/s41467-018-05072-0

50. Balança C-C, Scarlata C-M, Michelas M, Devaud C, Sarradin V, Franchet C, et al. Dual Relief of T-Lymphocyte Proliferation and Effector Function Underlies Response to PD-1 Blockade in Epithelial Malignancies. Cancer Immunol Res. 2020 Apr 15;

51. Zhu S, Lin J, Qiao G, Wang X, Xu Y. Tim-3 identifies exhausted follicular helper T cells in breast cancer patients. Immunobiology. 2016 Sep;221(9):986–93.

52. Balança C-C, Salvioni A, Scarlata C-M, Michelas M, Martinez Gomez C, Gomez-Roca C, et al. PD-1 blockade restores helper activity of tumor-infiltrating exhausted CD4 T cells [Submitted].

53. Stamm H, Oliveira-Ferrer L, Grossjohann E-M, Muschhammer J, Thaden V, Brauneck F, et al. Targeting the TIGIT-PVR immune checkpoint axis as novel therapeutic option in breast cancer. Oncoimmunology. 2019;8(12):e1674605.

54. 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 Feb;26(2):259–71.

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

56. 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 Oct 1;2(10):1354.

57. Dieci MV, Tsvetkova V, Griguolo G, Miglietta F, Tasca G, Giorgi CA, et al. Integration of tumour infiltrating lymphocytes, programmed cell-death ligand-1, CD8 and FOXP3 in prognostic models for triple-negative breast cancer: Analysis of 244 stage I–III patients treated with standard therapy. Eur J Cancer. 2020 Sep;136:7–15.

58. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2019 Mar 1;37(7):559–69.

59. 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 Off J Am Soc Clin Oncol. 2013 Mar 1;31(7):860–7.

60. 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.

61. Pelekanou V, Barlow WE, Nahleh ZA, Wasserman B, Lo Y-C, von Wahlde M-K, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression in Pre- and Posttreatment Breast Cancers in the SWOG S0800 Phase II Neoadjuvant Chemotherapy Trial. Mol Cancer Ther. 2018;17(6):1324–31.

62. Hida AI, Watanabe T, Sagara Y, Kashiwaba M, Sagara Y, Aogi K, et al. Diffuse distribution of tumor-infiltrating lymphocytes is a marker for better prognosis and chemotherapeutic effect in triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat [Internet]. 2019 Aug 12 [cited 2019 Aug 18]; Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10549-019-05390-x

63. Buisseret L, Garaud S, de Wind A, Van den Eynden G, Boisson A, Solinas C, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. OncoImmunology. 2017 Jan 2;6(1):e1257452.

64. Takada K, Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Takahashi K, Fujita H, et al. Clinical verification of the relationship between smoking and the immune microenvironment of breast cancer. J Transl Med [Internet]. 2019 Dec [cited 2019 Jul 12];17(1). Available from: https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-019-1773-y

65. 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 Off J Am Soc Clin Oncol. 2014 Sep 20;32(27):2959–66.

66. Dieci MV, Conte P, Bisagni G, Brandes AA, Frassoldati A, Cavanna L, et al. Association of tumor-infiltrating lymphocytes with distant disease-free survival in the ShortHER randomized adjuvant trial for patients with early HER2+ breast cancer. Ann Oncol. 2019 Mar 1;30(3):418–23.

67. 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 Jan 1;29(1):162–9.

68. 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 Feb 1;30(2):236–42.

69. 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 Jan;179(1):11–23.

70. 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 Off J Eur Soc Med Oncol. 2014 Mar;25(3):611–8.

71. Pelekanou V, Carvajal-Hausdorf DE, Altan M, Wasserman B, Carvajal-Hausdorf C, Wimberly H, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in breast cancer and its clinical significance. Breast Cancer Res [Internet]. 2017 Dec [cited 2019 Jul 12];19(1). Available from: http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-017-0884-8

72. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2011 May 20;29(15):1949–55.

73. Vihervuori H, Autere TA, Repo H, Kurki S, Kallio L, Lintunen MM, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8+ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol [Internet]. 2019 Sep 27 [cited 2019 Oct 6]; Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00432-019-03036-5

74. Tsiatas M, Kalogeras KT, Manousou K, Wirtz RM, Gogas H, Veltrup E, et al. Evaluation of the prognostic value of CD3, CD8, and FOXP3 mRNA expression in early-stage breast cancer patients treated with anthracycline-based adjuvant chemotherapy. Cancer Med. 2018 Oct;7(10):5066–82.

75. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat Rev Cancer. 2012 15;12(4):298–306.

76. Schmidt M, Weyer-Elberich V, Hengstler JG, Heimes A-S, Almstedt K, Gerhold-Ay A, et al. Prognostic impact of CD4-positive T cell subsets in early breast cancer: a study based on the FinHer trial patient population. Breast Cancer Res [Internet]. 2018 Dec [cited 2019 Jul 12];20(1). Available from: https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-018-0942-x

77. 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 Jul;123(7):2873–92.

78. Solis-Castillo LA, Garcia-Romo GS, Diaz-Rodriguez A, Reyes-Hernandez D, Tellez-Rivera E, Rosales-Garcia VH, et al. Tumor-infiltrating regulatory T cells, CD8/Treg ratio, and cancer stem cells are correlated with lymph node metastasis in patients with early breast cancer. Breast Cancer Tokyo Jpn. 2020 Mar 16;

79. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Lee AHS, Ellis IO, et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2011 May;127(1):99–108.

80. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2006 Dec 1;24(34):5373–80.

81. Shou J, Zhang Z, Lai Y, Chen Z, Huang J. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis. BMC Cancer [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Jul 12];16(1). Available from: http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2732-0

82. Barriga V, Kuol N, Nurgali K, Apostolopoulos V. The Complex Interaction between the Tumor Micro-Environment and Immune Checkpoints in Breast Cancer. Cancers. 2019 Aug 19;11(8):1205.

83. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. Nature. 2020 Jan;577(7791):549–55.

84. Mahmoud SMA, Lee AHS, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. Breast Cancer Res Treat. 2012 Apr;132(2):545–53.

85. Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, Arnould L, Apetoh L, Rébé C, et al. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. J Pathol. 2011 Jul;224(3):389–400.

86. 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 BCR. 2015 Sep 4;17:124.

87. Zhang M, Sun H, Zhao S, Wang Y, Pu H, Wang Y, et al. Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. Oncotarget [Internet]. 2017 May 9 [cited 2019 Jul 12];8(19). Available from: http://www.oncotarget.com/fulltext/15532

88. Monneur A, Gonçalves A, Bertucci F. Expression de PD-L1 et inhibiteurs de la voie PD-1/PD-L1 dans le cancer du sein. Bull Cancer (Paris). 2018 Mar;105(3):263–74.

89. Sobral-Leite M, Van de Vijver K, Michaut M, van der Linden R, Hooijer GKJ, Horlings HM, et al. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, *BRCA1* -like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. OncoImmunology. 2018 Dec 2;7(12):e1509820.

90. Telli ML, Chu C, Badve SS, Vinayak S, Silver DP, Isakoff SJ, et al. Association of Tumor Infiltrating Lymphocytes with Homologous Recombination Deficiency and BRCA1/2 Status in Patients with Early Triple-Negative Breast Cancer: A Pooled Analysis. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2019 Dec 3;

91. Noske A, Möbus V, Weber K, Schmatloch S, Weichert W, Köhne C-H, et al. Relevance of tumour-infiltrating lymphocytes, PD-1 and PD-L1 in patients with high-risk, nodal-metastasised breast cancer of the German Adjuvant Intergroup Node–positive study. Eur J Cancer. 2019 Jun;114:76–88.

92. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2014 May 15;20(10):2773–82.

93. Bottai G, Raschioni C, Losurdo A, Di Tommaso L, Tinterri C, Torrisi R, et al. An immune stratification reveals a subset of PD-1/LAG-3 double-positive triple-negative breast cancers. Breast Cancer Res BCR. 2016 03;18(1):121.

94. Yasinska IM, Sakhnevych SS, Pavlova L, Teo Hansen Selnø A, Teuscher Abeleira AM, Benlaouer O, et al. The Tim-3-Galectin-9 Pathway and Its Regulatory Mechanisms in Human Breast Cancer. Front Immunol [Internet]. 2019 Jul 11 [cited 2019 Aug 5];10. Available from: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01594/full

95. Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. TIM-3 expression in breast cancer. Oncoimmunology. 2018;7(11):e1502128.

96. Byun KD, Hwang HJ, Park KJ, Kim MC, Cho SH, Ju MH, et al. T-Cell Immunoglobulin Mucin 3 Expression on Tumor Infiltrating Lymphocytes as a Positive Prognosticator in Triple-Negative Breast Cancer. J Breast Cancer. 2018;21(4):406.

97. Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. Ann Oncol. 2017 Dec 1;28(12):2977–84.

98. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2010 Jan 1;28(1):105–13.

99. 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 Off J Am Soc Clin Oncol. 2015 Mar 20;33(9):983–91.

100. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Hatano T, et al. Prediction of Treatment Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer by Subtype Using Tumor-infiltrating Lymphocytes. Anticancer Res. 2018;38(4):2311–21.

101. Russo L, Maltese A, Betancourt L, Romero G, Cialoni D, De la Fuente L, et al. Locally advanced breast cancer: Tumor-infiltrating lymphocytes as a predictive factor of response to neoadjuvant chemotherapy. Eur J Surg Oncol. 2019 Jun;45(6):963–8.

102. Mao Y, Qu Q, Zhang Y, Liu J, Chen X, Shen K. The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. PloS One. 2014;9(12):e115103.

103. Castaneda CA, Mittendorf E, Casavilca S, Wu Y, Castillo M, Arboleda P, et al. Tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. World J Clin Oncol. 2016;7(5):387.

104. Lee H, Lee M, Seo J-H, Gong G, Lee HJ. Changes in Tumor-infiltrating Lymphocytes After Neoadjuvant Chemotherapy and Clinical Significance in Triple Negative Breast Cancer. Anticancer Res. 2020 Apr;40(4):1883–90.

105. Criscitiello C, Esposito A, Trapani D, Curigliano G. Prognostic and predictive value of tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. Cancer Treat Rev. 2016 Nov;50:205–7.

106. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Kurata K, Noda S, Takashima T, et al. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer: Tumour-infiltrating lymphocytes as predictors of response to chemotherapy in breast cancer. Br J Surg. 2016 Jun;103(7):845–54.

107. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Chan M, Hirakawa H, Suzuki A, et al. Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. Breast Cancer Res Treat. 2014 Dec;148(3):525–34.

108. de Groot AF, Blok EJ, Charehbili A, Engels CC, Smit VTHBM, Dekker-Ensink NG, et al. Strong CD8+ lymphocyte infiltration in combination with expression of HLA class I is associated with better tumor control in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Breast Cancer Res Treat. 2019 Jun;175(3):605–15.

109. Waks AG, Stover DG, Guerriero JL, Dillon D, Barry WT, Gjini E, et al. The Immune Microenvironment in Hormone Receptor–Positive Breast Cancer Before and After Preoperative Chemotherapy. Clin Cancer Res [Internet]. 2019 May 6 [cited 2019 Jul 12]; Available from: http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-19-0173

110. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2008 Apr 15;14(8):2413–20.

111. Hou Y, Nitta H, Wei L, Banks PM, Parwani AV, Li Z. Evaluation of Immune Reaction and PD-L1 Expression Using Multiplex Immunohistochemistry in HER2-Positive Breast Cancer: The Association With Response to Anti-HER2 Neoadjuvant Therapy. Clin Breast Cancer. 2018 Apr;18(2):e237–44.

112. Zhang L, Wang XI, Ding J, Sun Q, Zhang S. The predictive and prognostic value of Foxp3+/CD25+ regulatory T cells and PD-L1 expression in triple negative breast cancer. Ann Diagn Pathol. 2019 Jun;40:143–51.

113. Kitano A, Ono M, Yoshida M, Noguchi E, Shimomura A, Shimoi T, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. ESMO Open. 2017 May;2(2):e000150.

114. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Morisaki T, et al. Prediction of treatment responses to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer by analysis of immune checkpoint protein expression. J Transl Med [Internet]. 2018 Dec [cited 2019 Jul 12];16(1). Available from: https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-018-1458-y

115. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. Cancer Immunol Res. 2015 Apr 1;3(4):326–32.

116. Bianchini G, Smart C, Mansutti M, Lück H-J, Zambelli S, Olier C, et al. Modulation by treatment of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and PDL1 expression in triple-negative breast cancer in the ETNA trial. J Clin Oncol. 2020 May 20;38(15_suppl):555–555.

117. Yam C, Alatrash G, Yen E-Y, Garber H, Philips AV, Huo L, et al. Immune phenotype and response to neoadjuvant systemic therapy (NAST) in triple negative breast cancer (TNBC). J Clin Oncol. 2020 May 20;38(15_suppl):509–509.

118. Orecchioni S, Talarico G, Labanca V, Calleri A, Mancuso P, Bertolini F. Vinorelbine, cyclophosphamide and 5-FU effects on the circulating and intratumoural landscape of immune cells improve anti-PD-L1 efficacy in preclinical models of breast cancer and lymphoma. Br J Cancer. 2018 May;118(10):1329–36.

119. Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, et al. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. Nat Med. 2014 Nov;20(11):1301–9.

120. Zhang P, Su D-M, Liang M, Fu J. Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis. Mol Immunol. 2008 Mar;45(5):1470–6.

121. Roselli M, Cereda V, di Bari MG, Formica V, Spila A, Jochems C, et al. Effects of conventional therapeutic interventions on the number and function of regulatory T cells. Oncoimmunology. 2013 Oct 1;2(10):e27025.

122. Santa-Maria CA, Nanda R. Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Breast Cancer. J Natl Compr Canc Netw. 2018 Oct;16(10):1259–68.

123. de Mingo Pulido Á, Gardner A, Hiebler S, Soliman H, Rugo HS, Krummel MF, et al. TIM-3 Regulates CD103+ Dendritic Cell Function and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. Cancer Cell. 2018 Jan;33(1):60-74.e6.

124. Emens LA, Middleton G. The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. Cancer Immunol Res. 2015 May;3(5):436–43.

125. Dirix LY, Takacs I, Jerusalem G, Nikolinakos P, Arkenau H-T, Forero-Torres A, et al. Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. Breast Cancer Res Treat. 2018;167(3):671–86.

126. Nanda R, Chow LQM, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. J Clin Oncol. 2016 Jul 20;34(21):2460–7.

127. Adams S, Schmid P, Rugo HS, Winer EP, Loirat D, Awada A, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2019 01;30(3):397–404.

128. Adams S, Loi S, Toppmeyer D, Cescon DW, De Laurentiis M, Nanda R, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. Ann Oncol. 2019 Mar 1;30(3):405–11.

129. Emens LA, Cruz C, Eder JP, Braiteh F, Chung C, Tolaney SM, et al. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. JAMA Oncol. 2019 Jan 1;5(1):74.

130. 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 Jun;25(6):920–8.

131. Shah AN, Flaum L, Helenowski I, Santa-Maria CA, Jain S, Rademaker A, et al. Phase II study of pembrolizumab and capecitabine for triple negative and hormone receptor-positive, HER2−negative endocrine-refractory metastatic breast cancer. J Immunother Cancer. 2020 Feb;8(1):e000173.

132. 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. 2019 Nov 27;

133. Nanda R, Liu MC, Yau C, Asare S, Hylton N, Veer LV, et al. Pembrolizumab plus standard neoadjuvant therapy for high-risk breast cancer (BC): Results from I-SPY 2. J Clin Oncol. 2017 May 20;35(15_suppl):506–506.

134. Loibl S, Untch M, Burchardi N, Huober J, Sinn BV, Blohmer J-U, et al. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple negative breast cancer - clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2019 May 16;

135. Annals of Oncology (2019) 30 (suppl_5): v851-v934. 10.1093/annonc/mdz394.

136. NeoTRIP trial. Available from: https://ascopost.com/issues/february-25-2020/no-improved-pcr-with-atezolizumab-in-early-triple-negative-breast-cancer/

137. Mittendorf EA, Zhang H, Barrios CH, Saji S, Jung KH, Hegg R, et al. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. The Lancet. 2020 Sep;S014067362031953X.

138. Pellegrino B, Musolino A, Llop-Guevara A, Serra V, De Silva P, Hlavata Z, et al. Homologous Recombination Repair Deficiency and the Immune Response in Breast Cancer: A Literature Review. Transl Oncol. 2020 Feb;13(2):410–22.

139. Winer EP, Lipatov O, Im S-A, Goncalves A, Muñoz-Couselo E, Lee KS, et al. Association of tumor mutational burden (TMB) and clinical outcomes with pembrolizumab (pembro) versus chemotherapy (chemo) in patients with metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC) from KEYNOTE-119. J Clin Oncol. 2020 May 20;38(15_suppl):1013–1013.

140. Rugo HS, Loi S, Adams S, Schmid P, Schneeweiss A, Barrios CH, et al. Performance of PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assays in unresectable locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): Post-hoc analysis of IMpassion130. Ann Oncol. 2019 Oct;30:v858–9.

141. Bachelot T, Filleron T, Bieche I, Arnedos M, Campone M, Dalenc F, et al. Durvalumab compared to maintenance chemotherapy in patients with metastatic breast cancer: Results from the phase II randomized trial SAFIR02-BREAST IMMUNO [Submitted].

Partie II : travail original

« Etude MIMOSA »

Introduction

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit (revue de la littérature), il existe un intérêt grandissant pour l'incorporation de l'immunothérapie dans le traitement des cancers du sein triple négatifs, que ce soit en phase métastatique, ou plus récemment en néo-adjuvant pour les stades précoces. Il semble évident que la prescription des anticorps anti-PD-(L)1 soient utiles à certaines patientes, mais que d'autres y résistent de façon primaire ou secondaire. De plus, le biomarqueur « PD-L1 », dont les règles d'interprétation de son expression au niveau des tumeurs n'est pas consensuel, en tant que paramètre prédictif de sensibilité au traitement a montré ses limites. Il est peu discriminant en phase métastatique, et ne l'est pas en phase précoce. Enfin, la question d'une éventuelle synergie entre les ou certains cytotoxiques et les IPCI (anti-PD-(L)1) reste d'actualité.

Il est donc nécessaire de mieux connaitre le micro-environnement immunitaire des cancers du sein triple négatifs, au-delà du comptage des TILs et de l'expression de PD-(L)1, mais aussi de mieux comprendre l'influence des cytotoxiques sur ce micro-environnement (du moins au stade précoce) afin d'obtenir un rationnel à tester de nouvelles stratégies thérapeutiques (quelle combinaison thérapeutique et à quel moment ?).

Dans ce contexte, nous avons conduit une étude rétrospective, à partir d'une cohorte de patientes traitées pour un cancer du sein triple négatif par chimiothérapie néo-adjuvante à l'IUCT-Oncopole avec pour objectif primaire de décrire les modifications du microenvironnement immun de ces tumeurs induites par la chimiothérapie néo-adjuvante pour l'ensemble des patientes (qu'elles soient ou non en réponse histologique complète), en termes de quantification des TILs et des sous-types de TILs (CD4 et CD8) ainsi que d'expression de trois points de contrôle immunitaires que sont PD-L1 mais aussi TIM-3 et LAG-3. Ces deux derniers ont été sélectionnées en raison de leur intérêt croissant et de leur implication potentielle dans la résistance aux anti-PD-(L)1. Les principaux objectifs secondaires étaient de :

- Décrire le micro-environnement immun des cancers du sein triple-négatifs avant tout traitement.
- Décrire le micro-environnement immun des cancers du sein triple-négatifs après la chimiothérapie néo-adjuvante pour l'ensemble des patientes, mais aussi celles en réponse histologique complète ou pas.
- Comparer les modifications du micro-environnement immun, induites par la chimiothérapie néoadjuvante selon que patientes sont en réponse histologique complète ou pas.
- Etablir une corrélation entre ces biomarqueurs immuns (sur la microbiopsie) et la qualité de la réponse histologique (RHC ou non).
- Etudier l'association entre ces biomarqueurs immuns (leur expression avant <u>et</u> après chimiothérapie, mais aussi leur variation induite par la chimiothérapie) et la survie sans

maladie ainsi que la survie globale pour l'ensemble de la population mais pour chaque groupe (réponse histologique complète ou non).

Nous avons construit cette étude que nous avons appelé « MIMOSA » et répondu à des appels à projets pour la financer.

Nous avons ainsi reçu un double financement de la part de la Ligue régionale contre le cancer, et par l'appel à projet interrégional en cancérologie (API-K) « incitation à la recherche en cancérologie », édition 2019, du Cancéropôle Grand Sud-Ouest (GSO).

Nous avons choisi de présenter la méthodologie déployée et les principaux résultats obtenus sous forme d'un article en anglais, afin de pouvoir le soumettre à publication rapidement. En effet, cette étude est la première dans la littérature à s'être intéressée aux changements d'expression de LAG-3 et de TIM-3 sous l'effet d'une chimiothérapie néo-adjuvante dans les cancers du sein triple négatifs et à en avoir étudié le lien avec le pronostic.

Dans cette deuxième partie du manuscrit sont donc présentés les résultats de l'étude « MIMOSA ».

Immune microenvironment changes induced by neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancers: the MIMOSA-1 study

Victor SARRADIN[1], Amélie LUSQUE[2], Thomas FILLERON[2], Florence DALENC[1], Camille FRANCHET[3]

[1] Department of Medical Oncology, Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

[2] Department of Biostatistics, Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

[3] Department of Pathology, Institut Claudius Regaud, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

Abstract

Background: The immune microenvironment (IME) of triple negative breast cancers (TNBCs) and its modifications by neoadjuvant chemotherapy (NACT) remains to be fully characterized. Our current study aims to evaluate NACT induced IME changes and assess the prognostic value of specific immune biomarkers.

Methods: Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) were identified from hematoxylin-eosin stained sections of paired pre- and post-NACT tumor tissue samples from a TNBCs cohort (n=66) and expression of PD-L1, TIM-3 and LAG-3 evaluated by immunohistochemistry.

Results: Overall TILs count and PD-L1 expression did not differ pre-and post-NACT, but there was a response-specific statistically significant difference. TILs count decreased in 65.5% of patients who achieved a pathological complete response (pCR) and increased in 56.8% of no-pCR patients (p=0.0092). Baseline PD-L1 expression was more significantly frequently lost in pCR than in no-pCR patients (41.4% vs 16.2%, p=0.0020). TIM-3 expression was significantly higher after NACT (p<0.0001) and occurred more frequently in no-pCR than in pCR patients (51.4% vs 31%, p=0.3580). LAG-3 expression significantly decreased after NACT, but there was no difference between response groups. Before NACT, high TILs count (>10%) was significantly associated with better overall survival (OS), p=0.0112. After NACT, PD-L1 positivity and TIM-3 strong positivity (≥5%) were independently associated with significantly worse OS (p=0.0055 and p=0.0274, respectively). Patients positive for both PD-L1 and TIM-3 had the worse prognosis (p=0.0020), even regarding patients who did not achieve pCR only, p=0.0479.

Conclusions: NACT induces significant IME changes in TNBC. PD-L1 and TIM-3 expression post NACT may present strong prognostic information.

Keywords: triple negative breast cancer; neoadjuvant chemotherapy; immune microenvironment; tumor infiltrating lymphocytes; TILs; PD-L1; TIM-3; LAG-3; immune checkpoint

Article

1. Introduction

Neoadjuvant chemotherapy (NACT) is increasingly used to treat early stage triple negative breast cancers (TNBCs), and NACT response yields important prognostic information, in particular because the extend of residual disease (1,2). Treatment responses differentiate two groups of patients: those who achieve a pathologic complete response (pCR) with a good prognosis and those with residual invasive disease (no-pCR) and a high risk of relapse. Patients with no-pCR either receive adjuvant capecitabine treatment (3) or are considered for inclusion in clinical trials.

Several TNBCs studies have highlighted the association between tumor infiltrating lymphocytes (TILs) with a good prognosis (4–13) and with a higher pCR rate after NACT (4–8,13–18). Although TILs count is standardized (19,20) and routinely assessed, it currently does not contribute to treatment strategy.

In addition to increase TILs count, expression of the immune checkpoint (ICP) Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) appears to be associated with a higher pCR rate (14,21–25) and better DFS (4). Other novel immunological breast cancer (BrCa) targets, such as T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3 (TIM-3) (26,27) and lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) (28,29) may yield additional prognostic information.

Despite preclinical evidences supports that antitumor activity of anthracyclines and alkylating agents may be partially mediated through the modulation of the anti-tumor immune response (30–32), only few studies have addressed this concern in TNBCs (33). To unveil the impact of NACT on the TNBCs immune microenvironment (IME) may improve the design of future adjuvant clinical trials for patients exhibiting no-pCR and may lead to the development of novel biomarkers.

The primary objective of this study was to evaluate IME changes induced by NACT in TNBCs. The prognostic value of immune biomarkers (TILs, PD-L1, TIM-3 and LAG-3) in terms of overall survival (OS) and their association with pathological response were also evaluated as part of the secondary objectives.

2. Methods

2.1. Population

We retrospectively identified 212 TNBCs out of a total of 666 early BrCa patients treated with NACT between June 2012 and October 2018 in our Comprehensive Cancer Center. TNBC was defined as estrogen and progesterone receptor expression <10% and negative HER2 status.

Only patients with both available formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) diagnostic biopsies as well as surgical tissue samples excised after NACT were included in the study (n=66). Clinico-pathological, treatment and follow-up data were extracted from patients' medical records.

2.2. Pathology assessments

pCR was defined as the absence of residual invasive cancer cells both in the breast (ypT0 or ypTis) and the axilla (ypN0).

For patients who achieved pCR, we evaluated immune biomarkers in the tumor bed area. Lymphocytic infiltrates in non-carcinomatous lesions and normal breast structures were ignored.

Stromal TILs scores were determined from hematoxylin-eosin stained tissue sections and defined as the percentage of the tumor stromal area comprising mononuclear inflammatory cells, according to the International TILs Working Group guidelines for assessment before (19) and after NACT (20).

The following antibodies were used to characterize the immune infiltrate by immunochemistry: PD-L1 clone SP142 (Ventana Medical Systems), TIM-3 clone AF2365 (R&D Systems) and LAG-3 clone NBP1-85781 (Novus Biologicals) dilution 1:500 Dako Flex (Dako). TIM-3 positive cells were quantified as the proportion of stained cells in stromal regions.

Immune cell PD-L1 SP142 staining was quantified (IC score) using the 4-classes classification, according to the manufacturer's recommendation. The proportion of tumor area occupied by PD-L1 expressing tumor-infiltrating immune cells was scored as follows: IC0= ≤1%; IC1= 1-4%; IC2= 5-9%; IC3= ≥10%.

LAG-3-positive cells were reported as the number of stained cells in 10 high-power fields (x400 magnification) in the strongest staining areas.

2.3. Statistical analysis

Categorical variables were described by frequencies and percentages and compared using the χ^2 test or Fisher's exact test. Quantitative variables were summarized by median and range (min-max) and compared with the Mann-Whitney test. Comparisons between the level of immune markers before and after NACT were performed using Wilcoxon signed rank test for paired data for quantitative variables and McNemar's test for categorical variables. For each continuous immune marker, the change post NACT was determined as the difference in expression level before and after NACT.

Overall survival (OS) was defined as the time from surgery to death from any cause or the last follow-up (censored data). Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. For survival analyses, TILs (cut-off >10% or >30%), PD-L1

(negative= IC0 versus positive= IC1, IC2 and IC3), LAG-3 (cut-off ≥ 1 or ≥10) and TIM-3 (cut-off ≥1% or ≥5%) were considered as categorical variables. TIM-3 was considered positive when ≥1% and LAG-3 when ≥1.

We used a composite criterion to identify patients who were PD-L1 positive (≥1%) and strongly TIM-3 positive (≥5%). We refer to this population as PD-L1+/TIM-3+.

All statistical tests were two sided, and a p-value<0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the STATA software version 16 (StataCorp LLC, College Station, TX).

3. Results

3.1. **Patients characteristics** (Suppl. table 1)

Our study included 66 patients who received sequential NACTs. No patient received adjuvant capecitabine. Twenty-nine (43.9%) achieved pCR (pCR group) and 37 did not (56.1%; no-pCR group).

3.2. **Immune micro-environment before neoadjuvant chemotherapy** (Table 1)

Before treatment, the median TILs count was 10% (range 1.0-95.0) and 10 patients (15.2%) had >30% TILs. Thirty-one patients were negative (47.0%) and 35 positive (53.0%) for PD-L1. Forty-five patients were negative (68.2%) and 21 positive (31.8%) for TIM-3. Nine patients (13.6%) exhibited strong TIM-3 staining (≥5%). Fifteen patients were negative (22.7%) and 51 positive (77.3%) for LAG-3. Seventeen patients (25.8%) exhibited strong LAG-3 staining (≥10 positive cells).

LAG-3 was the only immune biomarker significantly associated with the pCR rate. The pCR of LAG-3 positive and negative patients was 53% and 13.4% respectively (p = 0.0066) (Suppl. table 2).

3.3. **Immune changes induced by chemotherapy** (Table 1, figures 1 and 2)

Post NACT, median TILs count of the entire cohort remained unchanged at 10% (range: 1-70) (table 1). However, TILs count differed significantly as a function of NACT response (p = 0.0026), with the median number of TILs 5% lower (range of change: -94:60) in the pCR group and 4% higher (range of change: -45:55) in the no-pCR group (p=0.0026) (Suppl. table 3). After NACT, there was a statistically significant difference between the number of TILs scored in the pCR and no-pCR groups (median (range) post-NACT: 5% (1:70) in the pCR group and 15% (5:70) in the no-pCR group, p= 0.0062). After NACT, 8 patients (12.1%) had >30% TILs (6 in the no-pCR and 2 in the pCR groups) (Suppl. table 4).

There was no significant difference in PD-L1 expression pre- and post-NACT in the entire cohort, with 42.4% (n=28) of patients PD-L1 positive and 57.6% (n=38) PD-L1 negative after NACT (p=0.1936) (table 1). This is in contrast to the large and significant difference detected between the pCR- and no pCR-groups after chemotherapy, with 23 no-pCR patients (62.2%) and only 5 pCR patients (17.2%) PD-L1 positive after NACT (p = 0.0002) (Suppl. table 4).

There was a significant increase in TIM-3 expression after chemotherapy: TIM-3 was negative in 21 (31.8%) and positive in 45 (68.2%) patients (p<0.0001). After chemotherapy, 22 patients (33.3%) exhibited strong TIM-3 staining (≥ 5%) (p=0.0093) (Table 1). The increase was seen in both groups but was significantly greater in no-pCR patients, with 45.9% of patients staining strongly (≥ 5%) after NACT, compared to 17.2% in the pCRgroup (p = 0.0141) (Suppl. table 4).

After NACT, 12 patients (32.4%) were PD-L1+/TIM-3+ in the no-pCR and none in the pCR group (p= 0.0007) (Suppl. table 4).

After NACT, LAG-3 expression was not different than before NACT, with 55 positive patients (83.3%) (p= 0.3173). Eight patients (12.1%) exhibiting strong staining (Table 1). There were no significant differences of changes between pCR or no-pCR groups (p=0.1323) (Suppl. table 3).

3.4. Immune biomarkers and association with outcomes

After a median follow-up of 35.4 months [95% CI: 26.5-44.4], 17 patients had relapsed (25.8%) and 13 patients died (19.7%).

The overall cohort survival at 3 years (3yr-OS) was 76.3%, with significantly higher OS in the pCR group compared to the no-pCR group (87.5% vs 68.9%, p=0.0430) (figure 3A). The presence of vascular emboli on the surgical tissue sample was a strong poor prognostic factor (3yr-OS: 33.3% vs 80.7%; p<0.0001) (Suppl. table 5).

Immune biomarkers before chemotherapy (Suppl. table 2)

The only significant prognostic factor associated with a good prognosis was a >10% TILs count compared to patients with TILs count of 0-10% (3yr-OS: 91.2% vs 63.4%, p=0.0112) (figure 3B). For 10 patients with >30% TILs, the 3yr-OS was 100%. PD-L1 positivity tended to be associated with a better prognosis (3yr-OS: 88.4% vs 63.8%) but did not reach statistical significance (p=0.1111).

Immune biomarkers after chemotherapy (Table 2, figure 3)

After chemotherapy, TILs count had no prognostic value.

PD-L1 positivity was associated with a significantly worse prognosis (3yr-OS: 57.4% vs 89.4%, p=0.0055) (figure 3C). Strong TIM-3 positivity was also significantly associated with poor prognoses (3yr-OS: 58.0% vs 87.1%, p=0.0274) (figure 3D).

Patients with PD-L1+/TIM-3+ tumors had significantly worse prognoses (3yr-OS: 45.5% vs 84.6%, p=0.0020) (figure 3E).

Interestingly, patients who were PD-L1 negative on biopsy but became positive after NACT had extremely poor prognoses (3yr-OS: 19.9%, n=11) (data not shown).

We observed a similar worse prognostic associated with PD-L1 positivity (3yr-OS: 58.0% vs 84.6%, p=0.1186) or with a strong TIM-3 positivity (3yr-OS: 50.0% vs 88.7%, p=0.0702) in the no-pCR group, but this did not reach statistical significance. However dual PD-L1 and TIM-3 positivity identified a no-pCR subpopulation with poor prognoses. Indeed, PD-L1+/TIM-3+ no-pCR patients had significantly worse survival (3yr-OS: 45.5% vs 81.3%, p=0.0479) (figure 3F).

Patients in the no-pCR group who were PD-L1 negative on core biopsy but became positive after NACT also had poor prognoses (3yr-OS: 29.2%, n=8) (data not shown).

4. Discussion

Our study did not only examined modifications in both TILs count and PD-L1 expression levels before and after NACT in 66 TNBC patients but is, to the best of our knowledge, the first study that also evaluated changes in TIM-3 and LAG-3 expression as well as their association with pCR and OS.

Our study detected an overall cohort median TILs count of 10% at baseline, and 15.2% of TNBCs exhibited more than 30% TILs. These results are consistent with several reports in the literature (12–14), whereas other studies nevertheless report higher median TILs count (5,7).

PD-L1 expression was observed in 53% of cases, which is similar than in other reports using the Ventana SP142 antibody (34,35). In our cohort, 32% and 77% of tumors expressed TIM-3 and LAG-3, respectively. Considering TIM-3, Burugu et al. (26) found similar results (28% of TIM-3 positivity). However, in terms of LAG-3, reported results by Burugu et al. and Bottai et al. (33% and 18% respectively) differs from ours (28,29). Nevertheless, the methodology applied to quantify LAG-3 was different. TNBC IME appears to be very heterogeneous regarding these data, thereby supporting the rationale for combination ICP inhibitor and cytotoxic treatments to increase pCR rates (34–37).

TILs count before NACT is both a strong prognostic factor for OS (4–13) and an established predictor of pCR (4–8,13–18), which supports the fact that chemotherapy response is at least

partially mediated by the immune system (30–33). Our study detected no significant increased baseline TILs count in patients who achieved pCR, possibly due to a lack of power.

We reported a trend of PD-L1 positivity before NACT to yield improved prognoses. However there was no association with pCR, may be due to our small sample, although several other studies have reported it for DFS (4) or for pCR (14,21–25).

Importantly, we observed that baseline LAG-3 expression but not TIM-3 was associated with an increased probability of achieving pCR. We are, to the best of our knowledge, the first to report these data. Obviously, these finding must be considered with caution because of the small size of our cohort and larger study will be required to confirm our observations.

Although several studies have previously reported changes in TILs count before and after NACT and the prognostic significance of such changes (4,5,7,12,14), most of these studies were not restricted to TNBCs (12,14). The current literature therefore provides no definitive results regarding the prognostic value of TILs count in TNBCs. We report that a decrease in TILs was significantly more frequently associated with pCR and conversely, that an increase in TILs was more often associated with residual disease (Suppl. table 3). We found that the number of TILs before (but not after) NACT was a prognostically significant marker of 3yr-OS, an association that persisted (close to significance) even when the pCR group was considered on its own (data not shown). Our findings are consistent with observations reported by Castaneda et al. in 98 TNBC patients, of which 30% achieved pCR after NACT (7). In a cohort of 72 TNBC patients Dieci et al. (4) observed an increase in TILs in residual disease after NACT which was associated with improved disease-free survival. Lee et al (5) reported that, compared to stable cases, a significant change in TILs count between biopsy and residual tumor after NACT was associated with a better prognosis in a cohort of 104 patients with TNBC. Despite its statistical significance, this effect may be attributed to the over representation of cases with an increased TILs count under NACT. These data suggest that patients with increased TILs who do not achieve pCR after NACT, may benefit from adjuvant ICP inhibitor therapy. Nonetheless, a better characterization of TILs is required to optimize therapeutic strategies.

With regards to PD-L1 expression changes in TNBCs after NACT, Dieci et al. (4) found a significant increase of PD-L1 expression in residual disease which was associated with an improved DFS of borderline statistical significance. Pelekanou et al. detected decreased PD-L1 expression in a cohort encompassing all BrCa phenotypes and with no-pCR (12). In another study, the same authors found no altered PD-L1 expression after NACT, but a 15% mean decrease in TILs (14). We found no significant change in PD-L1 expression after NACT in our entire cohort, but an increase in PD-L1 expression in the no-pCR group. We also observed that PD-L1 positivity after NACT was significantly associated with worse OS in the entire cohort (p=0.0055) and with a trend in the no-pCR group (p=0.1186). The lack of standardized PD-L1 protocols makes it difficult to draw any conclusions from these studies and it is quite possible that the anti-PD-L1 VENTANA SP142 antibody we used identify fewer PD-L1 positive patients (38).

Importantly, our study is the first to report on modifications of TIM-3 and LAG-3 expression before and after NACT in TNBCs and their predictive and prognostic values. We found a significant increase in TIM-3 expression after NACT and a strong TIM-3 expression post-NACT which was a significant poor prognostic indicator in the entire population (p=0.0274), and showed a similar trend in the no-pCR group (p=0.0702). Interestingly, in the overall population as well as the no-pCR group, patients whose residual disease expressed with both PD-L1 and TIM-3 had the worse prognoses (3yr-OS: 45.5%).

These observations suggest that TNBCs remain immunogenic after NACT and may continue to be subject to antitumor immuno-surveillance, but that TILs are exhausted. This hypothesis provides a rationale to explore reactivation of these lymphocytes in residual disease using adjuvant immunotherapy, such as in the current anti-PD-L1 antibody trial (NCT02954874). In light of strong TIM-3 expression being predictive of a good anti-PD-(L)1 immunotherapy response in a cohort of 30 head and neck cancers patients (39) and that anti-TIM-3 antibodies are being evaluated alone or in combination with anti-PD-(L)1 therapy in several phase 1 trials (40), our own findings, should they be confirmed by larger multicentric studies, support the rational for testing immunotherapy in adjuvant treatment specifically in patients that have not achieved pCR.

Our study is nevertheless limited by its small size and monocentric nature which reduces its statistical power and prevented more substantial subgroup and multivariate analyses to be performed.

In conclusion, TNBCs have heterogeneous IMEs which are profoundly changed by NACT. After NACT, the cohort of patients positive for both PD-L1 and TIM-3 had a significantly worse prognose and importantly this correlation also persisted regarding only the group of patients who did not achieve pCR.

Funding

This work was supported by grants from la Ligue contre le cancer and the Canceropole Grand Sud-Ouest. The sources of funding did not influence the study design, data collection, analysis, and interpretation of results, nor the writing of the report or the decision to submit the article for publication.

References

1. 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 Lond Engl. 2014 Jul 12;384(9938):164–72.

2. Spring LM, Fell G, Arfe A, Sharma C, Greenup R, Reynolds KL, et al. Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. Clin Cancer Res. 2020 Jun 15;26(12):2838–48.

3. Masuda N, Lee S-J, Ohtani S, Im Y-H, Lee E-S, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. N Engl J Med. 2017 01;376(22):2147–59.

4. Dieci MV, Tsvetkova V, Griguolo G, Miglietta F, Tasca G, Giorgi CA, et al. Integration of tumour infiltrating lymphocytes, programmed cell-death ligand-1, CD8 and FOXP3 in prognostic models for triple-negative breast cancer: Analysis of 244 stage I–III patients treated with standard therapy. Eur J Cancer. 2020 Sep;136:7–15.

5. Lee H, Lee M, Seo J-H, Gong G, Lee HJ. Changes in Tumor-infiltrating Lymphocytes After Neoadjuvant Chemotherapy and Clinical Significance in Triple Negative Breast Cancer. Anticancer Res. 2020 Apr;40(4):1883–90.

6. 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.

7. Castaneda CA, Mittendorf E, Casavilca S, Wu Y, Castillo M, Arboleda P, et al. Tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. World J Clin Oncol. 2016;7(5):387.

8. Criscitiello C, Esposito A, Trapani D, Curigliano G. Prognostic and predictive value of tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. Cancer Treat Rev. 2016 Nov;50:205–7.

9. 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 Feb 1;30(2):236–42.

10. 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 Jan;179(1):11–23.

11. 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 Off J Eur Soc Med Oncol. 2014 Mar;25(3):611–8.

12. Pelekanou V, Carvajal-Hausdorf DE, Altan M, Wasserman B, Carvajal-Hausdorf C, Wimberly H, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in breast cancer and its clinical significance. Breast Cancer Res [Internet]. 2017 Dec [cited 2019 Jul 12];19(1). Available from: http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-017-0884-8

13. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2019 Mar 1;37(7):559–69.

14. Pelekanou V, Barlow WE, Nahleh ZA, Wasserman B, Lo Y-C, von Wahlde M-K, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and PD-L1 Expression in Pre- and Posttreatment Breast Cancers in the SWOG S0800 Phase II Neoadjuvant Chemotherapy Trial. Mol Cancer Ther. 2018;17(6):1324–31.

15. Telli ML, Chu C, Badve SS, Vinayak S, Silver DP, Isakoff SJ, et al. Association of Tumor Infiltrating Lymphocytes with Homologous Recombination Deficiency and BRCA1/2 Status in Patients with Early Triple-Negative Breast Cancer: A Pooled Analysis. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2019 Dec 3;

16. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Morisaki T, et al. Prediction of treatment responses to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer by analysis of immune checkpoint protein expression. J Transl Med [Internet]. 2018 Dec [cited 2019 Jul 12];16(1). Available from: https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-018-1458-y

17. Russo L, Maltese A, Betancourt L, Romero G, Cialoni D, De la Fuente L, et al. Locally advanced breast cancer: Tumor-infiltrating lymphocytes as a predictive factor of response to neoadjuvant chemotherapy. Eur J Surg Oncol. 2019 Jun;45(6):963–8.

18. Mao Y, Qu Q, Zhang Y, Liu J, Chen X, Shen K. The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. PloS One. 2014;9(12):e115103.

19. 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 Feb;26(2):259–71.

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

21. Zhang L, Wang XI, Ding J, Sun Q, Zhang S. The predictive and prognostic value of Foxp3+/CD25+ regulatory T cells and PD-L1 expression in triple negative breast cancer. Ann Diagn Pathol. 2019 Jun;40:143–51.

22. Kitano A, Ono M, Yoshida M, Noguchi E, Shimomura A, Shimoi T, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. ESMO Open. 2017 May;2(2):e000150.

23. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. Cancer Immunol Res. 2015 Apr 1;3(4):326–32.

24. Bianchini G, Smart C, Mansutti M, Lück H-J, Zambelli S, Olier C, et al. Modulation by treatment of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and PDL1 expression in triple-negative breast cancer in the ETNA trial. J Clin Oncol. 2020 May 20;38(15_suppl):555–555.

25. Yam C, Alatrash G, Yen E-Y, Garber H, Philips AV, Huo L, et al. Immune phenotype and response to neoadjuvant systemic therapy (NAST) in triple negative breast cancer (TNBC). J Clin Oncol. 2020 May 20;38(15_suppl):509–509.

26. Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. TIM-3 expression in breast cancer. Oncoimmunology. 2018;7(11):e1502128.

27. Byun KD, Hwang HJ, Park KJ, Kim MC, Cho SH, Ju MH, et al. T-Cell Immunoglobulin Mucin 3 Expression on Tumor Infiltrating Lymphocytes as a Positive Prognosticator in Triple-Negative Breast Cancer. J Breast Cancer. 2018;21(4):406.

28. Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. Ann Oncol. 2017 Dec 1;28(12):2977–84.

29. Bottai G, Raschioni C, Losurdo A, Di Tommaso L, Tinterri C, Torrisi R, et al. An immune stratification reveals a subset of PD-1/LAG-3 double-positive triple-negative breast cancers. Breast Cancer Res BCR. 2016 03;18(1):121.

30. Zappasodi R, Merghoub T, Wolchok JD. Emerging Concepts for Immune Checkpoint Blockade-Based Combination Therapies. Cancer Cell. 2018 Apr;33(4):581–98.

31. Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, et al. Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. Nat Med. 2014 Nov;20(11):1301–9.

32. Emens LA, Middleton G. The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. Cancer Immunol Res. 2015 May;3(5):436–43.

33. Orecchioni S, Talarico G, Labanca V, Calleri A, Mancuso P, Bertolini F. Vinorelbine, cyclophosphamide and 5-FU effects on the circulating and intratumoural landscape of immune cells improve anti-PD-L1 efficacy in preclinical models of breast cancer and lymphoma. Br J Cancer. 2018 May;118(10):1329–36.

34. Mittendorf EA, Zhang H, Barrios CH, Saji S, Jung KH, Hegg R, et al. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. The Lancet. 2020 Sep;S014067362031953X.

35. NeoTRIP trial. Available from: https://ascopost.com/issues/february-25-2020/no-improved-pcr-with-atezolizumab-in-early-triple-negative-breast-cancer/

36. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med. 2020 Feb 27;382(9):810–21.

37. Loibl S, Untch M, Burchardi N, Huober J, Sinn BV, Blohmer J-U, et al. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple negative breast cancer - clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2019 May 16;

38. Rugo HS, Loi S, Adams S, Schmid P, Schneeweiss A, Barrios CH, et al. Performance of PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assays in unresectable locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): Post-hoc analysis of IMpassion130. Ann Oncol. 2019 Oct;30:v858–9.

39. Balança C-C, Scarlata C-M, Michelas M, Devaud C, Sarradin V, Franchet C, et al. Dual Relief of T-Lymphocyte Proliferation and Effector Function Underlies Response to PD-1 Blockade in Epithelial Malignancies. Cancer Immunol Res. 2020 Apr 15;

40. He Y, Cao J, Zhao C, Li X, Zhou C, Hirsch F. TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. OncoTargets Ther. 2018 Oct;Volume 11:7005–9.

		Before Chemo (n=66)	After Chemo (n=66)	
TILs (%)				p= 0.5598
	Median	10.0	10.0	
	(Range)	(1.0-95.0)	(1.0-70.0)	
TILs (cl)				p= 0.8474
	0-10%	36 (54.5%)	35 (53.0%)	
	>10%	30 (45.5%)	31 (47.0%)	
TILs (cl)				p= 0.5930
	0-30%	56 (84.8%)	58 (87.9%)	
	>30%	10 (15.2%)	8 (12.1%)	
PD-L1				p= 0.1936
	Negative (IC0)	31 (47.0%)	38 (57.6%)	
	Positive (IC1/2/3)	35 (53.0%)	28 (42.4%)	
TIM-3 (cl)				**p< 0.0001**
	<1%	45 (68.2%)	21 (31.8%)	
	≥1%	21 (31.8%)	45 (68.2%)	
TIM-3 (cl)				**p= 0.0093**
	0-4%	57 (86.4%)	44 (66.7%)	
	≥5%	9 (13.6%)	22 (33.3%)	
PD-L1 and TIM-3				**p= 0.0209**
	Others	62 (93.9%)	54 (81.8%)	
	PD-L1+/TIM-3+	4 (6.1%)	12 (18.2%)	
LAG-3 (%)				**p= 0.0389**
	Median	2.5	3.0	
	(Range)	(0.0-37.0)	(0.0-23.0)	
LAG-3 (cl)				p= 0.3173
	0	15 (22.7%)	11 (16.7%)	
	>0	51 (77.3%)	55 (83.3%)	
LAG-3 (cl)				**p= 0.0126**
	0-9	49 (74.2%)	58 (87.9%)	
	≥10	17 (25.8%)	8 (12.1%)	

Table 1 – Description of the IME characteristics before and after neoadjuvant chemotherapy in the entire population (comparison with paired-test).

		Evt / N	3yr-OS	95% CI	
		All patients			
PD-L1					**p= 0.0055**
	Negative (IC0)	4 /38	89.4%	70.6-96.5	
	Positive (IC1/2/3)	9 /28	57.4%	33.2-75.5	
TILs					p= 0.6312
	0-10%	6 /35	79.6%	57.0-91.2	
	>10%	7 /31	72.5%	50.6-85.9	
TIM-3					p= 0.0840
	<1%	2 /21	93.8%	63.2-99.1	
	≥1%	11 /45	67.0%	48.0-80.5	
TIM-3					**p= 0.0274**
	0-4%	5 /44	87.1%	68.6-95.1	
	≥5%	8 /22	58.0%	33.1-76.4	
LAG-3					p= 0.7750
	0	2 /11	88.9%	43.3-98.4	
	>0	11 /55	73.5%	56.9-84.5	
PD-L1 and TIM-3					**p= 0.0020**
	Others	7 /54	84.6%	68.5-92.9	
	PD-L1+/TIM-3+	6 /12	45.5%	16.7-70.7	
		No-pCR group			
PD-L1					p= 0.1186
	Negative (IC0)	3 /14	84.6%	51.2-95.9	
	Positive (IC1/2/3)	8 /23	58.0%	33.0-76.5	
TILs					p= 0.8008
	0-10%	5 /16	72.0%	41.1-88.6	
	>10%	6 /21	65.7%	38.8-83.0	
TIM-3					p= 0.0702
	0-4%	3 /20	88.7%	61.4-97.1	
	≥5%	8 /17	50.0%	24.5-71.0	
PD-L1 and TIM-3					**p= 0.0479**
	Others	5 /25	81.3%	57.3-92.6	
	PD-L1+/TIM-3+	6 /12	45.5%	16.7-70.7	

Table 2 – Overall survival at 3 years according to the immune biomarkers on the surgical specimen (after chemotherapy) for all patients and for the no-pCR group only.

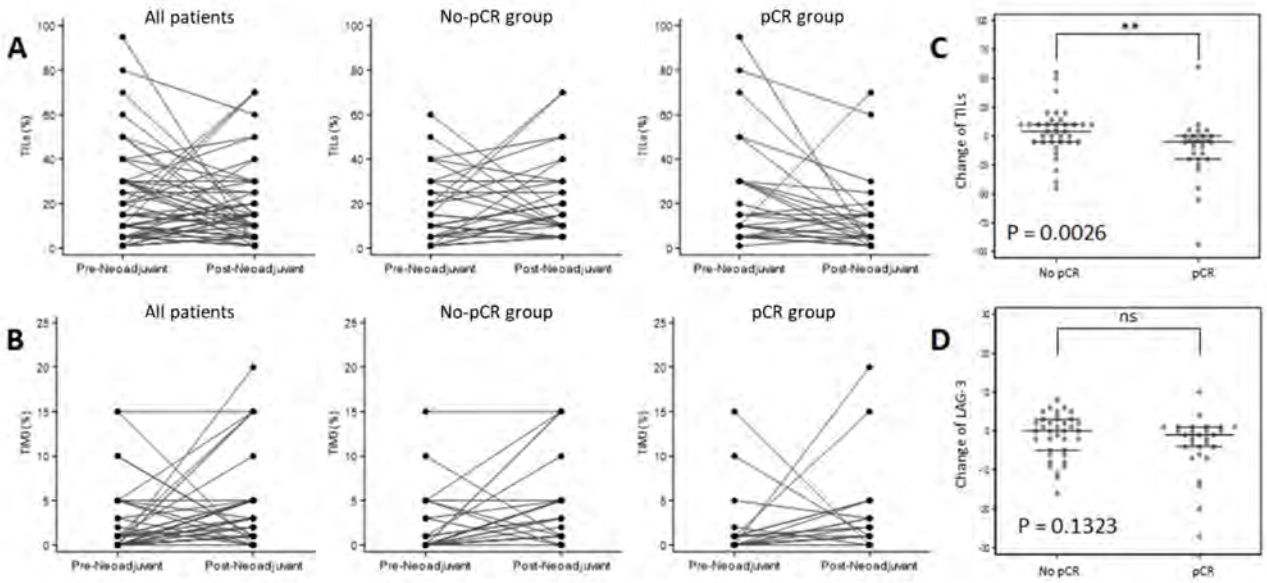

Figure 1 – Changes of the tumor immune microenvironment induced by neoadjuvant chemotherapy. **A.** Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) changes from biopsy (pre-neoadjuvant) to surgical tissue sample (post-neoadjuvant) for each patient, in all cases (left), in the no-pCR (middle) and in the pCR groups (right). **B.** Same representation as TILs for TIM-3 changes. **C.** Comparison of TILs changes from pre-neoadjuvant to post-neoadjuvant (in % of change) between the no-pCR and the pCR groups. **D.** Same representation as TILs for comparison of LAG-3 changes between the two groups.

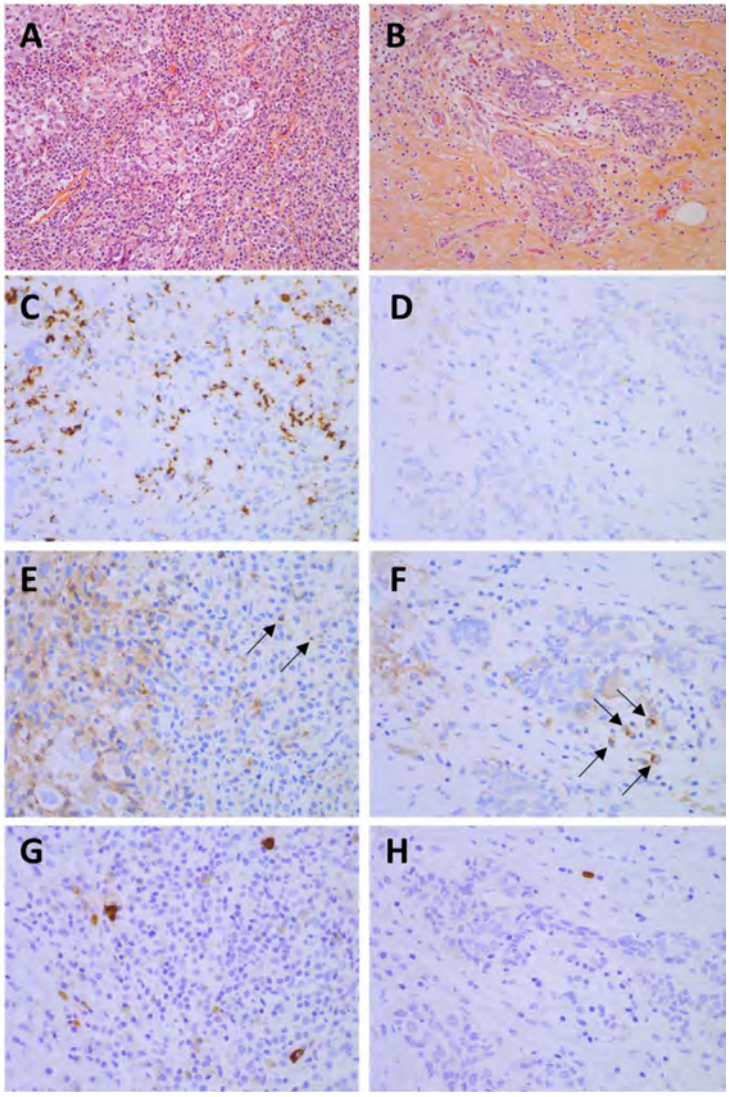

Figure 2 – Representative images of changes of the immune microenvironment induced by neoadjuvant chemotherapy in one patient who achieved pCR, and was still in remission 5 years after the surgery (TILs: x200 magnification; PD-L1, TIM-3 and LAG-3: x400 magnification). **A.** Baseline H&E of a significant TILs infiltrate (70%), indicative of a good prognosis and predicting a pCR. **B.** Post chemotherapy H&E showing a significant decrease in TILs but remaining high (15%). **C.** Strong PD-L1 staining before treatment (IC2). **D.** PD-L1 staining became negative after chemotherapy (IC0). **E.** TIM-3 staining before treatment was negative (<1%). **F.** TIM-3 after chemotherapy became strongly positive (5%). **G.** Strong LAG-3 staining before treatment (score = 26). **H.** LAG-3 staining decreased after chemotherapy (score = 6).

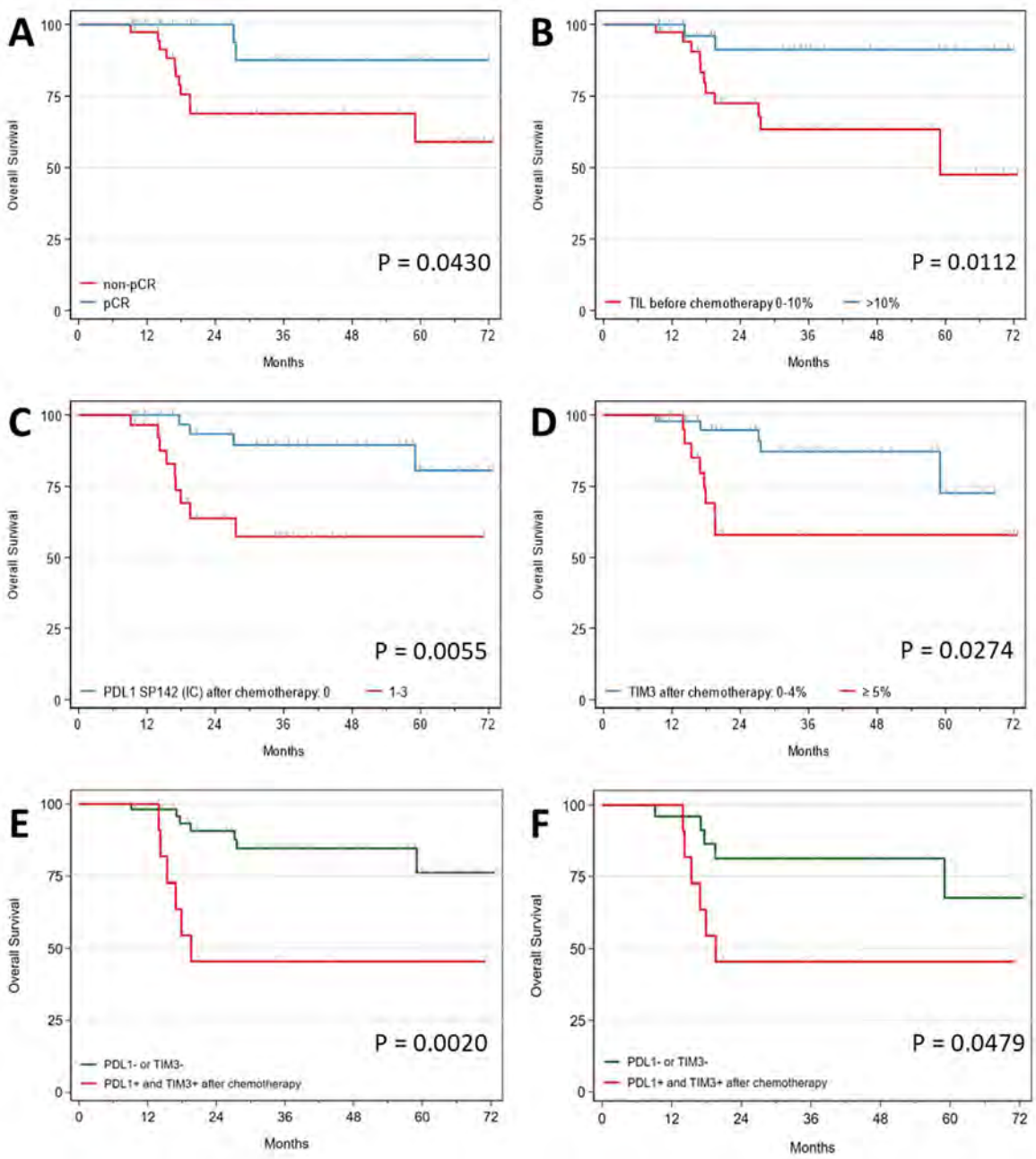

Figure 3 – Kaplan-Meier curves of Overall Survival (OS) based on - pathologic complete response (pCR) after neoadjuvant chemotherapy (NACT) **(A)**, - TILs count before NACT **(B)**, - PD-L1 positivity after NACT **(C)**, - TIM-3 expression after NACT **(D)**, - PD-L1 positivity and TIM-3 strong expression after NACT **(E)** and PD-L1 positivity and TIM-3 strong expression after NACT only in the no-pCR group **(F)**.

		Total (n=66)	No-pCR (n=37)	pCR (n=29)	
Age at biopsy	Median (Range)	52.0 (24.0-71.0)	54.0 (32.0-71.0)	48.0 (24.0-68.0)	p= 0.0757
T	T1	7 (10.6%)	2 (5.4%)	5 (17.2%)	p= 0.1568
	T2	29 (43.9%)	15 (40.5%)	14 (48.3%)	
	T3	19 (28.8%)	11 (29.7%)	8 (27.6%)	
	T4	11 (16.7%)	9 (24.3%)	2 (6.9%)	
N	N0	32 (48.5%)	15 (40.5%)	17 (58.6%)	p= 0.1695
	N1	26 (39.4%)	15 (40.5%)	11 (37.9%)	
	N2	1 (1.5%)	1 (2.7%)	0 (0.0%)	
	N3	7 (10.6%)	6 (16.2%)	1 (3.4%)	
Grade SBR	I or II	12 (18.5%)	10 (27.8%)	2 (6.9%)	**p= 0.0310**
	III	53 (81.5%)	26 (72.2%)	27 (93.1%)	
	Missing	1	1	0	
Chemotherapy	FEC	1 (1.5%)	1 (2.7%)	0 (0.0%)	p= 0.7214
	FEC or EC + wP	36 (54.5%)	18 (48.6%)	18 (62.1%)	
	FEC +D	16 (43.2%)	16 (43.2%)	10 (34.5%)	
	FEC or EC + D + wP	3 (4.5%)	2 (5.4%)	1 (3.4%)	
Surgery	Mastectomy	33 (50.0%)	22 (59.5%)	11 (37.9%)	p= 0.0825
	Conservative	33 (50.0%)	15 (40.5%)	18 (62.1%)	
Lymph nodes procedure	No	1 (1.5%)	0 (0.0%)	1 (3.4%)	p= 0.3193
	Dissection	48 (72.7%)	29 (78.4%)	19 (65.5%)	
	Sentinel	17 (25.8%)	8 (21.6%)	9 (31.0%)	
Radiotherapy	No	3 (4.5%)	2 (5.4%)	1 (3.4%)	p= 1.0000
	Yes	63 (95.5%)	35 (94.6%)	28 (96.6%)	

Supplementary table 1 - Patients characteristics. Abbreviations: D= docetaxel 100 mg/m^2 (D1=D21), Wp= weekly paclitaxel (80 mg/m^2), (F)EC = 5-fluorouracil (500 mg/m^2), epirubicin (100 mg/m^2), cyclophosphamide (500 mg/m^2).

		Total (N=66)	No-pCR (N=37)	pCR (N=29)	
TILs (%)					p= 0.3523
	Median	10.0	10.0	10.0	
	(Range)	(1.0-95.0)	(1.0-60.0)	(1.0-95.0)	
TILs (cl)					p= 0.6836
	0-10%	36 (54.5%)	21 (58.3%)	15 (41.7%)	
	>10%	30 (45.5%)	16 (53.3%)	14 (46.7%)	
TILs (cl)					p= 0.7383
	0-30%	56 (84.8%)	32 (57.1%)	24 (42.9%)	
	>30%	10 (15.2%)	5 (50.0%)	5 (50.0%)	
PD-L1					p= 0.4932
	Negative (IC0)	31 (47.0%)	16 (51.6%)	15 (48.4%)	
	Positive (IC1/2/3)	35 (53.0%)	21 (60.0%)	14 (40.0%)	
TIM-3 (cl)					p= 0.6807
	<1%	45 (68.2%)	26 (57.7%)	19 (42.3%)	
	≥1%	21 (31.8%)	11 (52.3%)	10 (47.7%)	
TIM-3 (cl)					p= 0.7203
	0-4%	57 (86.4%)	31 (54.3%)	26 (45.7%)	
	≥5%	9 (13.6%)	6 (66.6%)	3 (33.4%)	
PD-L1 and TIM-3					NA
	Others	62 (93.9%)	34 (54.8%)	28 (45.2%)	
	PD-L1+/TIM-3+	4 (6.1%)	3 (75.0%)	1 (25.0%)	
LAG-3 (%)					p= 0.1242
	Median	2.5	2.0	3.0	
	(Range)	(0.0-37.0)	(1.0-60.0)	(0.0-37.0)	
LAG-3 (cl)					**p= 0.0066**
	0	15 (22.7%)	13 (86.6%)	2 (13.4%)	
	>0	51 (77.3%)	24 (47.0%)	27 (53.0%)	
LAG-3 (cl)					p= 0.7899
	0-9	49 (74.2%)	27 (55.1%)	22 (44.9%)	
	≥10	17 (25.8%)	10 (58.8%)	7 (41.2%)	

Supplementary table 2 - Description of the IME characteristics before chemotherapy, for the entire population, and function of NACT response (pCR group and no-pCR group).

		Total (n=66)	No-pCR (n=37)	pCR (n=29)	
TILs (%)					**p= 0.0026**
	Median	0.0	4.0	-5.0	
	(Range)	(-94.0: 60.0)	(-45.0: 55.0)	(-94.0: 60.0)	
TILs					**p= 0.0092**
	Decrease	31 (47.0%)	12 (32.4%)	19 (65.5%)	
	Stability	8 (12.1%)	4 (10.8%)	4 (13.8%)	
	Increase	27 (40.9%)	21 (56.8%)	6 (20.7%)	
PD-L1					**p= 0.0020**
	Negative -> Negative	20 (30.3%)	8 (21.6%)	12 (41.4%)	
	Positive -> Negative	18 (27.3%)	6 (16.2%)	12 (41.4%)	
	Negative -> Positive	11 (16.7%)	8 (21.6%)	3 (10.3%)	
	Positive -> Positive	17 (25.8%)	15 (40.5%)	2 (6.9%)	
TIM-3					p= 0.3580
	Negative -> Negative	17 (25.8%)	7 (18.9%)	10 (34.5%)	
	Positive -> Negative	4 (6.1%)	2 (5.4%)	2 (6.9%)	
	Negative -> Positive	28 (42.4%)	19 (51.4%)	9 (31.0%)	
	Positive -> Positive	17 (25.8%)	9 (24.3%)	8 (27.6%)	
LAG-3					p= 0.1323
	Median	-0.5	0.0	-1.0	
	(Range)	(-27.0: 10.0)	(-16.0: 8.0)	(-27.0: 10.0)	
LAG-3					**p= 0.0090**
	Negative -> Negative	5 (7.6%)	3 (8.1%)	2 (6.9%)	
	Positive -> Negative	6 (9.1%)	3 (8.1%)	3 (10.3%)	
	Negative -> Positive	10 (15.2%)	10 (27.0%)	0 (0.0%)	
	Positive -> Positive	45 (68.2%)	21 (56.8%)	24 (82.8%)	

Supplementary table 3 - Changes of IME characteristics induced by neoadjuvant chemotherapy in the overall population, in the no-pCR group and in the pCR group.

		Total (N=66)	No-pCR (N=37)	pCR (N=29)	
TILs (%)					**p= 0.0062**
	Median	10.0	15.0	5.0	
	(Range)	(1.0-70.0)	(5.0-70.0)	(1.0-70.0)	
TILs (cl)					p= 0.0719
	0-10%	35 (53.0%)	16 (43.2%)	19 (65.5%)	
	>10%	31 (47.0%)	21 (56.8%)	10 (34.5%)	
TILs (cl)					p= 0.4496
	0-30%	58 (87.9%)	31 (83.8%)	27 (93.1%)	
	>30%	8 (12.1%)	6 (16.2%)	2 (6.9%)	
PD-L1					**p= 0.0002**
	Negative (IC0)	38 (57.6%)	14 (37.8%)	24 (82.8%)	
	Positive (IC1/2/3)	28 (42.4%)	23 (62.2%)	5 (17.2%)	
TIM-3 (cl)					p= 0.1398
	<1%	21 (31.8%)	9 (24.3%)	12 (41.4%)	
	≥1%	45 (68.2%)	28 (75.7%)	17 (58.6%)	
TIM-3 (cl)					**p= 0.0141**
	0-4%	44 (66.7%)	20 (54.1%)	24 (82.8%)	
	≥5%	22 (33.3%)	17 (45.9%)	5 (17.2%)	
PD-L1 and TIM-3					**p= 0.0007**
	Others	54 (81.8%)	25 (67.6%)	29 (100.0%)	
	PD-L1+/TIM-3+	12 (18.2%)	12 (32.4%)	0 (0.0%)	
LAG-3 (%)					p= 0.6189
	Median	3.0	3.0	3.0	
	(Range)	(0.0-23.0)	(0.0-23.0)	(0.0-22.0)	
LAG-3 (cl)					p= 1.0000
	0	11 (16.7%)	6 (16.2%)	5 (17.2%)	
	>0	55 (83.3%)	31 (83.8%)	24 (82.8%)	
LAG-3 (cl)					p= 1.0000
	0-9	58 (87.9%)	32 (86.5%)	26 (89.7%)	
	≥10	8 (12.1%)	5 (13.5%)	3 (10.3%)	

Supplementary table 4 - Description of the IME characteristics after chemotherapy, for the entire population, and function of NACT response (pCR group and no-pCR group).

		Evt / N	3yr-OS	95% CI	
T					p= 0.6735
	T1/T2	6 /36	78.5%	57.6-89.9	
	T3/T4	7 /30	73.9%	50.8-87.4	
N					p= 0.3466
	N0	4 /32	82.4%	59.3-93.0	
	N+	9 /34	71.9%	51.5-84.9	
Grade SBR					p= 0.2615
	I or II	4 /12	67.3%	27.7-88.5	
	III	9 /53	77.6%	61.0-87.8	
Emboli					**p< 0.0001**
	No	6 /47	80.7%	61.6-90.9	
	Yes	5 /7	33.3%	4.6-67.6	
TILs					**p= 0.0112**
	0-10%	11 /36	63.4%	42.0-78.6	
	>10%	2 /30	91.2%	69.0-97.9	
TILs					p= 0.0815
	0-30%	13 /56	72.0%	55.6-83.2	
	>30%	0 /10	100.0%	NA	
PD-L1					p= 0.1111
	Negative (IC0)	9 /31	63.8%	41.6-79.4	
	Positive (IC1/2/3)	4 /35	88.4%	68.0-96.2	
TIM-3					p= 0.4014
	<1%	10 /45	74.2%	55.9-85.8	
	≥1%	3 /21	81.4%	52.6-93.6	
TIM-3					NA
	0-4%	11 /57	76.8%	60.8-86.9	
	≥5%	2 /9	75.0%	31.5-93.1	
LAG-3					p= 0.1553
	0	5 /15	61.5%	30.8-81.8	
	>0	8 /51	81.4%	64.5-90.8	
LAG-3					p= 0.3285
	0-9	11 /49	73.0%	55.1-84.6	
	>10	2 /17	85.1%	52.3-96.1	

Supplementary table 5 – Overall survival at 3 years according to clinical characteristics and to core biopsy immune biomarkers (before chemotherapy).

Conclusion et perspectives :

L'étude MIMOSA-1 apporte plusieurs enseignements importants. Tout d'abord, elle confirme que les cancers du sein triple négatifs sont spontanément immunogènes, avec un infiltrat en TILs fréquent, mais que la réponse immunitaire est inhibée, en raison de la fréquente expression des points de contrôle inhibiteurs que sont PD-L1 mais aussi TIM-3 et LAG-3. Ensuite, elle montre que la chimiothérapie a une influence très importante sur ce micro-environnement immunitaire et est capable de le modifier. Enfin, elle met en exergue le fait que l'infiltrat immunitaire a un poids pronostic majeur avec une signification différente selon qu'il est étudié avant ou après chimiothérapie.

En effet, notre étude souligne qu'une caractérisation du micro-environnement immunitaire, au-delà du comptage des TILs et de l'expression de PD-L1, pourrait être un paramètre pronostic fort en termes de survie globale après chimiothérapie néo-adjuvante, permettant d'identifier des patientes pour lesquelles un traitement adjuvant est nécessaire. Nous montrons que l'expression combinée de PD-L1 et de TIM-3 pourrait permettre d'identifier une population de mauvais pronostic.

Dans un premier temps, nous projetons de confirmer ces données préliminaires sur une série plus importante de patientes, de façon multicentrique, en sollicitant nos collègues d'autres centres de soins, en particulier ceux de la région du grand Sud-Ouest.

Dans un second temps, si ces résultats se confirment, on pourrait envisager de conduire une étude clinique prospective en adjuvant pour les patientes n'ayant pas obtenue une réponse histologique complète, sur la base des caractéristiques du micro-environnement immunitaire déterminées sur la pièce opératoire.

D'autre part, il serait intéressant d'évaluer la valeur prédictive de LAG-3 et de TIM-3 dans la réponse aux anti-PD-(L)1 dans les cancers du sein triple négatifs. Il est en effet possible que l'expression de LAG-3 et/ou de TIM-3 apporte(n)t une valeur additionnelle à celle de PD-L1 dans la prédiction de la sensibilité/résistance aux anti-PD-(L)1, permettant d'envisager des associations avec des anti-LAG-3 ou anti-TIM-3, déjà en développement dans des études cliniques de phases I/II.

Au total, notre travail devrait permettre d'améliorer les connaissances dans le domaine de l'immunologie des cancers du sein triple négatifs, afin d'améliorer la survie de ces patientes.

Pr. Jean-Pierre Delord

Président du jury de thèse

INSTITUT CLAUDIUS REGAUD
Pr Jean-Pierre DELORD
Directeur Général

INSTITUT CLAUDIUS REGAUD
1, Avenue Irène Joliot-Curie
IUCT-O
31059 TOULOUSE Cedex 9
Finess : 310782347
TVA : FR 72 776 926 370
SIRET : 776 926 370 00037

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
De Médecine Rangueil

8/10/2020

E. SERRANO

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE MEDECINE RANGUEIL

SARRADIN Victor 2020 TOU3 1681

Etude des modifications du micro-environnement immun induites par la chimiothérapie néo-adjuvante dans les cancers du sein triple négatifs : Etude MIMOSA

RESUME EN FRANÇAIS :
Contexte : Le microenvironnement immunitaire (MI) des cancers du sein triple négatifs (CSTN) et ses modifications induites par la chimiothérapie néoadjuvante (CTNA) restent à caractériser. L'objectif de notre étude était de décrire les changements du MI induits par la CTNA et la valeur pronostique de biomarqueurs immunitaires spécifiques.
Méthode : une cohorte de 66 patientes avec un CSTN avec des échantillons appariés pré- et post-CTNA a été constituée. Nous avons évalué les lymphocytes infiltrants les tumeurs (TILs) sur des lames colorées à l'hématoxyline-éosine et l'expression de PD-L1, TIM-3 et LAG-3 par immunohistochimie.
Résultats : le nombre de TILs et l'expression de PD-L1 n'étaient pas significativement différents avant et après CTNA dans la population globale, mais une différence statistiquement significative a été observée selon la réponse à la chimiothérapie. Le nombre de TILs a diminué chez 65,5% des patientes ayant obtenu une réponse histologique complète (RHC), alors qu'il a augmenté chez 56,8% des patientes sans RHC (p=0,0092). La perte d'expression de PD-L1 était plus fréquente chez les patientes en RHC (41,4% vs 16,2%, p=0,0020). L'expression de TIM-3 était significativement plus élevée après CTNA (p<0,0001) et le gain était plus fréquent chez les patientes sans RHC que chez celles avec RHC (51,4% vs 31%, p=0,3580). L'expression de LAG-3 a diminué de manière significative après CTNA, sans différence selon la réponse à la chimiothérapie. Avant CTNA, un taux élevé de TILs (>10%) était significativement associé à une meilleure survie globale (SG), p=0,0112. Après CTNA, la positivité de PD-L1 et la forte positivité de TIM-3 (≥5%) étaient indépendamment associées à une SG significativement plus mauvaise (p=0,0055 et p=0,0274 respectivement). Les patientes positives à la fois pour ces deux biomarqueurs avaient le plus mauvais pronostic (p=0,0020), y compris tenant compte uniquement des patientes n'ayant pas obtenu de RHC (p=0,0479).
Conclusion : des modifications significatives du MI sont induits par la CTNA dans les CSTN, et l'expression de PD-L1 et de TIM-3 après CTNA pourraient avoir une forte valeur pronostique.

TITRE EN ANGLAIS : Immune microenvironment changes induced by neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancers: the MIMOSA study

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

MOTS-CLÉS : cancer du sein triple négatif, chimiothérapie néo-adjuvante, microenvironnement immunitaire, lymphocytes infiltrant la tumeur, TILs, PD-L1, TIM-3, LAG-3, point de contrôle immunitaire

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :
Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directrice de thèse : Pr Florence DALENC