

**Recherche de lymphocytes T CD8 spécifiques des cellules
tumorales dans les carcinomes canauxaires *in situ* du sein**

Alix Devaux

Juin 2021

**Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences
biomédicales et pharmaceutiques
Secteur des sciences de la santé**

Président du Jury

Prof. François Huaux
Institut de recherche expérimentale et clinique (IREC)
Université catholique de Louvain

Membres du Jury

Prof. Frédérique Penault-Llorca
Centre Jean-Perrin
Université de Clermont-Ferrand (France)

Prof. Christophe Caux
Centre Léon Bérard
Centre de recherche en cancérologie de Lyon (France)

Prof. Pierre van der Bruggen
Ludwig institute for cancer research
Institut de Duve
Université catholique de Louvain

Prof. Jean-Pascal Machiels
Cliniques universitaires Saint-Luc, service d'oncologie médicale
Institut de recherche expérimentale et clinique (IREC)
Université catholique de Louvain

Dr. Jean-Luc Canon
Pôle cancer et maladies du sang (chef)
Grand Hôpital de Charleroi, service d'oncologie (GHdC)

Superviseurs

Prof. Pierre Coulie
Institut de Duve
Université catholique de Louvain

Dr. Javier Carrasco
Unité de recherche translationnelle, Institut de Pathologie et Génétique (IPG)
Grand Hôpital de Charleroi, service d'oncologie (GHdC)

« Seulement, plus je cherchais, et puis moins j'savais... Maintenant je sais, je sais qu'on ne
sait jamais »

Jean Gabin

« Ces choses au fond de nous qui nous font veiller tard »

Jean-Jacques Goldman

Remerciements

Non pas par ce qu'il est de coutume de commencer par remercier son promoteur mais parce que sans votre confiance je n'aurai jamais réalisé ce travail, merci à vous Pierre. Vous m'avez laissée avancer de manière autonome, apprendre de mes erreurs tout en restant présent afin que je maintienne le cap. J'ai beaucoup apprécié nos échanges de réflexions scientifiques et générales. J'espère rester aussi curieuse que vous tout au long de ma carrière.

Je ne me serais jamais lancée dans cette aventure sans le coup de pouce de Javier et Jean-Luc, deux fervents défenseurs de cette formation scientifique pour les médecins. Merci à vous deux d'avoir cru en moi et pour vos encouragements réguliers.

Merci également à Jean-Pascal Machiels de m'avoir donné l'opportunité de goûter à la recherche dans la cadre de ma formation d'oncologue.

Un travail de thèse, c'est un travail d'équipe, celui-ci tout particulièrement. Merci à Orian et Kevin de m'avoir pris sous leur aile, moi qui ne savais même pas tenir une pipette au départ. Orian, ce n'était pas toujours évident de te suivre mais j'ai beaucoup appris grâce à toi, j'ose espérer t'avoir également apporté quelque chose.

Durant ces 4,5 années, vous avez été à mes côtés tous les jours (ou presque), merci de m'avoir accueillie, pour votre aide, vos conseils, votre soutien, votre intérêt, votre rigueur et votre patience. J'ai adoré vivre ces années avec vous, nos débats me manqueront. Je pense bien sûr à vous mes collègues : Tiphane, Nathalie, Catherine, Gérald, Walther, Nicolas, Charlotte, Marie-Sophie et Athina. De belles amitiés se sont créées et j'espère sincèrement ne pas vous perdre de vue. Un merci particulier à toi, Tiphane, tu as été un second pilier important dans cette expérience tant au niveau professionnel que personnel.

Merci à mon étudiante, Raphaële, je n'ai su t'encadrer qu'un certain temps et tu as permis de continuer à faire avancer le projet pendant mon congé de maternité. Bonne chance pour ta thèse.

Un grand merci à toi Nicolas Dauguet, pour ta flexibilité pour tous ces tris ainsi que tes conseils avisés.

Perdue dans les méandres de la bio-informatiques, Nicolas Van Baren tu as réussi à m'éclairer sur cet aspect indispensable de la recherche actuelle. Merci pour ta précieuse aide et désolée pour les insomnies.

Dans tout travail, il y a des personnes qu'on qualifie « de l'ombre » mais sans qui rien n'avance, merci Suzanne pour ta bienveillance, ton dévouement et ton obsession des choses bien faites.

Beaucoup d'autres personnes se sont impliquées dans ce projet, y ont consacré du temps et m'ont fait bénéficier de leur expertise dans le domaine du cancer sur sein : merci Mieke, Pr. Christine Galant, Pr. Martine Berlière, Pr. François Duhoux, Dr. Maud Coyette, Dr. Amandine Gerday, Elodie et Nathalie.

Parfois, il est bon de pouvoir discuter avec d'autres personnes, extérieures au projet mais embarquées dans le même bateau, qui vous permettent de prendre du recul. Merci à ces autres

médecins « chercheurs », David, Pierre-Florent, Rachel, Cédric, Guillaume, Julien et Sophie, et courage à ceux qui terminent.

Merci au Pr. François Huaux d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Merci à mes deux membres externes, Pr. Frédérique Penault-Llorca et Pr. Christophe Caux pour votre intérêt non feint pour ce travail, vos suggestions et la discussion enrichissante lors de ma défense privée.

Merci au Pr. Pierre van der Bruggen pour vos questions tout aussi intéressantes que surprenantes.

Merci à Isabelle, Manu, Sandy et Ahmad de l'IPG de m'avoir appris les bases de la biologie moléculaire.

Merci à toutes les personnes de l'institut de Duve qui m'ont aidé de près ou de loin, trop nombreuses pour toutes les citer sans en oublier.

Merci aux patientes qui ont participé de manière enthousiaste au projet juste pour faire avancer la recherche sans en tirer de bénéfice immédiat.

Je terminerai avec la personne qui a vécu cette expérience de manière aussi intense que moi, m'a encouragée à la faire, m'a soutenue dans les mauvais moments et poussée à persévérer, qui m'a félicité plus d'une fois, qui a surtout eu plus confiance en moi que moi mais qui est tout de même soulagée que cela se termine. Je dédie ce travail à mon homme, mari en or et papa d'exception, merci d'être là à chaque instant.

LISTE DES FIGURES.....	3
LISTE DES TABLES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	9
1. IMMUNOTHERAPIE TUMORALE	11
1.1. <i>Principes de base de l'immunité adaptative.....</i>	11
1.2. <i>Antigènes tumoraux reconnus par des lymphocytes T.....</i>	15
1.3. <i>Mécanismes d'immunosuppression</i>	19
2. IMMUNOTHERAPIES ACTUELLES DU CANCER	20
3. LE CANCER DU SEIN INVASIF	23
3.1. <i>Implication du système immunitaire dans le cancer du sein</i>	24
3.1.1. « Tumor-infiltrating lymphocytes » ou TILs.....	24
3.1.2. Structures lymphoïdes tertiaires (TLS: tertiary lymphoid structure).....	25
3.1.3. Lymphocytes T régulateurs (Tregs).....	26
3.2. <i>Immunogénicité faible.....</i>	29
3.2.1. Efficacité de l'immunothérapie	29
3.2.2. Lymphocytes T spécifiques des cellules tumorales de carcinomes du sein.....	35
4. LE CARCINOME CANALAIRE <i>IN SITU</i> DU SEIN (CCIS)	39
4.1. <i>Histoire naturelle du CCIS.....</i>	40
4.1.1. La régression spontanée.....	40
4.1.2. CCIS non traité et non évolutif.....	40
4.1.3. CCIS évolutif.....	44
4.1.4. Récidive après traitement	44
4.2. <i>Comparaison entre le CCIS et le CCI d'un point de vue moléculaire</i>	45
4.3. <i>Rôle du micro-environnement.....</i>	48
4.3.1. Les cellules myoépithéliales	48
4.3.2. Les fibroblastes.....	49
4.3.3. L'angiogenèse	50
4.4. <i>Implication du système immunitaire.....</i>	53
4.4.1. Les TILs.....	53
4.4.2. Les TILs ou T CD8 ⁺	54
4.4.3. Les Tregs	55
4.4.4. Signatures d'expression de gènes.....	55
4.4.5. Objectif du travail et stratégie.....	57
RESULTATS	59
1. CRITERES DE SELECTION DES PATIENTES ET DESCRIPTION DES PRELEVEMENTS EFFECTUES.....	61
2. CARACTERISATION DES ECHANTILLONS	61
3. PRESENCE DE LYMPHOCYTES T ESSENTIELLEMENT AU POURTOUR DES CANAUX GALACTOPHORES ENVAHIS PAR DU CCIS ...	63

4.	LYMPHOCYTES T EXTRAITS DES TISSUS TUMORAUX : MARQUEURS D'ACTIVATION	68
5.	LYMPHOCYTES T ANTI-TUMORAUX CANDIDATS : SELECTION DES CLONOTYPES REPETES ET ENRICHIS DANS LES PRELEVEMENTS TUMORAUX.....	78
6.	SELECTION DES ANTIGENES TUMORAUX CANDIDATS	87
6.1.	<i>Sélection des antigènes mutés</i>	87
6.2.	<i>Sélection des antigènes de type MAGE</i>	92
6.3.	<i>HER2</i>	95
7.	TESTS DE RECONNAISSANCE DES PEPTIDES TUMORAUX CANDIDATS PAR LES TCR RECONSTRUITS	97
8.	POSSIBLE RECONNAISSANCE D'UN ANTIGENE MUTE PAR UN CLONOTYPE DOMINANT TREG ACTIVE DE LA PATIENTE KOBE	104
DISCUSSION		109
1.	RESUME DE NOS RESULTATS.....	110
2.	PRINCIPALES LIMITES DE NOTRE TRAVAIL.....	111
2.1.	<i>Taille et représentativité de la cohorte</i>	111
2.2.	<i>Sélection des TCR d'intérêt</i>	111
2.3.	<i>Sélection des antigènes candidats</i>	112
3.	ANTIGENES TUMORAUX RECONNUS PAR DES TREGS	117
4.	IMMUNOSURVEILLANCE DE LA GLANDE MAMMAIRE	119
5.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	120
MATERIEL ET METHODES.....		121
1.	PATIENTES ET ECHANTILLONS	122
2.	EXTRACTION DES PBMCs ET DES LYMPHOCYTES INFILTRANT LES TISSUS	122
3.	CULTURES CELLULAIRES	123
4.	IMMUNOHISTOCHEMIE	124
5.	CYTOMETRIE DE FLUX ET TRI CELLULAIRE	125
6.	EXTRACTION ARN ET ADN.....	127
7.	SÉQUENÇAGE DE L'EXOME (WES : WHOLE-EXOME SEQUENCING)	127
8.	RNASEQ.....	128
9.	REPERTOIRES TCR	128
10.	TYPAGE HLA CLASSE I ET II	129
11.	PEPTIDES.....	129
12.	RECONSTRUCTION DE SEQUENCES <i>TRA</i> ET <i>TRB</i>	129
13.	EXPRESSION DES TCR D'INTERET PAR LES JURKAT-2D3 (NFAT-GFP)	130
14.	TEST DE RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE	130
15.	ANALYSES STATISTIQUES	131
REFERENCES		132

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1. ORGANISATION DES SEGMENTS DE GENES DANS <i>TRA</i> ET <i>TRB</i> DU TCR ET REARRANGEMENT VDJ DU <i>TRB</i>	12
FIGURE 1.2. CATEGORIES D'ANTIGENES TUMORAUX RECONNUS PAR DES LYMPHOCYTES T.....	18
FIGURE 1.3. CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES SOUS-TYPES MOLECULAIRES DE CANCER DU SEIN INVASIF.....	22
FIGURE 1.4. ETUDE IMPASSION130 : SURVIE GLOBALE (OS) ET SURVIE SANS PROGRESSION (PFS).....	30
FIGURE 1.5. ETUDE KEYNOTE-355 : SURVIE SANS PROGRESSION (PFS).....	32
FIGURE 1.6. DEVELOPPEMENT D'UN CARCINOME CANALAIRE <i>IN SITU</i> (CCIS) ET INVASIF (CCI).....	38
FIGURE 1.7. PROPORTION DE TILS DANS LE STROMA DES TUMEURS CCIS EN FONCTION DU SOUS-TYPE MOLECULAIRE.....	52
FIGURE 1.8. STRATEGIE D'IDENTIFICATION DE LA SPECIFICITE DES T EXTRAITS DES CCIS.....	56
FIGURE 2.1. ALGORITHME DE SELECTION DES PATIENTES ET SOUS-TYPES MOLECULAIRES DES TUMEURS.....	60
FIGURE 2.2. LOCALISATION DES CELLULES IMMUNITAIRES DANS UNE LESION DE CCIS.....	64
FIGURE 2.3. LOCALISATION DES CELLULES IMMUNITAIRES DANS LE TISSU EXTRA-TUMORAL DE CETTE LESION.....	65
FIGURE 2.4. PROPORTION DES POPULATIONS DE CELLULES IMMUNITAIRES EN FONCTION DU TYPE DU TISSU MAMMAIRE.....	67
FIGURE 2.5. COMPARAISON DE LA PROPORTION DES POPULATIONS DE CELLULES IMMUNITAIRES ENTRE LESIONS DE CCIS PURS ET MIXTES CCIS-CCI.....	67
FIGURE 2.6. STRATEGIE D'ANALYSE PAR CYTOMETRIE DE FLUX DES POPULATIONS DE CELLULES IMMUNITAIRES PRESENTES DANS LES DIFFERENTS PRELEVEMENTS.....	69
FIGURE 2.7. QUANTITE DE LYMPHOCYTES T TOTAUX, T CD4, T CD8 ET B EXTRAITS DES DIFFERENTS PRELEVEMENTS.....	71
FIGURE 2.8. PROPORTION DE LYMPHOCYTES T CD4 ET CD8 EXPRIMANT LES MARQUEURS D'ACTIVATION ET DE RESIDENCE TISSULAIRE.....	73
FIGURE 2.9. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS D'ACTIVATION PAR LA POPULATION DE T CD8 RESIDENTS DES TISSU (TISSUE-RESIDENT MEMORY, TRM).....	75

FIGURE 2.10. MISE EN EVIDENCE DE TREGS ACTIVES DANS LES PRELEVEMENTS TUMORAUX.....	77
FIGURE 2.11. REPERTOIRE <i>TRB</i> DES 10 CLONOTYPES T CD8 LES PLUS FREQUENTS DANS LA TUMEUR POUR CHAQUE PATIENTE.....	82
FIGURE 2.12. REPERTOIRE <i>TRB</i> DES 10 CLONOTYPES T CD4 LES PLUS FREQUENTS DANS LA TUMEUR POUR CHAQUE PATIENTE.....	84
FIGURE 2.13. REPERTOIRE <i>TRB</i> DES 10 CLONOTYPES TREGS ACTIVES LES PLUS FREQUENTS DANS LA TUMEUR POUR CHAQUE PATIENTE.....	85
FIGURE 2.14. STRATEGIE D'ANALYSE ET DE SELECTION DES MUTATIONS CANDIDATES.....	89
FIGURE 2.15. CONTROLE DE STIMULATION PAR UN POOL DE PEPTIDES NY-ESO-1.....	94
FIGURE 2.16. CONTROLE DE STIMULATION PAR DES POOLS DE PEPTIDES HER2.....	96
FIGURE 2.17. PROTOCOLE DU TEST DE RECONNAISSANCE D'ANTIGENES TUMORAUX.....	97
FIGURE 2.18. CONTROLES DES TESTS DE RECONNAISSANCE AVEC PEPTIDES MUTES DE 25 ACIDES AMINES.....	99
FIGURE 2.19. TEST DE RECONNAISSANCE DES PEPTIDES MUTES CANDIDATS PAR LES TCR CD8 DE LA PATIENTE RAFI.....	101
FIGURE 2.20. TEST DE RECONNAISSANCE DES PEPTIDES MUTES CANDIDATS PAR UN TCR CD8 DE LA PATIENTE KYLO.....	103
FIGURE 2.21. TEST DE RECONNAISSANCE DES PEPTIDES MUTES CANDIDATS PAR LE TCR TREG ACTIVE PREDOMINANT DE LA PATIENTE KOBE.....	105
FIGURE 2.22. COMPARAISON DE LA STIMULATION PAR LES PEPTIDES MUTES ET SAUVAGES DU TCR TREGC1 DE LA PATIENTE KOBE.....	107
FIGURE 3.1. AUTRES SOURCES POTENTIELLES D'ANTIGENES SPECIFIQUES DE TUMEURS.....	113

LISTE DES TABLES

TABLE 1.1. EXPRESSION DE GENES CANCER GERMLINE DANS DIFFERENTES TUMEURS.....	16
TABLE 1.2. ETUDES DE PHASE III ASSOCIANT DES ANTICORPS ANTI-PD-1/PD-L1 A LA CHIMIOTHERAPIE NEO-ADJUVANTE.....	33
TABLE 1.3. CARACTERISTIQUES TUMORALES DE 6 CCI ET ANALYSE DE LA SPECIFICITE DES TILs CD8 ⁺ EXTRAITS.....	36
TABLE 1.4. ETUDES ANALYSANT LA PROGRESSION OU LA SURVIE DE CCIS NON TRAITES CHIRURGICALEMENT APRES BIOPSIE DIAGNOSTIQUE.....	42
TABLE 2.1. DONNEES DE REPERTOIRE TCR β DES LYMPHOCYTES T EXTRAITS DES TISSUS TUMORAUX ET EXTRA-TUMORAUX POUR CHAQUE PATIENTE.....	79
TABLE 2.2. SELECTION DES ANTIGENES MUTES CANDIDATS.....	91
TABLE 2.3. EXPRESSION EN TPM DE GENES DE MENAGE, <i>ERBB2</i> , ET DE TYPE <i>MAGE</i>	93
TABLE 2.4. EXPRESSION DE LA PROTEINE HER2.....	95
TABLE 2.5. RESULTATS DES TESTS DE RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE.....	100
TABLE 3.1. POPULATION DE TREGS ACTIVES DANS LES TUMEURS <i>IN SITU</i>	117
TABLE 4.1. LISTE DES ANTICORPS MONOCLONAUX UTILISES POUR LES ANALYSES IMMUNO- HISTOCHIMIQUES.....	125
TABLE 4.2. LISTE DES REACTIFS UTILISES EN CYTOMETRIE DE FLUX.....	126

LISTE DES ABREVIATIONS

AAS	ACIDES AMINES
ADN	ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE
ADNc	-COMPLÉMENTAIRE
AF	ALEXA-FLUOR
APC	ALLOPHYCOCYANIN
ARN	ACIDE RIBONUCLÉIQUE
ARNm	-MESSAGE
BCS	BREAST CONSERVATIVE SURGERY
BCSS	BREAST-CANCER SPECIFIC SURVIVAL
BV	BRILLANT VIOLET
CCI	CARCINOME CANALAIRE INVASIF
CCIS	CARCINOME CANALAIRE IN SITU
CD	CLUSTER OF DIFFERENTIATION
CDR3	COMPLEMENTARY DETERMINING REGION 3
CTL	CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE
CUSL	CLINIQUES UNIVERSITAIRES SAINT-LUC
DCIS	DUCTAL CARCINOMA IN SITU
DMSO	DIMETHYL SULFOXIDE SOLVANT
EDTA	ACIDE ETHYLENEDIAMINETETRAACETIQUE
EMT	EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION
ET	EXTRA-TUMORAL
FFPE	FORMALIN-FIXED PARAFFIN-EMBEDDED
FISH	FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDATION
FITC	FLUORESCEIN ISOTHIOCYANATE
FOXP3	FORKHEAD BOX P3
FVD	FIXABLE VIABILITY DYE
GARP	GLYCOPROTEIN A REPETITION PREDOMINANT
GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN
GITR	GLUCOCORTICOID-INDUCED TNFR-RELATED GENE
GPS	GLUTAMAX-PENICILLINE-STREPTOMICINE
HLA	HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN
ICOS	INDUCIBLE T-CELL COSTIMULATOR
IFN γ	INTERFERON GAMMA
INDELS	INSERTIONS/DÉLÉTIONS

K _D	CONSTANTE DE DISSOCIATION K
MAGE	MELANOMA ANTIGEN GENE
MDSCs	MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS
MHC	MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX
MSI	MICROSATELLITE INSTABILITY
NFAT	NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED T-CELLS
OCT	OPTIMAL CUTTING TEMPERATURE COMPOUND
OS	OVERALL SURVIVAL
PBS	PHOSPHATE BUFFERED SALIN
PCR	POLYMERASE CHAIN REACTION
PCR	PATHOLOGICAL COMPLETE RESPONSE
PE	PHYCOERYTHRIN
PERCP	PERIDININ-CHLOROPHYLL-PROTEIN
PFS	PROGRESSION FREE SURVIVAL
PMBCs	PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS
RFP	RED FLUORESCENT PROTEIN
RFS	RECURRENCE FREE SURVIVAL
SMA	ALPHA SMOOTH MUSCLE ACTINE
TAP	TRANSPORTER ASSOCIATED WITH ANTIGEN PROCESSING
TCGA	THE CANCER GENOME ATLAS
TCR	T CELL RECEPTOR
TGF β	TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA
TILs	TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES
TN	TRIPLE NÉGATIF
TREGs	LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS
TRM	TISSUE-RESIDENT MEMORY

INTRODUCTION

Il est aujourd'hui bien établi que notre système immunitaire adaptatif, et en particulier les lymphocytes T cytolytiques (CTL), est capable de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales et de les détruire. Dans les années 1990 il a été montré que les cellules tumorales portent des antigènes spécifiques de tumeurs, que des CTL présents spontanément chez des patients cancéreux peuvent reconnaître. Ensuite, de nombreux groupes ont essayé, avec des succès divers, d'immuniser des patients cancéreux avec ces antigènes spécifiques de tumeurs, ou d'amplifier *in vitro* des CTL anti-tumoraux puis de les réinjecter aux patients. Puis la découverte de co-récepteurs inhibiteurs à la surface des lymphocytes T et la possibilité de bloquer ces inhibitions au moyen d'anticorps monoclonaux a mené à une approche d'immunostimulation globale, qui fut appliquée aux cancers ¹. Les anticorps bloquant les voies CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4) et PD-1 (Programmed cell death protein 1) ont rapidement généré des résultats inespérés, d'abord dans le mélanome puis le cancer du poumon non à petites cellules. En 2018, cette avancée médicale a valu le Prix Nobel de physiologie ou médecine à ses concepteurs, James Allison et Tasuku Honjo.

Cependant, la majorité des patients cancéreux ne bénéficient pas de ces anticorps bloquants les voies CTLA-4 ou PD-1 car les cancers parmi les plus fréquents tels que ceux du sein, du colon et de la prostate n'y répondent pas ou très peu. Pourtant, dans le cancer du sein particulièrement, les TILs (tumor-infiltrating lymphocytes) sont un facteur pronostic et prédictif de la réponse à la chimiothérapie, ce qui laisse penser que ces tumeurs ne sont pas complètement ignorées du système immunitaire. Depuis plusieurs années nous étudions l'immunogénicité du cancer du sein, cherchant à mettre en évidence des réponses lymphocytaires T spontanées spécifiques des cellules tumorales du sein et de les caractériser. Ceci afin de comprendre quelle approche de l'immunothérapie pourrait être la plus efficace pour traiter ce type de cancer.

1. Immunothérapie tumorale

1.1. Principes de base de l'immunité adaptative

Pour des raisons surtout didactiques notre immunité est classiquement divisée en deux systèmes: inné et adaptatif. Le premier est le plus ancien dans l'évolution, utilise des cellules myéloïdes comme les neutrophiles, monocytes, macrophages et cellules dendritiques, les cellules NK, de très nombreux facteurs solubles, depuis le complément jusqu'aux défensines, et des mécanismes tels que la fièvre, l'inflammation ou les barrières physiques comme la peau ou le mucus. L'immunité innée suffit à défendre la majorité des êtres vivants sur terre et son rôle en immunologie tumorale n'est pas négligeable. Mais nous ne l'utiliserons quasi pas dans ce travail.

Il y a environ 450 millions d'années, apparaissent conjointement les ancêtres des molécules d'histocompatibilité, des lymphocytes B et T avec les immunoglobulines et les récepteurs T avec leur diversité considérable, et le facteur de transcription AIRE dans le thymus ². Depuis les chondrichthyens (requins, raies), vertébrés gnathostomes au squelette cartilagineux, nous disposons donc, en plus de l'immunité innée, d'une immunité dite adaptative et les deux systèmes vont évoluer de concert. La nouveauté majeure de l'immunité adaptative est l'apparition de récepteurs encodés par des séquences d'ADN qui sont produites par des recombinaisons au hasard entre des familles de segments de gènes, ce qui génère une énorme diversité, gage de trouver pour chaque intrus les récepteurs qui vont le reconnaître. Les cellules porteuses de ces récepteurs -chaque cellule porte une seule espèce de récepteur- vont proliférer suite à cette reconnaissance et leur répertoire variera donc d'un individu à l'autre en fonction des intrus rencontrés. Désormais l'immunité s'adapte chez chacun, une révolution.

Pour les lymphocytes B, le récepteur est une immunoglobuline de surface qui pourra ensuite être sécrétée sous forme d'anticorps. Elle peut donc reconnaître des antigènes extracellulaires, solubles ou à la surface d'agents infectieux ou de cellules. Une particularité est que les séquences de parties variables d'immunoglobulines pourront encore changer après le premier contact du lymphocyte B naïf avec son antigène: des mutations somatiques vont survenir dans ces régions codantes de l'ADN et certaines d'entre elles, non synonymes, pourront améliorer l'affinité de l'immunoglobuline pour l'antigène. Les lymphocytes B plus affins pour leur antigène proliféreront plus que les autres et l'affinité moyenne des anticorps produits va donc augmenter au décours de la réponse immunitaire et des contacts répétés avec les mêmes antigènes. Ce processus de mutations somatiques menant à une maturation d'affinité n'existe pas pour les lymphocytes T.

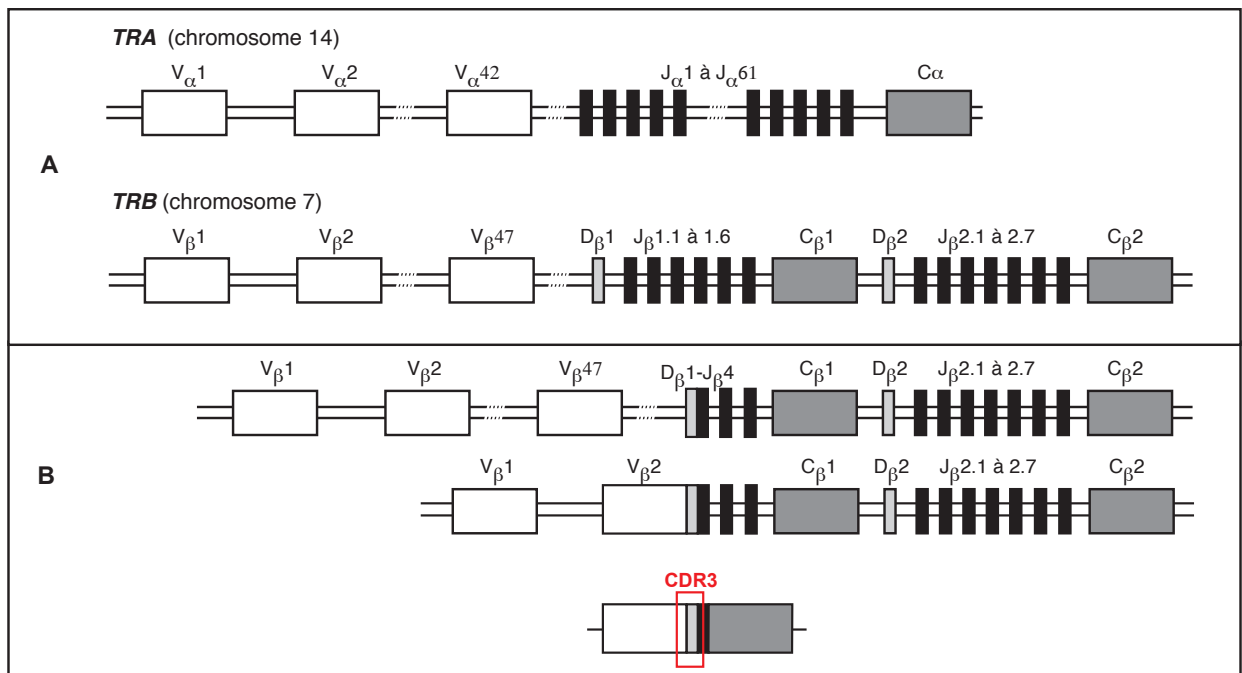


Figure 1.1. Organisation des segments de gènes dans *TRA* et *TRB* du TCR et réarrangement VDJ du *TRB*.
A. Configuration germinale de *TRA* et *TRB*.
B. Représentation d'un réarrangement DJ puis VDJ (V_β2-D_β1-J_β4) dans *TRB*, et ARN messager correspondant.
La région CDR3 est encadrée en rouge.

Revenons à la génération des répertoires de lymphocytes B et T, en nous focalisant sur les T, objet de ce travail. Le récepteur des lymphocytes T (T cell receptor, TCR) est composé de deux chaînes, α et β , encodées par les gènes *TRA* et *TRB*. Une catégorie de lymphocytes T porte des récepteurs formés de deux autres chaînes, γ et δ . Les chaînes α et β des TCR sont des glycoprotéines comportant une partie variable amino-terminale et une partie constante qui est ancrée dans la membrane plasmique. *TRA* et *TRB* comportent des familles de segments de gènes: V (Variable) et J (Joining) pour *TRA*, V, D (Diversity) et J pour *TRB* (Figure 1.1). Ces segments de gènes codent pour les parties variables des récepteurs. Ces familles sont suivies des séquences codant pour les parties constantes. Dans *TRB* la notion de 'famille' de segments D est particulière: il y a deux régions géniques comportant chacune 1 seul D, 6 ou 7 J suivis de C.

Lors de la maturation des thymocytes, des recombinaisons somatiques vont survenir entre des segments D et J puis V et DJ pour *TRB* puis entre des segments V et J pour *TRA*. La diversité de TCR obtenue simplement par ces combinaisons entre membres de familles de segments de gènes, et par la combinaison d'une chaîne α et d'une chaîne β , est de $(42 \times 61) \times (47 \times 13) = 1\,565\,382$. Mais ces recombinaisons ne juxtaposent pas simplement les séquences germinales, les jonctions sont dites imprécises car elles s'accompagnent de la délétion puis de l'insertion

d'un nombre variable de nucléotides quelconques entre D et J puis entre V et D pour *TRB* et entre V et J pour *TRA*. Il y a donc dans le produit recombiné final des nucléotides qui ne se trouvaient pas dans l'ADN germinale: les nucléotides N. Il peut y en avoir jusqu'à 20. Cela augmente considérablement la diversité des TCR produits. Théoriquement, cette diversité pourrait atteindre 10^{15} . En pratique elle est estimée autour de 10^{10-3} et des échantillons de sang contiennent de $5 \text{ à } 20 \times 10^6$ TCR différents ⁴. Parce qu'il y a deux recombinaisons pour générer une séquence TCR β et une seule pour TCR α , la diversité des chaînes β est plus grande que celle des chaînes α .

Au contraire des lymphocytes B, les lymphocytes T reconnaissent des antigènes qui proviennent de l'intérieur des cellules. Ils sont très importants pour nos défenses contre les bactéries intracellulaires et les virus. Chaque lymphocyte T porte environ 10^5 TCR, tous identiques mais différents d'une cellule à l'autre. Une première catégorie de ces lymphocytes portent le corécepteur CD8 et ont des TCR qui reconnaissent des peptides de 8 à 11 acides aminés, le plus souvent 9. Ces peptides sont présentés par des molécules d'histocompatibilité de classe I, chez l'homme les molécules HLA-A, HLA-B et HLA-C. Les peptides sont en conformation étendue, liés de manière non covalente dans une fente présente à la surface de la molécule HLA ⁵. Chaque molécule HLA présente un seul peptide antigénique. Ces peptides proviennent en majorité de protéines cytosoliques encodées par du matériel génétique qui se trouve dans la cellule reconnue. Ce matériel génétique peut être propre à la cellule ou d'origine infectieuse. Ces protéines, le plus souvent parce qu'elles sont ubiquitinées ou parce qu'elles sont mal repliées pendant leur synthèse, sont digérées par le protéasome. Les peptides résultant -de 20 à 40 acides aminés- sont activement transportés dans le réticulum endoplasmique par TAP (Transporter Associated with antigen Processing) puis sont encore raccourcis jusqu'à 9 acides aminés pour pouvoir se lier à une molécule HLA. Après liaison de la β 2-microglobuline, le trimère peptide/chaîne lourde HLA/ β 2m migre vers la surface de la cellule et peut être reconnu par des TCR.

N'importe quel peptide ne se lie pas à n'importe quelle molécule HLA. Les fentes de présentation peptidique des molécules HLA comportent dans leur plancher des poches de tailles et compositions différentes (hydrophobe, chargée positivement ou négativement) qui accueillent les chaînes latérales d'acides aminés du peptide. Le nombre, la position et la composition de ces poches déterminent quels peptides peuvent être présentés. Inversement, la présence d'un motif d'ancrage particulier, par exemple un petit acide aminé hydrophobe en position 2 et un résidu chargé positivement en position 9, détermine qu'un peptide peut être

présenté pas une molécule HLA donnée. Les motifs d'ancrage varient d'une molécule HLA à l'autre. Le polygénisme des molécules HLA (A, B et C) augmente donc notre capacité à présenter plus de peptides antigéniques différents, c'est-à-dire avec des motifs d'ancrage différents. C'est un avantage pour chaque individu. Le très grand polymorphisme des gènes HLA, de son côté, fait en sorte que nos capacités de présentation de peptides varient d'un individu à l'autre. Face aux antigènes d'origine infectieuse, c'est un avantage pour l'espèce. De ces règles de présentation antigénique résulte le fait que face à une séquence protéique chez un individu avec un typage HLA donné, soit le plus souvent 6 molécules HLA de classe I, on peut utiliser les motifs d'ancrage correspondants pour prédire quels peptides dérivés de cette protéine sont susceptibles d'être présentés aux lymphocytes T de cette personne.

Une deuxième catégorie de lymphocytes T portent le corécepteur CD4 et reconnaissent des peptides plus longs, de 14 à 26 acides aminés, présentés par une molécule d'histocompatibilité de classe II: HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR. Dans ce cas les peptides proviennent de protéines extracellulaires ou membranaires empruntant la voie de l'endocytose.

Les lymphocytes T CD8⁺ se différencient souvent en cellules cytolytiques, capables de lyser des cellules infectées ou tumorales. Quasi toutes les cellules nucléées de l'organisme, sauf les cellules germinales ou trophoblastiques, peuvent exprimer des molécules HLA de classe I, et donc être détruites par des lymphocytes T cytolytiques CD8⁺. C'est bien entendu crucial dans notre défense contre les pathogènes intracellulaires.

Les lymphocytes T CD4⁺ ont des rôles plus variés que les CD8⁺: collaborer avec les lymphocytes B pour augmenter l'efficacité des réponses anticorps (augmentation d'affinité par mutations somatiques, commutation isotypique depuis IgM vers IgG ou IgA ou IgE, différenciation en lymphocytes B mémoires), avoir un rôle proinflammatoire via des cytokines comme l'IL-17 ou un rôle immunosuppresseur dans le cas des T régulateurs. L'activation des lymphocytes T CD4 dépend de cellules qui portent des molécules HLA de classe II, et en situation normale il ne s'agit que de cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques ou les lymphocytes B.

L'activation des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ dont les TCR reconnaissent leur antigène, c'est-à-dire un complexe HLA/peptide particulier, le signal d'activation est transduit par le complexe CD3 associé au TCR. Plusieurs voies de signalisation mènent aux facteurs de transcription NFAT, NF-κB et AP-1 qui vont déclencher la réponse transcriptionnelle ⁶. Cette dernière peut inclure la prolifération cellulaire, la sécrétion de cytokines, l'expression à la surface cellulaire de molécules telles que CD25, CTLA-4 ou PD-1, ou l'activité cytolytique. NFAT devient actif

après démasquage d'un site de localisation nucléaire suite à une déphosphorylation médiée par la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase activée par la calmoduline en présence de calcium. NFAT se lie à la séquence consensus 5'-GGAAA.

1.2. Antigènes tumoraux reconnus par des lymphocytes T

Le rôle des lymphocytes T dans les phénomènes de rejet des tumeurs et de protection anti-tumorale a été établi au début des années 1970 ⁷. Mais il a fallu beaucoup de temps pour comprendre ce rôle en identifiant les antigènes reconnus, à une époque où la nature générale de ces antigènes, soit un peptide sur une molécule d'histocompatibilité, n'était pas encore connu. Les premiers résultats furent obtenus avec des tumeurs de souris en 1988 ⁸ et 1989 ⁹. Il fallut encore une dizaine d'années pour identifier les premiers antigènes tumoraux humains reconnus par des lymphocytes T ¹⁰. Cela fut possible grâce d'une part aux lignées tumorales qu'il est possible d'obtenir à partir de mélanomes, mais très rarement pour d'autres tumeurs, et d'autre part des clones de lymphocytes T cytolytiques dérivés de lymphocytes T du sang ou infiltrant la tumeur du patient dont provient la lignée. Il reste aujourd'hui peut-être un biais 'mélanome' dans nos connaissances des antigènes tumoraux humains.

La notion de spécificité tumorale est cruciale quand on résume les résultats obtenus à propos d'antigènes tumoraux humains reconnus par des lymphocytes T, car beaucoup de ces lymphocytes ont une activité cytolytique et des toxicités majeures sont attendues si ces lymphocytes reconnaissent des cellules normales en plus des cellules tumorales. Il est intéressant de remarquer que la quasi-totalité des antigènes tumoraux identifiés comme mentionné ci-dessus, avec des T provenant de patients et reconnaissant la tumeur autologue, se sont avérés être spécifiques des tumeurs ¹⁰. La seule exception notoire est le cas particulier des antigènes de différenciation mélanocytaire.

On peut catégoriser les antigènes tumoraux en fonction du mécanisme génétique qui préside à leur expression spécifique ou préférentielle sur les cellules tumorales par rapport aux cellules non tumorales.

Trois types d'antigènes tumoraux ont une grande spécificité tumorale. Les premiers sont encodés par des gènes mutés dans les tumeurs ^{11,12} par rapport aux cellules normales. Ces mutations non synonymes sont le plus souvent des substitutions d'un seul nucléotide. L'acide aminé mutant résultant de la mutation est soit indispensable à l'ancrage du peptide antigénique à une molécule HLA, soit reconnu par le TCR du T anti-tumoral. Des indels (insertions,

délétions) peuvent aussi générer des antigènes, en menant par exemple à l'utilisation d'un cadre de lecture alternatif ou en allongeant le cadre de lecture normal. Dans l'immense majorité des cas, ces mutations et donc ces antigènes sont propres à un seul patient, ce qui a longtemps limité leur intérêt parce qu'il n'était possible ni de les identifier pour chaque patient ni de produire des vaccins thérapeutiques individuels.

Table 1.1. Expression de gènes cancer germline dans différentes tumeurs

Gènes	Sein	Mélanome (primaire)	Mélanome (metast.)	Poumon*	Tête et cou	Colon	Prostate
<i>MAGEA1</i>	19	25	46	46	31	0	18
<i>MAGEA2</i>	9	52	70	44	38	13	18
<i>MAGEA3</i>	13	55	74	47	51	17	18
<i>MAGEA4</i>	6	18	25	51	53	11	0
<i>MAGEA6</i>	15	59	72	51	58	11	23
<i>MAGEA10</i>	4	24	47	45	30	0	10
<i>MAGEA12</i>	13	34	62	30	27	11	5
<i>BAGE1</i>	12	12	31	10	6	0	0
<i>GAGE1</i>	10	29	41	38	26	0	15
<i>CTAG2</i>	23	33	33	41	35	0	27
<i>CTAG1A/B</i>	23	17	35	27	24	0	27

Pourcentage de tumeurs exprimant les gènes de type *MAGE* indiqués

*Poumon: adénocarcinomes et carcinomes épidermoïdes

CTAG2 initialement décrit sous le nom *LAGE-1*

CTAG1A/B initialement décrit sous le nom de *NY-ESO-1* (ou *LAGE-2*)

Table adaptée de Coulie et coll. Nat Rev Cancer 2014 et van der Bruggen et coll. Immunol Rev 2002

Un deuxième groupe d'antigènes spécifiques des tumeurs dépend de gènes dits 'cancer-germline' parce qu'exprimés chez l'adulte dans des tumeurs mais pas dans les tissus normaux à l'exception de cellules germinales mâles et de cellules trophoblastiques, qui ne portent pas de molécules HLA. Par conséquent les peptides antigéniques codés par ces gènes ne sont présentés sur des molécules HLA que sur des cellules tumorales. Les premiers gènes 'cancer-germline' ont été découverts dans des mélanomes et appelés *MAGE* pour Melanoma AntiGen¹³. Leur expression est due à une déméthylation de leur promoteur ce qui explique que régulièrement plusieurs gènes de type *MAGE* sont activés dans la même tumeur. Ce mécanisme est d'autant plus fréquent dans les stades avancés des cancers¹⁴. Les antigènes de type *MAGE* sont partagés par différents types histologiques de cancer, ce qui a donné lieu au développement d'études cliniques de vaccination principalement dans le mélanome métastatique, avec des résultats intéressants mais dans seulement une petite proportion des patients vaccinés¹⁵. La Table 1.1 montre le pourcentage de tumeurs qui expriment des gènes cancer-germline pour différents cancers dont le cancer du sein¹⁰. Certaines tumeurs primaires du sein expriment ces gènes, ce sont surtout des tumeurs de haut-grade n'exprimant pas les récepteurs hormonaux (sous-type triple négatif essentiellement)¹⁶.

La troisième catégorie d'antigènes tumoraux spécifiques sont des peptides antigéniques codés par des virus oncogéniques comme HPV ou EBV. Dans le cancer du sein seuls les rétrovirus endogènes, qui font régulièrement surface dans la littérature depuis la découverte de l'oncogène MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) pourraient constituer des cibles antigéniques tumorales spécifiques, même si l'étiologie virale n'a jusqu'à présent pas de support scientifique solide¹⁷.

A côté de ces antigènes qui ont une grande spécificité tumorale, d'autres ont une spécificité tumorale bien moindre. On les qualifie souvent d'antigènes associés aux tumeurs. Ils sont aussi présents sur certaines cellules normales. Un premier groupe sont des antigènes de différenciation, exprimés par les cellules tumorales et uniquement les cellules normales du tissu d'origine. La présence spontanée de CTL reconnaissant ce type d'antigènes n'a été documentée quasiment que dans le mélanome, où les peptides antigéniques décrits proviennent de protéines telles que TYR, MLANA ou PMEL, impliquées dans la synthèse ou le transport de la mélanine¹⁰. Aucun antigène de différenciation crédible n'a été décrit pour les cancers du sein. Ensuite il y a des antigènes tumoraux codés par des gènes qui sont surexprimés dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales. Le meilleur exemple est *ERBB2*, surexprimé dans certains sous-types de carcinomes du sein, de l'ovaire et gastrique. Plusieurs peptides antigéniques ont été décrits et utilisés dans des études cliniques de vaccination¹⁸. Malgré que HER2 soit

également exprimé par plusieurs tissus normaux, peu d'effets secondaires de type auto-immuns ont été rapportés. Il n'est pas exclu que ceci soit la conséquence d'immunisations plutôt faibles avec les vaccins utilisés, car l'unique utilisation de CAR-T anti-ERBB2 s'est soldée par une toxicité pulmonaire létale ¹⁹.

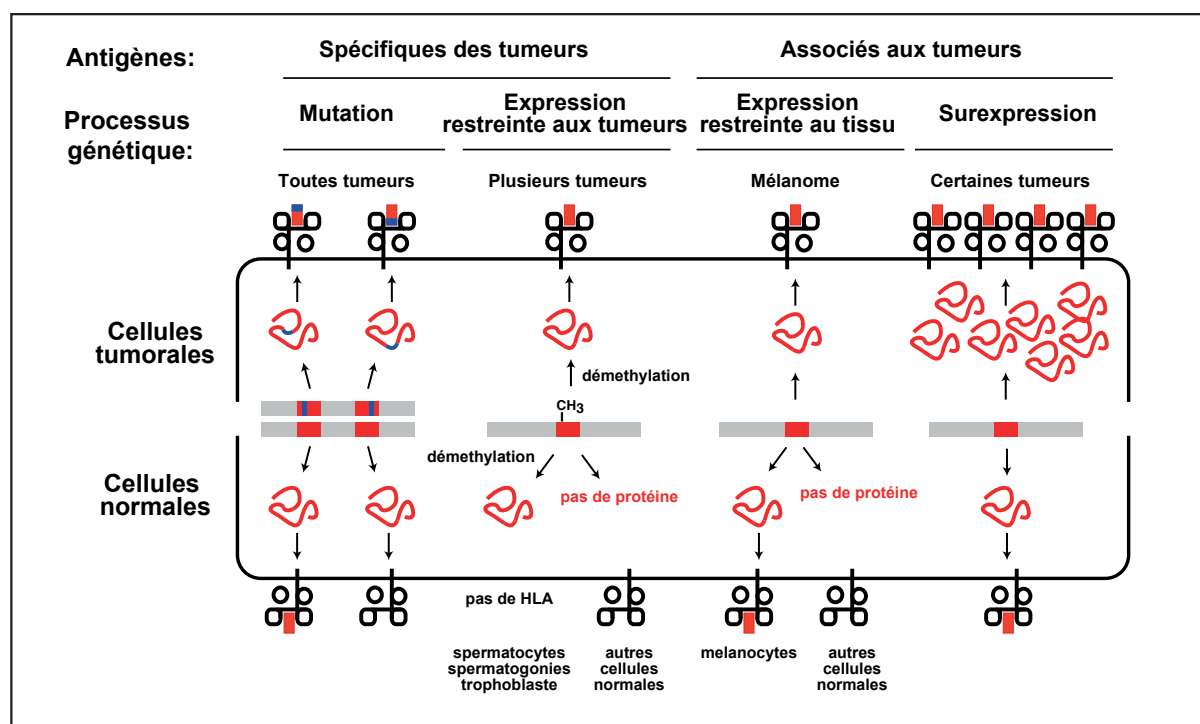


Figure 1.2. Catégories d'antigènes tumoraux reconnus par des lymphocytes T.

Représentation des antigènes tumoraux et des mécanismes génétiques qui les génèrent. Ils sont regroupés selon leur degré de spécificité tumorale: spécifiques des tumeurs et associés aux tumeurs. Les antigènes spécifiques des tumeurs peuvent être générés par des mutations ponctuelles modifiant la séquence du peptide présenté par la molécule HLA ou permettant la liaison du peptide au HLA. Ils peuvent aussi être générés par l'expression restreinte à la tumeur de certains gènes (gènes de type *MAGE*) par déméthylation de ceux-ci. Seules les cellules germinales les expriment également mais étant dépourvues de molécules HLA, aucun peptide n'est présenté en surface. Les antigènes viraux (non représentés) sont des peptides provenant de l'expression de protéines de virus oncogéniques après intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte (ex: Le papillomavirus 'HPV' dans les cancers du col de l'utérus). Les antigènes associés aux tumeurs ne sont pas spécifiques des cellules tumorales. Les antigènes de différenciation ont une expression restreinte à un type cellulaire et aux cellules tumorales qui en dérivent. Ils sont essentiellement décrits dans le mélanome. Des antigènes proviennent de l'expression nettement plus importante d'un gène dans les cellules tumorales que dans les cellules normales. (adapté de P.G. Coulie, *Nat Rev Cancer* 2014).

La Figure 1.2 résume les caractéristiques des différents types d'antigènes tumoraux que nous venons de décrire. Ce sont des antigènes pour lesquels une réponse lymphocytaire T spécifique et spontanée a été mise en évidence, ils sont donc immunogéniques. Remarquons d'emblée que malgré l'existence de ces antigènes et de réponses lymphocytaires T spontanées contre eux chez certains patients, le cancer poursuit son évolution, mettant en échec le système immunitaire. Deux types d'explications non mutuellement exclusives sont possibles: la pression de sélection par le système immunitaire favorise le développement de clones tumoraux résistants, ou la tumeur acquiert des mécanismes d'immunosuppression vis-à-vis des lymphocytes T.

1.3. Mécanismes d'immunosuppression

Parmi les différents mécanismes décrits qui empêchent les CTL anti-tumoraux d'être parfaitement fonctionnels, nous n'en citerons que quelques-uns car ceci dépasse largement le cadre de notre travail. De manière didactique, nous pouvons différencier ceux-ci de deux façons : soit ce sont les cellules tumorales elles-mêmes qui expriment certains facteurs inhibant les CTL, soit c'est le micro-environnement tumoral qui serait enrichi en facteurs (ex : IL-10) ou en cellules immunitaires immunosuppressives telles que les Tregs (lymphocytes T régulateurs) ou les MDSC (Myeloid-derived suppressor cell).

Parmi les facteurs exprimés par les cellules tumorales, il y a les ligands des co-récepteurs inhibiteurs physiologiques des lymphocytes T comme PD-L1. Les cellules tumorales peuvent l'exprimer soit de manière constitutive soit cette expression peut être induite par l'IFN γ sécrété par les CTL ce qui est considéré par certains comme un marqueur d'une réponse lymphocytaire T locale ^{20,21}.

Les cellules tumorales peuvent aussi exprimer l'enzyme IDO1 qui dégrade le tryptophane, acide aminé essentiel pour la prolifération et les fonctions effectrices des lymphocytes T ^{22,23}. Des études cliniques utilisant des inhibiteurs d'IDO en monothérapie ou associés à la chimiothérapie sont en cours dans le cancer du sein.

Un autre mécanisme de résistance des cellules tumorales est la perte d'expression des molécules HLA permettant d'échapper à la reconnaissance par les CTL.

Parmi les cellules immunitaires immunosuppressives qui peuvent infiltrer les tumeurs, nous nous sommes intéressés au Tregs. Leur développement dépend du facteur de transcription FOXP3 ²⁴. Ils résident normalement dans les organes lymphoïdes et les barrières tissulaires où ils jouent un rôle important dans l'homéostasie et la protection contre les réactions auto-immunes, comme on peut le déduire des déficits héréditaires en FOXP3 aussi bien chez

l'homme que chez la souris ²⁵⁻²⁷. Ils peuvent se différencier dans le thymus (Tregs dits naturels, nTregs) ou en périphérie (Tregs induits, iTregs), avec le même phénotype et les mêmes capacités immunosuppressives. Leur identification phénotypique repose le plus souvent sur la co-expression de CD4, CD25 élevé, FOXP3 et CTLA-4, sans CD127. Chez l'homme FOXP3 seul ne suffit pas car tous les T humains activés l'expriment. Les marqueurs d'activation sont souvent ICOS, GITR, GARP et HLA-DR. Les Tregs peuvent certainement jouer un rôle dans les cancers ²⁸⁻³⁰. Leur mécanisme immunosuppresseur principal est l'activation du TGFβ. Démontrer leur fonction immunosuppressive requiert des tests de co-culture avec des lymphocytes T dont on mesure ensuite certaines fonctions effectrices, ce qui n'est pas facile à réaliser ³¹.

2. Immunothérapies actuelles du cancer

Actuellement, 6 anticorps immunostimulants sont approuvés en clinique dans différents cancers solides : le mélanome, le cancer du poumon non à petites cellules, le rein, la vessie, le foie, l'estomac, le carcinome de Merkel, les cancers avec instabilité des microsatellites (MSI+) dont le colon et plus récemment dans le cancer du sein triple négatif ^{32,33}. Dans la grande majorité des cas, ils sont indiqués pour le traitement du stade métastatique et certains en adjuvant. Plusieurs études sont en cours pour évaluer leur efficacité en situation néo-adjuvante, notamment dans le cancer du sein. Ces anticorps bloquent soit les co-récepteur inhibiteurs des lymphocytes T comme CTLA-4 (Ipilimumab) ou PD-1 (Nivolumab et Pembrolizumab), soit le ligand de PD-1 exprimé par les cellules tumorales, PD-L1 (Durvalumab, Atézolizumab et Avelumab). Ces traitements ont nettement amélioré le pronostic de patients avec des cancers métastatiques comme le mélanome ou le cancer du poumon avec comme caractéristique principale d'induire des réponses de longue durée ³³. Cependant, le taux de réponse reste relativement faible. Il est de 31% sous Nivolumab en monothérapie pour des patients avec un mélanome métastatique en seconde ligne ³⁴, et entre 40 et 45% quand il est donné en première ligne de traitement ³⁵. La combinaison Nivolumab/Ipilimumab a amélioré ce taux de réponse mais au prix d'effets secondaires sévères plus importants. Il est donc crucial de disposer de biomarqueurs permettant de sélectionner les patients qui vont bénéficier de ces traitements. A l'heure actuelle le seul qui soit utilisé en pratique clinique, bien qu'il soit imparfait, est l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales (Tumor proportion score, TPS) et/ou les cellules immunes (lymphocytes et macrophages) localisées dans le microenvironnement tumoral (Combined Positive score, CPS) mesurée par immunohistochimie. Globalement, les

tumeurs qualifiées de « PD-L1 positives » et ce dans plusieurs types de cancers, répondent mieux aux anti-PD-1/PD-L1 que les tumeurs dites négatives ³⁶. Un autre biomarqueur intéressant ayant également montré une corrélation avec la réponse est le taux de mutations somatiques. En effet, parmi les mélanomes, ceux dont le nombre de mutations somatiques non synonymes étaient supérieur à 100 présentaient un bénéfice clinique plus important sous Ipilimumab ou anti-PD-1/PD-L1. Les cancers du colon MSI⁺ ont un taux de mutation 20 fois plus important que les non MSI⁺ (ou MSS) et un taux de réponse de 50% sous Pembrolizumab alors qu'il est de 0% pour les MSS ³⁵. D'autres biomarqueurs comme la signature génique IFN γ et la clonalité du répertoire TCR ont aussi été étudiés mais sont moins validés. En conclusion, aucun de ces biomarqueurs n'est suffisant à lui seul pour discriminer complètement les patients répondeurs des non répondeurs. Des études sont en cours sur des approches associant ces différents biomarqueurs en combinant des techniques d'immunohistochimie en multiplex et de séquençage à haut débit.

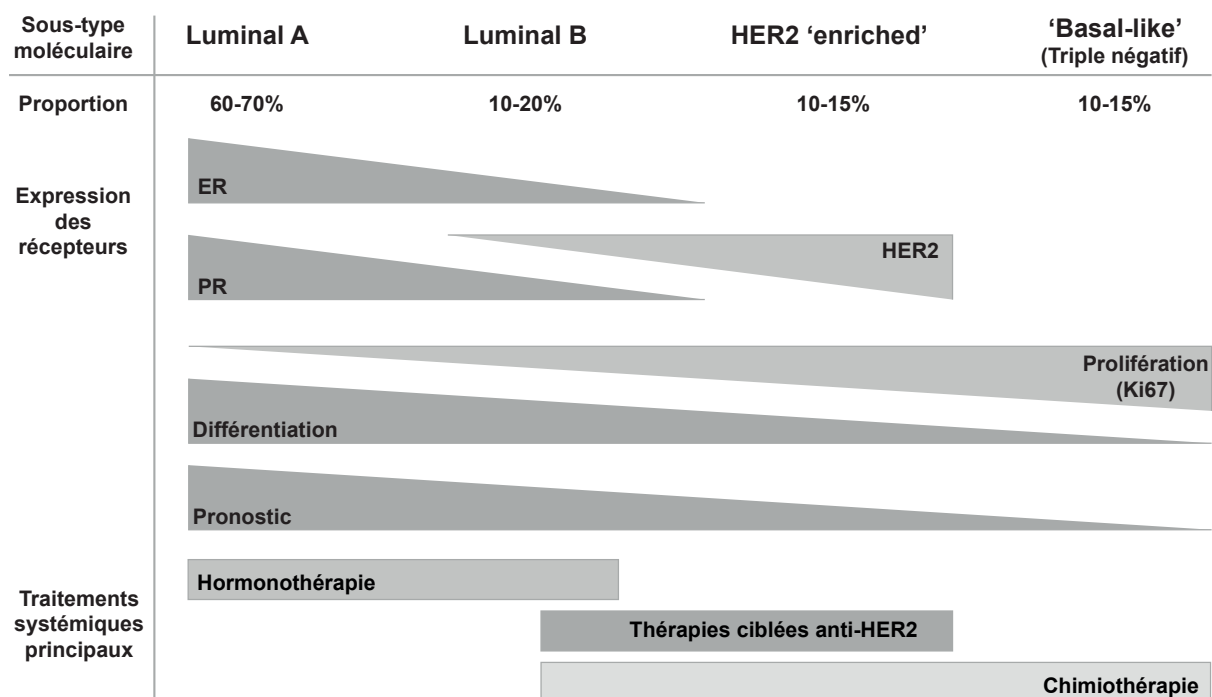


Figure 1.3. Caractéristiques principales des sous-types moléculaires de cancer du sein invasif.

Pour chaque sous-type, représentation de leur proportion (en %), du niveau d'expression des récepteurs aux oestrogènes (ER), à la progestérone (PR) et HER2, du taux de prolifération déterminée par le marqueur Ki67, du degré de différenciation histologique et du pronostic selon une échelle relative. Indication des traitements systémiques principaux correspondants, pour les stades non métastatiques. Deux sous-types moléculaires moins fréquents (Claudin-Low et Normal-like) ne sont pas représentés mais sont en général rattachés au sous-type basal-like dans la catégorie histologique des cancers du sein triples négatifs (n'exprimant aucun récepteur). Figure adaptée de N. Harbeck et al, Nat Rev, 2019.

3. Le cancer du sein invasif

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, et ceci dans le monde entier. En Belgique, il touche environ une femme sur 8. En 2018, 10 905 nouveaux cas ont été diagnostiqués (données issues de ‘Cancer fact Sheets’, Registre du Cancer, année d’incidence 2018, Bruxelles 2020). Les deux formes histologiques les plus fréquentes sont le carcinome canalaire infiltrant ou CCI (70-75%) et le carcinome lobulaire infiltrant ou CLI (12-15%), faisant référence à leur origine anatomique dans la glande mammaire ³⁷.

Cette classification histologique est complétée par l’identification en immunohistochimie (IHC) de facteurs pronostiques que sont le niveau d’expression des récepteurs hormonaux aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR), de la protéine HER2 codée par *ERBB2* ainsi que le taux de prolifération cellulaire (déterminé par le pourcentage de cellules tumorales positives pour le marqueur Ki67). Sur base de ces facteurs, on peut distinguer les cancers du sein hormonosensibles, ceux surexprimant HER2 ou les triples négatifs quand ils n’expriment aucun récepteur. D’un point de vue moléculaire le cancer du sein comprend 4 sous-types « intrinsèques » principaux ayant été déterminés sur base du profil d’expression de 496 gènes: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched et basal-like. Il y a une corrélation entre la classification histologique par IHC et les sous-types moléculaires ³⁸. Ces sous-types de cancers du sein diffèrent non seulement par leur biologie mais aussi par leur pronostic et leur réponse aux traitements systémiques ³⁹. La Figure 1.3 résume les caractéristiques principales des différents sous-types moléculaires de cancer du sein ³⁹.

3.1. Implication du système immunitaire dans le cancer du sein

La présence de cellules immunitaires dans le microenvironnement des carcinomes mammaires a été largement étudié. Parmi ces cellules, les lymphocytes T sont les plus fréquents et ont fait l'objet d'une attention particulière vu leur rôle potentiel dans un rejet tumoral ou une protection. Plusieurs arguments plaident en faveur d'une reconnaissance des cellules tumorales du sein par des lymphocytes T.

3.1.1. « Tumor-infiltrating lymphocytes » ou TILs

Le terme TILs décrit en réalité des cellules mononucléées qui infiltrent la tumeur et sont détectées en microscopie optique sur une coupe colorée par hématoxyline et éosine (HE). La majorité des TILs sont situés dans le stroma plutôt que dans le nid tumoral mais les proportions de TILs de ces deux compartiments sont corrélées ⁴⁰. Ce sont les lymphocytes T qui en sont la composante cellulaire dominante avec une majorité de cellules CD4 dans les tissus tumoraux avant traitement par chimiothérapie ^{41,42}. Parmi les différents sous-types tumoraux, les cancers du sein triple négatifs et HER2 positifs contiennent plus de TILs ⁴³. Bien que la présence des TILs et leur association positive sur le pronostic dans le cancer du sein avaient été documentées dès 1922 ⁴⁴, ce n'est qu'en 2010 que Denkert et coll. ont démontré que les TILs étaient un facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante ⁴⁰. Ces résultats ont été confirmés de manière robuste par plusieurs autres études démontrant que, essentiellement dans les cancers du sein triple négatifs et HER2 positifs, le taux de réponse pathologique complète (pCR) après chimiothérapie néo-adjuvante augmentait avec le nombre de TILs. Cette association s'est révélée également positive pour des traitements néo-adjuvants associant la chimiothérapie et un traitement anti-HER2 pour les cancers du sein HER2 positifs. Bien qu'étudié sur moins de patientes, il semblerait que ce soit également le cas pour les cancers du sein hormonosensibles ^{45,46}.

Les TILs, notamment les TILs CD8⁺, sont également un facteur de meilleur pronostic ⁴⁷. Dans les cancers du sein triples négatifs et HER2 positifs, il y a une corrélation claire entre l'augmentation du nombre de TILs CD8⁺ et l'allongement de la survie sans récurrence (RFS pour recurrence-free survival) ⁴⁸. Par contre, pour les cancers ER positifs, les résultats sont contradictoires, apparemment selon le statut HER2: certains notent une corrélation inverse entre l'infiltration par des TILs et la survie pour les cancers du sein ER⁺HER2⁻ ⁴⁵, tandis que dans les cancers du sein ER⁺HER2⁺, la présence de TILs CD8⁺ diminue le risque relatif de mortalité ⁴⁸.

3.1.2. Structures lymphoïdes tertiaires (TLS: tertiary lymphoid structure)

Les TLS sont des agrégats organisés de cellules immunitaires observés dans des tissus non lymphoïdes lors de phénomènes inflammatoires ou réponses immunitaires chroniques (infections, maladie auto-immunes, rejets chroniques de greffe ou tumeur). Les TLS dits matures sont composés d'une zone riche en lymphocytes T (essentiellement des CD4: les T auxiliaires folliculaires (T follicular helper, T_{FH}) au contact d'une zone de lymphocytes B formant un centre germinatif contenant également des cellules dendritiques folliculaires (FDC). On note également la présence de veinules post-capillaires à endothélium épais (High Endothelial Venules ou HEV) comme dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces TLS représenteraient un site privilégié pour une présentation locale d'antigènes tumoraux par les cellules dendritiques (DC) aux lymphocytes T ⁴⁹.

Des TLS sont souvent observés dans les tumeurs du sein et leur fréquence varie selon différents facteurs. Ils sont plus fréquemment détectés dans les tumeurs de haut grade, les tumeurs ER et PR négatives et les tumeurs HER2 positives et en présence de lésions pré-tumorales de carcinomes canaux *in situ* ⁵⁰⁻⁵⁴. A noter qu'il existe une corrélation entre taux d'infiltration par les TILs et présence de TLS aussi bien dans le site primaire que les métastases pulmonaires et hépatiques ^{50,51,54,55}.

Indépendamment de la densité de TILs, un impact positif de la densité en TLS sur la survie globale et la survie sans récurrence a été démontré dans plusieurs cancers (mélanome, poumon et colon) dont le cancer du sein ⁴⁹. Plus précisément, suite à la difficulté et à l'absence de consensus pour évaluer la présence de TLS histologiquement sur des coupes HE ou en IHC, leur présence est plus souvent évaluée par un marquage IHC des HEV (MECA79) ou de CXCL13, chémokine attirant les lymphocytes B et T et qui a un rôle clé dans la formation des TLS.

Une signature transcriptomique de 8 gènes représentant les T_{FH}, dont *CXCL13* qui peut aussi être utilisé seul, est un facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie et est associé à une meilleure survie sans récurrence, surtout dans les sous-types HER2⁺ ⁴². Dans les cancers du sein triples négatifs, à la fois la densité en HEV et l'expression de *CXCL13* sont associées à une meilleure pCR et un meilleur pronostic ⁵¹. Dans les cancers HER2⁺, la présence de TLS évaluée par des marquages IHC pour les B, T, FDC et HEV est corrélée à une meilleure survie sans récurrence mais pas à une meilleure survie globale ⁵². Une étude plus récente, évaluant histologiquement la présence de TLS (à distance ou dans la zone tumorale) en HE et confirmée parfois par des marquages IHC, associe TLS plutôt avec un moins bon pronostic ⁵³. Cependant,

les auteurs ont analysé les données de survie de tous les sous-types de cancer du sein confondus alors qu'ils montrent bien que ce sont les tumeurs HER2⁺ et triples négatives qui contiennent nettement plus de TLS. Dès lors ces données de survie sont probablement corrélées aux sous-types moléculaires et pas particulièrement à la présence de TLS.

Par contre, le fait de détecter de grandes quantités de Tregs FOXP3⁺ activés (ICOS⁺) au contact de DC matures (LAMP⁺) dans ces agrégats lymphoïdes situés au pourtour des foyers tumoraux est associé à une moins bonne survie ³¹.

3.1.3. Lymphocytes T régulateurs (Tregs)

Comme indiqué plus haut, parmi les TILs ce sont les lymphocytes T CD4 qui prédominent. Depuis plusieurs années, une sous-population de T CD4, les Tregs, a été observée dans les tumeurs du sein et un intérêt croissant pour cette population se manifeste par rapport à son possible rôle pro-tumoral par inhibition de la réponse T CD8 anti-tumorale. Des premières analyses sur le sang de patientes atteintes de cancer du sein ont montré une plus grande quantité de Tregs (T CD4⁺CD25⁺) par rapport au sang de donneurs sains ⁵⁶. Cette différence est surtout significative pour les patientes atteintes d'un cancer HER2⁺. Étonnamment, le pourcentage de Tregs circulant parmi les T CD4 diminue après traitement par Trastuzumab et proportionnellement au taux de réponse ⁵⁷. Dans les tumeurs primaires, les fréquences de Tregs varient fortement d'une patiente à l'autre: les Tregs (définis en cytométrie de flux comme étant des T CD4⁺CD25^{high} ± FOXP3⁺CD127⁻) peuvent représenter 20 à 30% en moyenne des T CD4 et sont plus nombreux que dans le tissu mammaire normal ^{28,31,56}.

Comme pour les TILs dans leur ensemble, il existe une corrélation entre une quantité importante de Tregs (majoritairement évalués en IHC par un marquage FOXP3) et le grade histologique, le statut HER2⁺ et l'absence d'expression de récepteurs hormonaux ^{31,57-62}. Il existe une corrélation entre le nombre de TILs CD8⁺ et FOXP3⁺ ⁶⁰. On retrouve une majoration du nombre de Tregs en association avec l'agressivité du phénotype tumoral, et ils seraient particulièrement prédominants dans les cancers du sein triples négatifs et/ou de grade III ^{28,62,63}. A noter que des Tregs sont également détectés dans des lésions de carcinome canalaire *in situ* (CCIS) de manière plus importante que dans les tissus normaux mais moindre que dans les CCI ^{58,64}.

Une méta-analyse publiée en 2015, regroupant 14 études réalisées dans le cancer du sein, essentiellement depuis 2010 (au total 5183 tumeurs du sein) avec un suivi moyen de 10,5 ans, conclut qu'une haute densité en TILs FOXP3⁺ est significativement associée à une diminution

de la survie globale mais pas de la survie sans récurrence ou sans progression ⁶⁵. Il semblerait que ce soit surtout le cas pour les cancers du sein ER⁺ ^{31,58} alors que l'impact serait plutôt favorable pour les cancers du sein ER négatifs ⁶⁶. Cependant, les auteurs mentionnent une grande hétérogénéité entre les études, attribuée aux différentes manières de quantifier les Tregs, à la durée du suivi ainsi qu'au fait d'analyser les sous-types moléculaires ensemble ou séparément. Une seconde méta-analyse réalisée en 2016 sur 8666 cas confirme ces résultats sur la survie globale ainsi que l'absence d'impact sur la survie sans récurrence, sans faire de distinction entre les différents sous-types moléculaires ⁶¹.

Certains ont voulu déterminer si l'impact sur la survie dépendait de la localisation des Tregs par rapport aux cellules tumorales. Gobert et coll. ont étudié le nombre de cellules FOXP3⁺ sur des « tissus microarrays (TMA) » pour 191 patientes et montrent que quand les Tregs sont dans des infiltrats lymphoïdes autour des tumeurs cela augmente le risque de rechute et de mortalité (surtout dans les tumeurs ER⁺) alors que quand ils sont au sein du nid tumorale, il n'y a pas de corrélation avec les données de survie ³¹. Liu et coll. ont réalisé la même analyse sur des coupes histologiques entières provenant de 1270 patientes et montrent que ce sont les Tregs FOXP3⁺ situés au sein de la tumeur (et non pas dans les infiltrats autour) qui péjorent le pronostic aussi bien pour les tumeurs ER⁺ que ER⁻. Par contre, un ratio CD8⁺/FOXP3⁺ élevé dans les infiltrats lymphoïdes péri-tumoraux est associé avec un meilleur pronostic ⁶³.

Gobert et coll. ont caractérisé de manière plus précise les Tregs infiltrant les tumeurs primaires et montré que seuls les Tregs au sein des agrégats lymphoïdes avaient un phénotype activé et prolifératif (ICOS⁺ et KI67⁺) ³¹. Dans la même idée, Plitas et coll. ont comparé des Tregs extraits de tumeurs primaires du sein avec ceux extraits de tissus mammaires normaux et ont montré qu'en plus d'être plus fréquents dans les tumeurs, les Tregs y affichent un phénotype activé et prolifératif ²⁸. De plus, ils décrivent une expression spécifique de *CCR8* par les Tregs activés (CD4⁺ CD25^{high} CD127⁻ CD45RO⁺) extraits de tumeurs primaires du sein par rapport aux Tregs du parenchyme mammaire normal ou du sang. A partir de données du TCGA (The Cancer Genome Atlas), ils ont également rapporté un impact négatif sur la survie globale et la survie sans récurrence (tous sous-types de cancer du sein confondus) d'un ratio *CCR8/FOXP3* élevé ²⁸. Quant à l'effet de la chimiothérapie sur l'infiltration par des TILs FOXP3⁺, les auteurs s'accordent sur le fait que la chimiothérapie à base d'anthracyclines diminue significativement le nombre de TILs FOXP3⁺ alors qu'elle n'a pas d'effet sur le nombre de TILs globaux ou de TILs CD3⁺ ou CD8⁺ quand les données sont disponibles ^{59,67,68}. Cet effet serait plus marqué sur les TILs FOXP3⁺ localisés dans les infiltrats autour de la tumeur que ceux au sein du lit tumoral, et ce essentiellement dans les sous-types surexprimant HER2 ou triples négatifs ⁶⁹.

Une seule petite étude portant uniquement sur les tumeurs triples négatives montre un effet prédictif de la réponse à la chimiothérapie (meilleure pCR) d'une faible infiltration par des TILs FOXP3⁺ dans la biopsie diagnostic ⁶⁸. Mais une autre étude montre que c'est la présence (versus l'absence) de TILs FOXP3⁺ (indépendamment des T CD8⁺) qui serait un facteur prédictif de la pCR ⁶⁰. Par contre, plusieurs études montrent une association entre un faible taux de TILs FOXP3⁺ après chimiothérapie et meilleur taux de pCR ^{67 60,69,70}. Les patientes présentant une pCR ont également une diminution de cette infiltration significativement plus marquée que celles qui ne répondent pas à la chimiothérapie ⁵⁹.

Les données ne sont pas claires quant à l'effet de la diminution du taux de Tregs sur la survie globale ou sans récurrence.

En résumé, une population de lymphocytes T régulateurs est observée parmi les TILs des tumeurs du sein, même très précoces. Leur fréquence y est plus importante que dans le sang des patientes ou le parenchyme mammaire normal. Il y a une corrélation claire entre la densité en Tregs et des facteurs de mauvais pronostic comme le grade histologique, l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et un statut HER2 positif. Les Tregs sont également retrouvés en quantité plus élevée dans les tumeurs plus agressives triples négatives. La chimiothérapie à base d'anthracyclines diminue significativement leur nombre. Par contre, pour pouvoir conclure sur un potentiel effet pronostic ou prédictif de l'infiltration des tumeurs par les Tregs, il faudrait réaliser des études prospectives à plus grande échelle en utilisant les techniques actuelles de marquage en multiplex plus robustes qu'un simple marquage FOXP3 pour mieux les identifier parmi les TILs. De plus, tout comme pour les TILs il faudrait établir des recommandations sur la façon de les quantifier avec des critères de localisation par rapport aux cellules tumorales et valider ceux-ci.

3.2. Immunogénicité faible

Bien que les arguments évoqués dans les sections précédentes suggèrent que le cancer du sein n'est pas totalement ignoré par le système immunitaire, celui-ci semble peu immunogénique. D'une part, les résultats des études cliniques évaluant l'efficacité des anticorps bloquant la voie PD-1 sont plutôt modestes, et, d'autre part, rares sont les lymphocytes T CD8 spécifiques des cellules tumorales mis en évidence chez des patientes.

3.2.1. Efficacité de l'immunothérapie

Pour discuter de l'efficacité des traitements d'immunothérapie, principalement par anticorps bloquant la voie PD-1, nous nous focaliserons sur les études de phase III.

Les résultats intermédiaires de la première d'entre elles, IMPassion130, ayant montré un bénéfice de l'immunothérapie dans les cancers du sein métastatiques triples négatifs (TN), ont été présentés au congrès ESMO à Munich en 2018 ³². Ceux-ci ont montré une amélioration de la survie sans progression (PFS) lorsqu'on ajoute l'atezolizumab (anti-PD-L1) versus placebo, au nab-paclitaxel (chimiothérapie à base de taxanes). Ce bénéfice est de 1,7 mois dans la population générale et de 2,5 mois chez les patientes PD-L1 positives (expression PD-L1 $\geq 1\%$ sur les cellules immunitaires). Les résultats définitifs publiés en 2019 ⁷¹ ont confirmé les résultats concernant la PFS mais ont montré qu'il n'y avait pas d'amélioration de la survie globale (OS) (Figure 1.4). Dès lors, ce traitement a été approuvé, et est disponible en Belgique seulement en usage compassionnel pour le traitement en première ligne métastatique des patientes atteintes d'un cancer TN PD-L1⁺. Bien que l'étude soit considérée comme positive, le bénéfice reste relatif. Cependant, une donnée intéressante est le taux de réponses complètes observé dans la population PD-L1⁺: il est de 10,3% avec atezolizumab + nab-paclitaxel et 1,1% avec placebo+nab-paclitaxel. En sachant que de longues périodes sans rechute sont observées chez les patients répondant à l'immunothérapie, ces chiffres sont une lueur d'espoir pour des patientes dont le pronostic de départ est très mauvais. Mais actuellement, il reste impossible de prédire qui seront ces patientes.

Une seconde étude, IMPassion131, est encore en cours et évalue, pour les mêmes patientes, l'association de l'atezolizumab avec le paclitaxel (taxane habituellement utilisé en Europe au lieu du nab-paclitaxel). Elle a montré des résultats intermédiaires peu prometteurs lors du congrès ESMO 2020. En effet, il n'y a aucune différence significative en termes de PFS et d'OS, même pour les patientes PD-L1⁺ ⁷². Plusieurs hypothèses sont possibles et en cours d'analyse pour expliquer ces résultats décevants mais nous ne les évoquerons pas ici.

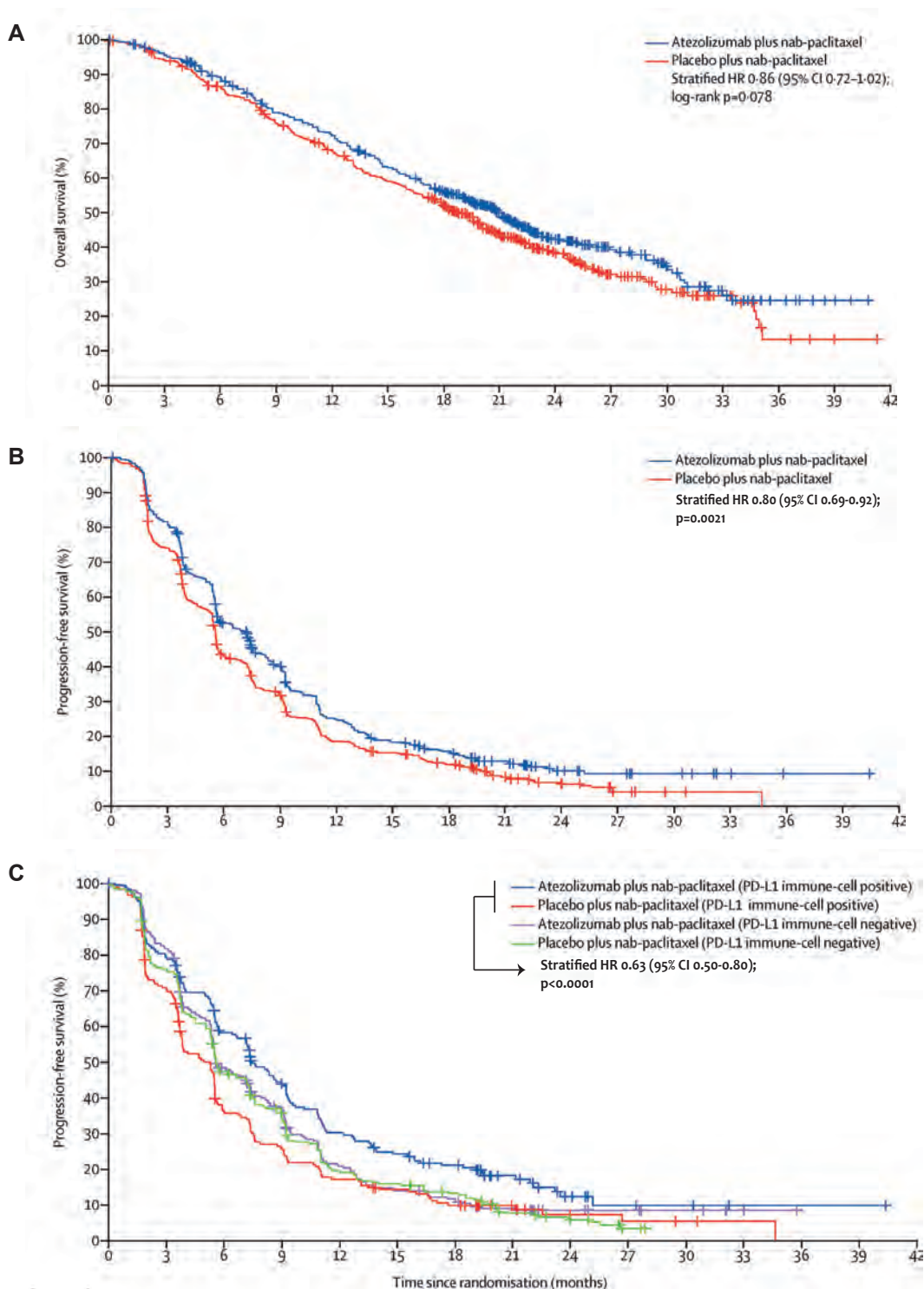


Figure 1.4. Etude IMPassion130: Survie globale (OS) et survie sans progression (PFS).

Etude de phase III sur l'ajout d'atezolizumab (versus placebo) au nab-paclitaxel en première ligne métastatique pour des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif.

A. OS dans la population en intention de traiter (ITT). OS dans la population PD-L1 positive non montrée car statistiquement non analysable vu les résultats dans la population ITT.

B. PFS dans la population ITT.

C. PFS en fonction du status PD-L1 sur les cellules immunitaires (positif si $\geq 1\%$)

Figure adaptée de P.Schmid, The Lancet Oncology 2019.

Plus récemment, une autre étude de phase III, KEYNOTE-355, évaluant l'efficacité de l'ajout du pembrolizumab (anti-PD-1), versus placebo, à la chimiothérapie (nab-paclitaxel ou paclitaxel ou carboplatine+gemcitabine) a montré une amélioration de la PFS de 4,1 mois dans le groupe de patientes avec un CPS ≥ 10 (Combined Positive Score PD-L1) mais pas dans le groupe CPS ≥ 1 ou la population générale (Figure 1.5). Le CPS est le rapport entre le nombre de cellules PD-L1 positives (cellules tumorales+immunitaires) et le nombre total de cellules tumorales, multiplié par 100. L'évaluation des données concernant la survie globale est en cours⁷³.

Concernant l'utilisation du pembrolizumab en monothérapie chez les patientes avec un cancer du sein TN métastatique déjà traitées par chimiothérapie, l'étude de phase III KEYNOTE-119 n'a pas montré de supériorité de celui-ci par rapport au traitement standard⁷⁴.

La conclusion générale est pour le moment que l'efficacité de l'immunothérapie par anticorps immunostimulants bloquant la voie PD-1, au stade métastatique, est limitée à une sous-population de cancer TN enrichis en cellules exprimant PD-L1 et ce uniquement en première ligne thérapeutique.

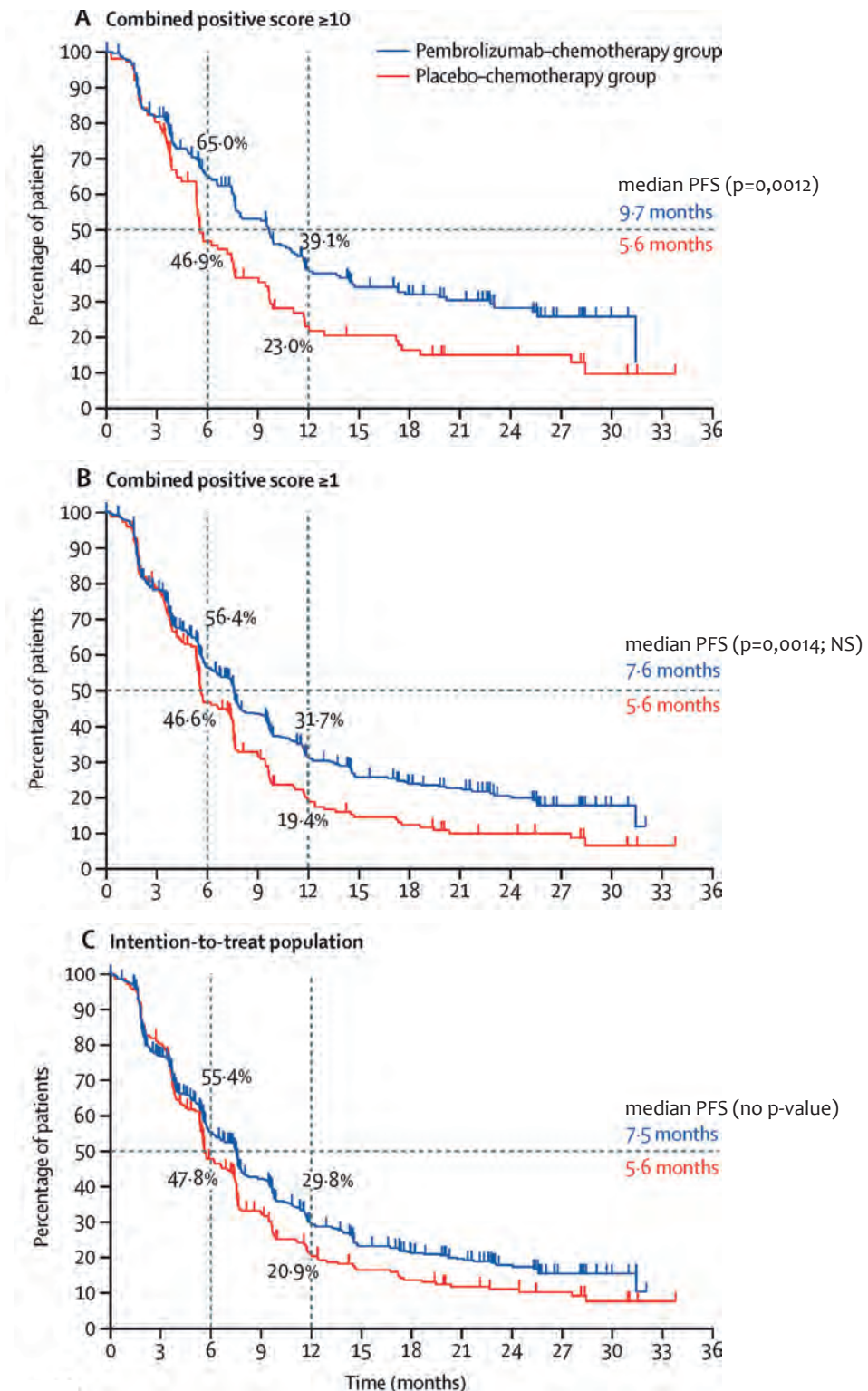


Figure 1.5. Etude KEYNOTE-355: Survie sans progression (PFS).

Etude de phase III sur l'ajout du pembrolizumab (versus placebo) à la chimiothérapie en première ligne métastatique pour des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif. PFS dans le groupe de patientes avec un Combined Positive Score (CPS) ≥ 10 (A), CPS ≥ 1 (B) et dans la population en intention de traiter (C).

CPS: rapport du nombre de cellules PD-L1⁺ (tumorales et immunitaires) sur le nombre de cellules tumorales, multiplié par 100.

NS: non significatif. Figure adaptée de J. Cortes, The Lancet 2020.

Un des axes de recherche actuels est de tester l'efficacité de ces traitements à un stade plus précoce de la maladie. Le rationnel est que le stade métastatique serait moins immunogénique, basé sur les observations qu'ils sont associés à une déplétion en cellules immunitaires effectrices par rapport aux stades précoces ⁷⁵.

Deux études de phase III, IMPassion031 et KYENOTE-522, testant des anticorps anti-PD-1/PD-L1 (versus placebo) en association avec de la chimiothérapie néo-adjuvante (avant chirurgie) dans des tumeurs TN localement avancées, ont publié récemment leurs résultats préliminaires ^{76,77}. La Table 1.2 compare les caractéristiques principales de ces deux études et montre les résultats de réponse pathologique complète (pCR).

Bien que ces résultats préliminaires soient plus encourageants, indépendamment du statut PD-L1, les données de survie sont encore immatures et ne concernent toujours qu'un seul sous-type de cancer du sein.

Table 1.2. Etudes de phase III associant des anticorps anti-PD-1/PD-L1 à la chimiothérapie néo-adjuvante.

Nom	Anticorps	CT associée	Séquence	pCR test (%)	pCR placebo (%)	gain (%)	p-value
KEYNOTE-522	Pembrolizumab (>PD-1)	Carbo-Pacli EC or DC (=AC)	P(4)+CarboPacli-->P(4)+AC-->Chir-->P(9)	64,8	51,2	13,6	<0,001
IMPassion031	Atezolizumab (>PD-L1)	Nab-pacli et DC	At(6)+NabPacli-->At(4)+DC-->Chir-->At(11)	58	41	17	0,0044

P: Pembrolizumab ; E: Epirubicine ; C: Cyclophosphamide ; D: Doxorubicine ; A: Antracyclines ; At: Atezolizumab
 Carbo: Carboplatine ; Pacli: Paclitaxel ; Nab-pacli: Nab-paclitaxel ; Chir: Chirurgie ; CT: chimiothérapie
 (chiffre): nombre de doses reçues

Des études de phase II évaluant l'ajout d'un anticorps anti-PD-1/PD-L-1 à la chimiothérapie néo-adjuvante et incluant également d'autres sous-types (Luminal B/HER2 négatifs) sont actuellement en cours, dont une initiée en Belgique, l'étude B-IMMUNE. Des premiers résultats de l'étude I-SPY-2, associant le pembrolizumab au paclitaxel (suivi d'épirubicine + cyclophosphamide), sont plutôt prometteurs également pour les cancers Luminal B/HER2 négatifs ⁷⁸. Des études de phase III sont en cours.

Concernant le sous-type HER2⁺, venant en 2^{ème} position après le TN en termes d'immunogénicité sur base des TILs et du taux de mutations, plusieurs types d'immunothérapies sont actuellement étudiés, incluant différentes stratégies de vaccination. Par contre, peu d'études de phase III concernant les anticorps anti-PD-1/PD-L1 sont en cours aussi bien au stade métastatique qu'en situation néo-adjuvante ou adjuvante. Aucun résultat n'est encore disponible. Les résultats de phase II sont plutôt mitigés ⁷⁹.

Un des concepts quant à l'efficacité des anticorps immunostimulants bloquant la voie PD-1 est qu'ils réactivent des lymphocytes T CD8 déjà présents et spécifiques des cellules tumorales. En les associant à des chimiothérapies susceptibles d'induire une mort immunogénique par relargage de nouveaux antigènes potentiels, on induirait de nouveaux lymphocytes T CD8 anti-tumoraux. Cependant, peu de travaux, dont ceux réalisés dans notre laboratoire, ont réussi à mettre en évidence dans le cancer du sein des réponses spontanées T anti-tumorales spécifiques, comparés à ceux publiés pour d'autres cancers comme le mélanome.

3.2.2. Lymphocytes T spécifiques des cellules tumorales de carcinomes du sein

Des suggestions de réponses T anti-tumorales dans le cancer du sein ont été publiées début des années 90 par deux groupes. Schwartzentruber et coll. ont analysé l'activité cytolytique et la sécrétion de cytokines (GM-CSF, TNF α et IFN- γ) de TILs extraits de 19 tumeurs primaires du sein et 9 ganglions lymphatiques, en co-culture avec une suspension de cellules tumorales autologues. Aucune culture de TILs n'a montré de capacité de lyse significative et spécifique envers les cellules tumorales autologues. Seuls les TILs de 3 parmi 11 patientes testées ont montré une sécrétion significative de cytokines spécifiquement en présence des cellules tumorales autologues et pas avec des cellules tumorales allogéniques ou les B-EBV autologues. Ces cultures de TILs contenaient majoritairement des CD4 (entre 56 et 98%). Pour l'une des trois, ils ont montré une inhibition de cette sécrétion par un anticorps anti-HLA-II préalablement incubé avec les cellules tumorales, validant une reconnaissance HLA-II restreinte ^{80,81}. Mais pour conclure que ces TILs reconnaissent spécifiquement un antigène tumoral, il aurait fallu comparer avec une stimulation par une suspension de cellules provenant de tissu mammaire normal. Dans un 3^{ème} papier où ils ont testé les T CD4⁺ et T CD8⁺ séparément, à nouveau, ils ne mettent en évidence une sécrétion de cytokines que pour des T CD4⁺ ⁸².

Au même moment, Baxevanis et coll. ont analysé l'activité cytolytique de 12 cultures de TILs extraits de tumeurs primaires ou d'épanchements pleuraux et ont montré pour 5 d'entre elles, qui contenaient majoritairement des T CD8⁺, une lyse spécifique des cellules tumorales autologues et pas de cellules allogéniques. Cette lyse était inhibée lorsque les cellules tumorales étaient préalablement incubées avec un anticorps anti-CD3 ou anti-TCR $\alpha\beta$ ou anti-HLA-I ⁸³. A nouveau, il manque un contrôle de tissu normal pour conclure que cette reconnaissance était bien spécifique des cellules tumorales.

Contrairement aux travaux réalisés à cette époque dans le mélanome et depuis lors, il semble difficile de mettre en évidence une réponse anti-tumorale spontanée T CD8 et d'identifier les antigènes tumoraux dans le cancer du sein.

A notre connaissance, aucun clone CTL reconnaissant spontanément et spécifiquement un épitope provenant de la protéine HER2 ou d'un gène de type *MAGE* n'a été décrit parmi les TILs extraits de tumeurs du sein.

Table 1.3. Caractéristiques tumorales de 6 CCI et analyse de la spécificité des TILs CD8⁺ extraits

Patient	P142	P143	P154	P195	P223	LB5784
Age (années)	70	51	65	43	79	82
Tumeur						
Statut ER, PR, HER2	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻	ER ⁺ PR ⁻ HER2 ⁺	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁺	TN	TN
Histologie	Canalaire	Canalaire	Canalaire	Canalaire	Metapl.	Canalaire
Grade	Haut	Interm.	Haut	Haut	Haut	Haut
Ki67 (%)	40	80	40	40	75	40
Stade	IIIA	IIA	IIA	IIB	IIB	IIB
Nb mutations non-syn faux sens	113	450	71	58	122	67
Lymphocytes T extraits						
Cell. Stromales/g de tissu (x10 ⁶)	0.4	11.3	1.3	0.3	2.2	2.1
% de TILs CD8 ⁺	22	59	15	54	31	39
Nbre de clonotypes testés	100	57	61	142	82	100
Antigènes tumoraux testés						
Mutations	29	106	29	23	49	36
Type MAGE	MAGEA3, A6, A12	-	MAGEA3, A6	-	MAGEA3, A6	MAGEA4, A10, NY-ESO-1
ERBB2	-	-	ERBB2	ERBB2	-	-
Nb clonotypes antitumoraux	0	6	0	0	0	0

TN: Triple négatif ; Metapl.: métaplastique ; interm. : intermédiaire

Table issue du travail de thèse de David Schröder (2016)

Précédemment, dans notre laboratoire, David Schröder a étudié en détails la spécificité de TILs CD8⁺ extraits de 6 carcinomes primaires invasifs du sein, non métastatiques et naïfs de tout traitement oncologique (données soumises pour publication).

Brièvement, il a trié et cloné les TILs CD8⁺ par cytométrie de flux puis les a stimulés *in vitro* de manière aspécifique. Il a obtenu entre 71 et 203 clones stables par patiente. Parmi ces clones, il a testé la spécificité tumorale de 57 à 142 clonotypes par patiente. Pour cela, il les a cultivés avec des B-EBV autologues préalablement incubés avec des pools de peptides mutants déterminés à partir des données de séquençage d'exome et de RNAseq. Le séquençage de l'exome a permis de détecter les mutations somatiques non synonymes de la tumeur parmi lesquelles il s'est intéressé aux mutations faux sens et aux indels. Les données de RNAseq ont été utilisées afin de garder uniquement les mutations dans des gènes bien exprimés dans la tumeur. Ces données ont aussi permis d'analyser l'expression tumorale des gènes de type *MAGE*. Il a également testé la spécificité des clones T CD8⁺ contre les produits des gènes *MAGE* exprimés ainsi que contre HER2 pour les patientes surexprimant cette protéine. Pour ces deux derniers types d'antigènes, il a transduit les B-EBV autologues avec les gènes en question. La Table 1.3 reprend les caractéristiques générales des 6 tumeurs et les résultats des clones testés. Sur les 6 tumeurs analysées, il n'a pu mettre en évidence des T CD8⁺ spécifiques de peptides mutants que dans une seule. Mais dans cette tumeur près de 10% des clones CD8⁺

testés, appartenant à 6 clonotypes différents, se sont avérés spécifiques de la tumeur, reconnaissant 4 peptides mutants. De plus, la tumeur luminal B/HER2⁻ de cette patiente (P143), présentait un nombre de mutations nettement supérieur aux autres suite à une instabilité des microsatellites (MSI⁺), phénomène rare dans le cancer du sein (<2%) ⁸⁴. Malgré les biais techniques de cette étude, en particulier le fait que tous les TILs CD8⁺ n'ont certainement pas été à l'origine d'un clone utilisable pour ces tests, et la limitation des antigènes tumoraux candidats à ceux qui sont codés par les gènes mutés dans la tumeur, et aux gènes *ERBB2* ou de type *MAGE*, la conclusion fut que ces carcinomes primaires invasifs ne contenaient que rarement des lymphocytes T CD8⁺ anti-tumoraux, pour autant que l'on puisse conclure d'une petite série. Ceci suggère que simplement diminuer des phénomènes d'immunosuppression locale dans ces tumeurs n'aura que peu d'impact clinique.

Les carcinomes du sein sont donc clairement peu immunogéniques non seulement au stade métastatique mais également au stade précoce. L'explication la plus souvent évoquée est la faible antigénicité des carcinomes du sein. En effet, ces tumeurs ont un taux de mutations nettement plus faible que d'autres tumeurs pour lesquelles l'efficacité de l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 a modifié drastiquement le pronostic (mélanome, poumon et tête et cou, principalement) ⁸⁵. Mais le taux de mutations faible n'explique pas tout car même parmi le sous-type TN qui présente le plus de mutations ⁸⁴, seulement une faible proportion répond aux anticorps immunostimulants. Le statut PD-L1 des tumeurs n'est pas non plus un bon biomarqueur. L'hypothèse que le cancer du sein peut être précocément contrôlé par le système immunitaire est soutenue par les résultats préliminaires prometteurs des études cliniques associant blocage de la voie PD-1 et chimiothérapie néo-adjuvante. Cependant, même à ce stade, peu de réponses T anti-tumorales spontanées sont détectées.

Il serait intéressant d'aller voir encore plus tôt dans la maladie, au stade de carcinome canalaire *in situ* (CCIS). C'est une lésion pré-tumorale dont nous sommes incapables à l'heure actuelle de prédire lesquelles évolueront en carcinomes canaux invasifs (CCI). Dans ce contexte, toutes les lésions de CCIS diagnostiquées sont traitées au minimum par de la chirurgie rendant accessible l'étude de leur microenvironnement immunitaire. Notre hypothèse est la suivante: la majorité des réponses lymphocytaires T CD8 seraient déjà présentes au stade *in situ* et la pression de sélection réalisée par le système immunitaire, soit éliminerait ces tumeurs débutantes soit ferait émerger des clones tumoraux résistants permettant la progression vers le stade invasif.

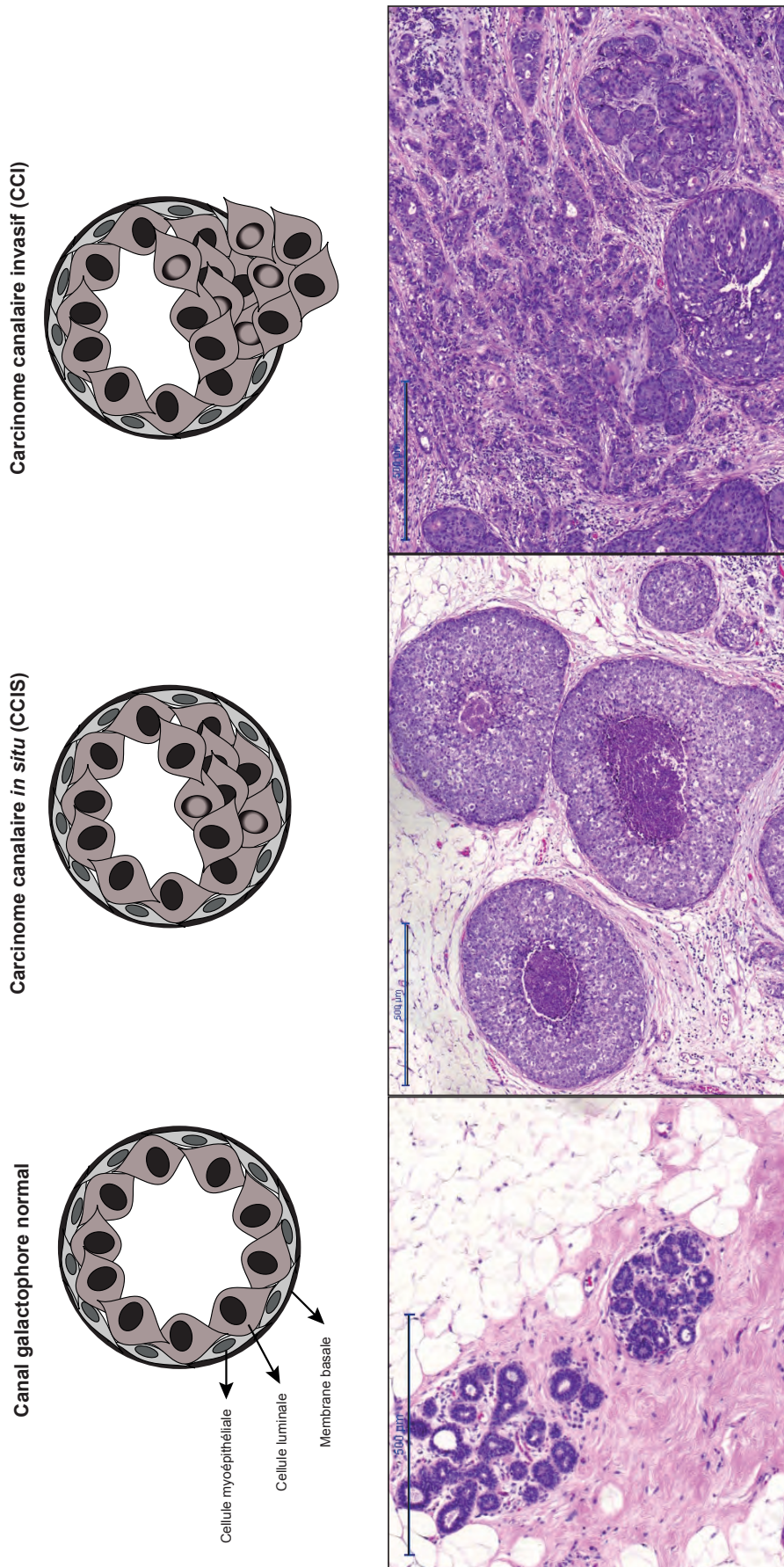


Figure 1.6. Développement d'un carcinome canalaire *in situ* (CCIS) et invasif (CCI). Schématisation en coupe transversale des composantes d'un canal galactophore normal puis d'un CCIS avec prolifération endoluminale de cellules épithéliales atypiques puis d'un CCI où les cellules atypiques franchissent la membrane basale pour envahir le tissu stromal adjacent. Images histologiques avec coloration hématoxyline et éosine illustrant les différents stades décrits ci-dessus. La barre représente 500 µm.

4. Le carcinome canalaire *in situ* du sein (CCIS)

Le CCIS est une lésion tumorale du sein considérée comme un précurseur non obligatoire du carcinome canalaire invasif (CCI). Il est défini par une prolifération de cellules épithéliales devenues dysplasiques dans la lumière des canaux galactophores, sans rupture de la membrane basale ni envahissement des tissus voisins (Figure 1.6). Il est classé en trois grades sur base d'atypies nucléaires : I ou bas, II ou intermédiaire et III ou haut ⁸⁶. Suite à la mise en place du dépistage systématique par mammographie, son incidence est passée de 1-2% à 20% des cancers du sein nouvellement diagnostiqués ^{87,88}. Bien que la mortalité liée au CCIS soit très faible, 3,3% à 20 ans, celle-ci augmente nettement (x18) chez les patientes qui développent un CCI homolatéral après un CCIS ⁸⁹. On estime à 50% le nombre de CCIS évoluant en CCI ⁹⁰. Il a été démontré que certains facteurs de risque sont associés au développement d'un CCI mais aucun n'est suffisamment robuste pour prédire quelles lésions de CCIS vont progresser vers une forme invasive. La conséquence majeure est que tous les CCIS sont traités au minimum par un geste chirurgical qui peut aller jusqu'à la mastectomie. Certaines patientes reçoivent également de la radiothérapie et/ou de l'hormonothérapie ³⁷. Il est donc fort probable qu'une proportion non négligeable de patientes soient traitées de manière excessive. Plusieurs axes de recherche sont actuellement explorés pour essayer de comprendre l'histoire naturelle de l'évolution du CCIS vers le CCI. Il est vraisemblable que, dans certains cas, sous la pression de sélection par le système immunitaire, un ou des clones tumoraux échappent à la lyse par les CTL anti-tumoraux et permettent le développement de tumeurs invasives. Une première étape pour valider cette hypothèse est de démontrer la présence de lymphocytes T CD8 anti-tumoraux dans des lésions de CCIS. Ensuite, il faut déterminer quels sont les facteurs permettant aux cellules tumorales d'échapper à la reconnaissance par ces cellules. Dans la section suivante, nous allons développer les facteurs évoqués dans l'histoire naturelle du CCIS ainsi que les arguments en faveur d'une implication du système immunitaire.

4.1. Histoire naturelle du CCIS

Bien que l'histoire naturelle du CCIS fasse l'objet d'intenses recherches depuis des années, rien ne permet de prédire son évolution. Plusieurs scénarios peuvent être envisagés et nous allons les documenter sur base d'éléments publiés.

4.1.1. La régression spontanée

On retrouve quelques cas décrits aussi bien pour les CCI que les CCIS mais la régression spontanée d'un CCIS confirmé microscopiquement est difficile à mettre en évidence car on ne peut pas exclure que la biopsie diagnostique ait enlevé toute la tumeur. Par contre, des caractéristiques histologiques dites de « guérison » (« healing phenomenon » ou « regressive changes ») sont apparemment décrites depuis longtemps ⁹¹. Ce phénomène concernerait essentiellement des foyers de CCIS plutôt que CCI, souvent de haut grade et de type comédocarcinome ^{92,93}. Plusieurs phases sont décrites : au départ il y a une légère fibrose péri-canalaire associée à une importante quantité de TILs, ensuite la fibrose se majore de manière concentrique avec une disparition progressive des cellules tumorales, une diminution de la quantité de TILs et l'apparition de cellules géantes et de macrophages avec des stigmates de phagocytose ⁹¹. Morita et coll. ont analysé 82 pièces chirurgicales de CCIS et décrit ce phénomène dans 2/3 des cas mais ils n'ont jamais mis en évidence de régression complète. Précédemment, Wasserman et coll. ont analysé 52 cas de CCIS de haut grade dans des pièces de biopsies et décrit des « changements régressifs » dans plus de 90% des cas ⁹³. Les différentes phases sont souvent observées dans une même tumeur et associées à des facteurs de mauvais pronostic comme un grade élevé, un statut HER2⁺ et de la comédo-nécrose ⁹¹. A notre connaissance, aucun processus biologique expliquant ces observations n'a été démontré et il n'y a pas d'étude de corrélation avec une réponse clinique ou la survie.

4.1.2. CCIS non traité et non évolutif

Les principales données dont nous disposons proviennent d'une part d'études d'autopsies chez des patientes n'ayant aucune histoire de cancer du sein, et d'autre part d'études rétrospectives de cas de CCIS diagnostiqués mais non traités ou préalablement considérés comme des lésions bénignes et *de facto* non traités, sauf si la biopsie diagnostique y parvient. Deux revues systématiques ont analysé des séries d'autopsies réalisées chez des femmes n'ayant aucun antécédent de cancer du sein: Welch et coll. rapportent une prévalence médiane de CCIS de

8,9% (de 0 à 14,7% sur 13 séries d'autopsies) tandis que Thomas et coll. estiment la prévalence de lésions *in situ* à 8,9%. La prévalence est plus élevée chez les femmes entre 40 et 70 ans. A titre comparatif, la prévalence de cancer de la prostate découvert à l'autopsie chez les hommes de plus de 79 ans est de l'ordre de 60% ^{94,95}. Bien qu'il y ait plusieurs biais liés à ces analyses (âges des sujets, nombre de lames étudiées, périodes analysées et mise en place du programme de dépistage), cela suggère qu'un certain nombre de lésions CCIS ne deviennent jamais cliniquement significatives.

Plusieurs groupes ont essayé de déterminer la proportion de CCIS évoluant vers un CCI en l'absence de traitement ainsi que les facteurs y prédisposant. Ce sont toutes des études rétrospectives dont 3 études de cohorte qui ont analysé des biopsies archivées de lésions mammaires considérées comme bénignes, à la recherche de CCIS de bas grade ⁹⁶⁻⁹⁹. Collins et coll. ont réalisé une étude cas-contrôles en établissant une sous-cohorte de patientes ayant eu une biopsie d'une lésion s'avérant bénigne, à partir de deux cohortes de patientes (1976 et 1989) participant à une étude épidémiologique sur la survenue de pathologies mammaires. Entre 1994 et 1995, ils ont identifié les patientes ayant développé un CCI et ont revu les biopsies considérées comme bénignes afin de sélectionner celles où il y avait finalement du CCIS définissant « les cas » tandis que les contrôles étaient des patientes avec des lésions non prolifératives confirmées ¹⁰⁰. Sagara et coll. ont mené une autre étude cas-contrôles en comparant des patientes présentant un CCIS non traité versus traité chirurgicalement à partir de la base de données SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results, Dana-Farber Women's Cancer Center) ¹⁰¹. Plus récemment, Maxwell et coll. ont publié les résultats d'une étude de cohorte de CCIS non traités chirurgicalement sur base de données issues de registres du cancer⁹⁰.

Table 1.4. Etudes analysant la progression ou la survie de CCIS non traités chirurgicalement après biopsie diagnostique

Publication	Type d'étude	Période analysée	Nbre patientes incluses	Caract. Histo. CCIS	Suivi post biopsie diag. (années)	Progression/survie
Rosen, 1980 Betsill, 1978	Etude de cohorte rétrospective de 8609 biopsies considérées comme bénignes	1940-1950	15	Bas grade, non-papillaire, non-comédo	21,6 (moyen)	8/15 développent CCI (intervalle moyen 9,7 ans), 2/15 CCIS
Eusebi, 1994	Etude de cohorte rétrospective de 9446 biopsies considérées comme bénignes	1964-1976	80	Tous types de CCIS	17,5 (moyen)	11/80 développent CCI, 7 décès après suivi médian de 11 ans. 5/80 récidivent CCIS
Sanders, 2005 Page, 1982 Page, 1995	Etude de cohorte rétrospective de 10 760 biopsies considérées comme bénignes	1950-1968	28	Petit, bas grade, non-comédo	46	11/28 développent CCI (intervalle médian 10 ans) 5/11 décès après suivi médian de 5 ans
Collins, 2005	Etude cas-contrôles rétrospective de 1877 biopsies considérées comme bénignes. Sélection des cas et des contrôles à partir de deux cohortes de patientes. Cas (371): Diagnostic confirmé de carcinome mammaire entre 1994-1995. Contrôles (1506): lésions non prolifératives.	1994-1995	13 (10 DCIS et 3 contrôles)	4 grade I 6 grades II 3 grades III non-comédo	non mentionné	6 développent CCI dont 2 de chaque grade (intervalle moyen de 9 ans), 4 CCIS
Sagara, 2015	Etude cas-contrôles rétrospective de femmes avec un diagnostic de CCIS documenté dans la SEER Database. 1169 cas non traités chirurgicalement et 56 053 contrôles traités par de la chirurgie.	1988-2011	57222	9050 grade I 22056 gr II 26116 gr III	6 (médiane)	Meilleure BCSS à 10 ans dans le groupe traité vs non traité pour gr III et II ($p<0,001$), pas de différence pour les gr I ($p=0,83$) (pas de données sur la progression en CCI)
Maxwell, 2018	Etude de cohorte rétrospective de femmes avec un diagnostic de CCIS documenté dans un registre du cancer et non traité chirurgicalement (44 ont reçu hormonothérapie). 44% diagnostiqués via le dépistage systématique, le reste étant symptomatique.	1998-2010	89	29 grade III 31 grade II 17 grade I 12 inconnus	5 (médiane)	29/89 développent CCI: 14/29 grade III, 10/31 grade II, 3/17 grade I (intervalle médian 38, 60, 51 mois, respectivement) et 2 de grade inconnu. 7 décès certifiés reliés au CCI (intervalle médian 62 mois)

CCIS: carcinome canalaire in situ ; CCI: carcinome canalaire invasif ; BCSS: Breast-cancer specific survival

Table adaptée de N. Segnan, Int. J. Cancer 2016 avec des données supplémentaires de A. V. Barrio, Annu Rev Med 2017 et M. Van Bockstal, Int. J. Cancer 2019. ainsi que les données des études concernées

La Table 1.4 résume les caractéristiques et les données de ces études concernant la progression ou la survie (adaptée à partir de 3 revues de la littérature ¹⁰²⁻¹⁰⁴). Ces études sont difficilement comparables car elles diffèrent quant à leur protocole, leur période analysée, leur nombre de patientes, les critères de sélection des CCIS et le suivi. Il y a également pas mal de limites à ces études liées à leur nature rétrospective. Cependant certaines observations sont intéressantes à discuter.

Le développement d'un CCI se fait toujours dans le même sein et majoritairement dans le même quadrant où la biopsie a été réalisée. C'est une des raisons pour laquelle le CCIS est défini comme une lésion précurseur (non-obligatoire) du CCI. Les CCIS de grade I peuvent aussi évoluer en CCI mais cela semble moins fréquent que pour les grades II et III. L'incidence cumulée de CCI est significativement plus importante pour les CCIS de grade III ^{90,100}. Maxwell et coll. estiment qu'environ 50% des CCIS de haut grade développeront un CCI dans les 5 ans. Le risque de progression est probablement sous-estimé car certains CCIS ont pu être entièrement réséqués avec la biopsie, notamment pour les grades I souvent de plus petite taille au diagnostic. Quant aux données de survie, Sagara et coll., dont l'analyse porte sur le plus grand nombre de patientes, montrent que pour les CCIS de grade I, il n'y a pas de différence significative entre le groupe traité chirurgicalement et celui non traité. Par contre, il y a un bénéfice en termes de survie spécifiquement liée au cancer du sein (BCSS : breast-cancer specific survival) pour les grades II et III. A noter que la BCSS à 10 ans des patientes non traitées chirurgicalement est de 93,4% tous grades confondus ¹⁰¹. Il faut interpréter ces résultats avec précaution car étant rétrospective et malgré une analyse multivariée, cette étude présente des limites par rapport à la prise en compte de certaines co-variables pouvant influencer ceux-ci (ex : âge plus jeune dans le groupe traité, pas d'information sur une éventuelle hormonothérapie donnée à la place de la chirurgie). De plus, le suivi est relativement court sachant que les CCIS de bas grade évoluent majoritairement dans les 15 premières années voire même plus tard ⁹⁹.

Mais ce que ces chiffres montrent, c'est qu'il y a bien un réservoir de lésions de CCIS (surtout parmi les grades I et II) qui restent indolents très longtemps et qu'aucun facteur ne permet de le prédire. Dans ce but, 4 études de phase III prospectives randomisées de non infériorité en termes de développement d'un CCI homolatéral sont en cours. Elles comparent la surveillance active à la chirurgie pour des CCIS de faible risque, avec un volet translationnel d'analyse des tissus collectés et des imageries réalisées à différents moments ¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

4.1.3. CCIS évolutif

Bien que le nombre de cas de CCIS diagnostiqués ait augmenté drastiquement depuis l'instauration du dépistage systématique, on n'a pas mis en évidence une diminution concomitante du nombre de cas de CCI ¹⁰⁹. Donc le CCIS est un précurseur non obligatoire en considérant que certains cancers du sein seraient d'emblée invasifs. Mais cela souligne à nouveau le fait qu'une proportion de CCIS n'évoluerait pas en CCI. Sur bases des études décrites précédemment sur les CCIS non traités après la biopsie diagnostique, certains ont estimé le risque de progression vers un CCI entre 20 et 53% dans un intervalle moyen de 10 ans ^{102,110}. Si on s'intéresse au CCIS de haut grade, 50% des femmes vont développer un CCI dans les 5 ans alors que moins de 25% des femmes avec un CCIS de bas grade évolueront ⁹⁰. Actuellement le risque de progression en CCI est évalué uniquement sur des paramètres clinico-pathologiques: âge plus jeune, haut grade, présence de micro-calcifications à la mammographie (controversé) et ne pas être traité par hormonothérapie ⁹⁰. Cependant aucun de ces facteurs seul ou même une combinaison particulière de facteurs n'est suffisant pour prédire quelle lésion *in situ* va progresser vers le stade invasif.

4.1.4. Récidive après traitement

Comme nous sommes incapables de prédire quelle lésion va évoluer en cancer invasif, tous les CCIS sont traités au minimum par de la chirurgie pouvant aller jusqu'à la mastectomie. En fonction de certains facteurs de risque de récurrence, un traitement adjuvant par radiothérapie et/ou hormonothérapie est proposé. Sur base des premières études prospectives analysant le bénéfice des traitements adjuvants, le risque de récurrence total (sous forme invasive et *in situ*) après chirurgie conservatrice seule varie de 26 à 36% avec un suivi de 13 à 20 ans ¹⁰². Ce risque a diminué au cours du temps, il est de 19,4% à 15 ans sous forme invasive ¹¹¹. Cette diminution est attribuée à l'amélioration des techniques de radiologie et d'anatomo-pathologie analysant les pièces opératoires. Il serait de 15,6% à 10 ans en cas de CCIS de bas grade ¹¹². A noter que ces derniers peuvent progresser en CCI jusqu'à 40 ans après le diagnostic ⁹⁹. Mais seulement 50% des récurrences sont invasives ¹⁰². Les récurrences sous forme *in situ* sont probablement des maladies résiduelles suite à une résection non optimale.

Les facteurs de risque de récurrence sous forme invasive sont: le jeune âge (2 à 3 fois plus de risque < 50 ans et encore plus quand < 40 ans), un CCIS symptomatique (versus détecté lors du dépistage), des antécédents familiaux de cancer du sein, la taille et la multifocalité, le grade, la présence de comédo-nécrose, et des marges chirurgicales positives (pas de consensus quant à

une largeur optimale)^{86,113}. D'autres facteurs moins utilisés en pratique clinique ont aussi été identifiés mais moins validés sur de multiples cohortes: statut ER⁻, statut HER2⁺ et le pattern d'expression p16⁺ COX2⁺ Ki67⁺⁸⁶. Les CCIS de haut grade récidivent également dans un intervalle de temps plus court que les bas grades^{99,103}. Concernant le statut HER2, les CCIS HER2⁺ récidiveraient plutôt sous forme *in situ* alors que les HER2⁻ le feraient sous forme invasive¹⁰³.

Quant aux traitements adjuvants, la radiothérapie réalisée après chirurgie conservatrice diminue de 50% le taux de récurrence homolatérale invasive ou *in situ*, tandis que l'hormonothérapie a surtout un effet sur le taux de récurrence homolatérale *in situ* mais réduit également le taux de développement de CCI contralatérale. Par contre, aucun de ces traitements n'a d'impact sur la survie^{86,89,102,109,114}. De plus, les études sur le bénéfice de ces traitements adjuvants n'ont pas réussi à mettre en évidence un groupe de patientes à bas risque pour lesquelles nous pourrions les éviter.

En routine, nous utilisons l'index pronostique de Van Nuys qui se base uniquement sur la taille, les marges, le grade et l'âge pour déterminer un score de risque de récurrence permettant de décider si nous réalisons de la radiothérapie après la chirurgie conservatrice, bien que cet index n'ait été validé que de manière rétrospective¹¹⁵. Certains ont tenté d'affiner la prédiction du risque de récurrence avec des profils transcriptomiques. Le score « OncotypeDX for DCIS » (DCIS : ductal carcinoma *in situ*) se base sur l'expression de 12 gènes et classe les patientes selon leur risque de récurrence en faible, moyen ou haut risque. Il est très peu utilisé en clinique car le taux de récurrence du groupe considéré à faible risque est de 12% à 10 ans, ce qui reste élevé pour un grand nombre de cliniciens, et d'autre part, il n'a pas un meilleur rapport coût/efficacité que les facteurs clinico-pathologiques actuels^{102,109,110}. Probablement qu'en associant des facteurs clinico-pathologiques et des analyses moléculaires, nous parviendrons à établir des scores de prédiction plus robustes. Des études à ce sujet sont en cours.

4.2. Comparaison entre le CCIS et le CCI d'un point de vue moléculaire

Pour comprendre les mécanismes de la progression des lésions *in situ* vers le stade invasif, il y a deux grandes hypothèses: accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques ou micro-environnement plus permissif. Plusieurs groupes ont comparé génétiquement les CCIS et CCI ou bien les composantes *in situ* et invasive dans des tumeurs mixtes afin de mettre en évidence l'accumulation d'altérations clés pouvant être responsables de la progression vers le stade invasif. En fait, CCIS et CCI sont très similaires pour leurs taux de mutations, profil

d'expression de gènes, altération du nombre de copies de gènes et profil de méthylation ¹⁰⁹. En se basant sur la traduction immunohistochimique des profils d'expression de gènes décrits par Perou et Sorlie, les CCIS peuvent être classés selon les mêmes 4 sous-types moléculaires principaux que les CCI ^{116,117}. Là où cela diffère entre les deux stades, c'est au niveau des proportions de ces sous-types. En effet, parmi les CCIS, les triples négatifs sont plus rares tandis qu'on observe une plus grande proportion de tumeurs HER2⁺ ^{118,119}. Contrairement au CCI, ces sous-types ont une valeur pronostique beaucoup plus limitée ¹¹⁸.

Au niveau transcriptomique, un des premiers groupes à avoir comparé tissu mammaire normal, CCIS et CCI a mis en évidence que les principaux changements s'opéraient entre le tissu normal et CCIS sans claire différence entre CCIS et CCI ou métastase. La transition est marquée essentiellement par une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation épithéliale ¹²⁰. Ensuite, Ma et coll. ont confirmé, en associant transcriptomique à haut débit et microdissections laser, qu'il y avait une grande similarité entre les différents stades histologiques d'hyperplasie canalaire atypique, de CCIS et CCI présents dans le même tissu mammaire de 36 patientes ¹²¹. Par une analyse de clustering non supervisée, le groupe de Sorlie a comparé les profils d'expression de gènes de 31 CCIS purs, 42 mixtes CCIS-CCI et 36 CCI. Ils ont démontré que les clusters se formaient selon les sous-types moléculaires, indépendamment du stade ¹¹⁷. Plus récemment, le même groupe, par RNAseq sur 59 CCIS purs, 16 mixtes et 85 CCI de petite taille, a montré que les gènes qui différencient CCIS et CCI varient d'un sous-type moléculaire à l'autre. Certaines voies dans lesquelles ces gènes sont impliqués sont spécifiques d'un sous-type, par exemple le sous-type basal-like est enrichi en gènes de réponse immunitaire T, et concernent le micro-environnement plutôt que la composante épithéliale ¹²².

Concernant les altérations du nombre de copies de gènes (CNA : copy number alterations), que ce soit en comparant des CCIS purs aux CCI ¹²²⁻¹²⁴, ou la composante *in situ* à la composante invasive au sein d'une lésion mixte ¹²⁵⁻¹²⁷, ou CCIS purs versus mixtes ^{122,125,126}, ou encore CCIS purs primaires et la récurrence sous forme invasive ¹²⁸, tous les auteurs s'accordent sur le fait que les CNA sont déjà présentes au stade *in situ* et ne se modifient plus lors de la progression vers le stade invasif. La concordance est plus importante entre la composante *in situ* et invasive d'une même lésion qu'entre les composantes *in situ* de différentes lésions ^{126,127}. Ce sont les tumeurs de haut grade et de type basal-like qui ont le plus de CNA ¹²². Les oncogènes affichant le plus fréquemment un gain de copies sont *ERBB2*, *MYC* et *FGFR1* tandis que les gènes suppresseurs de tumeurs affichant le plus fréquemment une perte sont *TP53*, *BRCA1* et *BRCA2* ^{125,127,128}.

Concernant le taux de mutations somatiques, là non plus il n'y a pas de différence significative entre CCIS et CCI ^{124,126,128}. Le partage des mutations est très élevé entre la composante *in situ* et invasive d'une même tumeur ¹²⁵ mais plutôt faible entre patientes ou entre CCIS primaires et leurs récurrences invasives ¹²⁸. Les CCIS de grade III, ou de sous-types moléculaires TN et HER2⁺ ont plus de mutations somatiques non synonymes que ceux de grade II ou de sous-type luminal ¹²⁵. De manière intéressante, sur base de la comparaison des mutations somatiques entre composante *in situ* et invasive d'une même tumeur, une évolution clonale n'est mise en évidence que dans 28% des cas ¹²⁵.

Si on s'intéresse aux mutations fréquemment observées dans les gènes « drivers » du cancer du sein, on retrouve le même profil au stade *in situ* qu'invasif. *TP53* et *PIK3CA* sont les plus fréquemment mutés mais un peu moins dans les CCIS purs que ceux synchrones avec du CCI ^{122,124-128}. Certains les retrouvent même dans le tissu normal adjacent, suggérant que ces événements sont très précoces dans l'oncogenèse ¹²⁸. Comme pour les CCI, on retrouve les mêmes associations entre ces mutations et les sous-types moléculaires: mutations *TP53* surtout dans les HER2⁺ et TN, mutations *PIK3CA* surtout dans les ER⁺ ^{123-125,127}.

Récemment, Casasent et coll. ont utilisé une nouvelle technique associant l'analyse de CNA à l'échelle de la cellule unique à des données spatiales sur coupe histologique (TSCS : Topographic single cell sequencing). Ils ont analysé 10 lésions mixtes CCIS-CCI de haut grade et y ont associé des données de séquençage d'exome (mutations et CNA) après microdissection de chaque composante. Ils ont à nouveau démontré une haute concordance en termes d'anomalies génomiques entre les deux composantes (*in situ* et invasive) avec un enrichissement de certaines anomalies spécifiques à chaque patiente au sein même des lésions *in situ* puis au niveau invasif. Leurs résultats suggèrent un modèle de progression polyclonale où la majorité des anomalies apparaissent au sein du canal avant d'envahir le tissu stromal ¹²⁹. Enfin, d'un point de vue épigénétique, certaines anomalies de méthylation sont déjà observées au stade *in situ* également ¹²⁴. A nouveau, le profil de méthylation change entre tissu mammaire normal et CCIS pur mais il est homogène dans les lésions mixtes CCIS-CCI comme dans les cancers invasifs ⁸⁶.

En résumé, la majorité des anomalies génétiques et épigénétiques dans les cellules épithéliales sont déjà acquises au stade *in situ* et actuellement aucune différence significative n'a été mise en évidence par rapport au stade invasif. Ceci supporte l'hypothèse que le CCIS est une lésion précurseur non-obligatoire du CCI. De plus, l'ensemble de ces données suggèrent que l'oncogenèse du cancer du sein ne suit pas un modèle linéaire mais que l'histoire naturelle de progression du stade *in situ* vers le stade invasif est propre à chaque sous-type moléculaire avec

une évolution qui n'est pas systématiquement liée à un clone tumoral résistant ou ayant acquis des capacités invasives, ce qui ouvre la porte aux influences du micro-environnement.

4.3. Rôle du micro-environnement

Ce micro-environnement comprend les cellules myéoépithéliales, les fibroblastes du stroma, les cellules endothéliales du système vasculaire et les cellules immunitaires. Nous allons évoquer brièvement le rôle possible de chaque population et développerons dans la section suivante l'implication du système immunitaire au stade précoce du cancer du sein.

4.3.1. Les cellules myéoépithéliales

Dans la glande mammaire normale, les cellules myéoépithéliales forment une couche qui sépare les cellules luminales épithéliales de la membrane basale. Elles contribuent à la différenciation, la prolifération et la polarisation des cellules luminales ainsi qu'à la production de la membrane basale. Par leur activité contractile elles jouent également un rôle important dans le développement des canaux galactophores et dans la lactation ^{130,131}. La perte des cellules myéoépithéliales et la rupture de la membrane basale caractérisent la progression d'une lésion *in situ* en invasive. Pour aider à déterminer la nature invasive d'une lésion de CCIS douteuse, des marqueurs myéoépithéliaux sont utilisés en routine clinique (ex : p63, SMA pour alpha smooth muscle actine et calponine-1) ¹³¹⁻¹³³. Les cellules myéoépithéliales auraient aussi des propriétés anti-invasives, essentiellement décrites *in vitro*, comme barrière physique mais aussi en sécrétant des molécules anti-angiogéniques, comme la maspine ou la thrombospondine-1, et anti-invasives en sécrétant par exemple des inhibiteurs de protéases de la matrice extracellulaire produites par les cellules tumorales ¹³⁴⁻¹³⁶. Des analyses transcriptomiques ont mis en évidence la perte d'expression de certaines de ces molécules entre le tissu mammaire normal et les CCIS ou entre les CCIS de bas grade et de haut grade ou entre CCIS purs et mixtes ¹³⁴⁻¹³⁶. Mais globalement, cela reste peu validé dans les échantillons humains ¹³⁰.

D'autres études ont mis en évidence de potentielles propriétés qui favoriseraient la progression vers le stade invasif. Cependant, les mécanismes suggérés comme la sécrétion de chémokines ¹³⁷ ou de TGF β favorisant l'EMT (epithelial-mesenchymal transition) ^{138,139} ou l'expression de l'intégrine $\alpha v \beta 6$ ¹⁴⁰ sont décrits uniquement *in vitro* avec quelques données d'expression dans des échantillons humains ¹³⁰.

Les différences d'expression de ces marqueurs pro ou anti-tumoraux sont essentiellement observées entre cellules myoépithéliales normales et associées au CCIS mais aucune différence n'a été mise en évidence avec la situation invasive ¹³¹.

4.3.2. Les fibroblastes

Les fibroblastes jouent un rôle mécanique et structurel important pour le développement de la glande mammaire notamment par la production de molécules de la matrice extra-cellulaire (collagène et fibronectine) et des métalloprotéinases participant au remodelage de cette matrice ¹³⁰. Les CAFs (Cancer-associated fibroblasts) seraient liés à la progression du cancer du sein par plusieurs mécanismes incluant la production de métalloprotéinases, chémokines, cytokines comme TGF- β , IL-6 et CXCL1, facteurs de croissance comme EGF et HGF et facteurs angiogéniques comme VEGFa et PDGF, et aussi par un réarrangement des fibres de collagène de la matrice extra-cellulaire ^{141 130}. Le TGF- β jouerait un rôle important dans le recrutement, la prolifération et la capacité d'invasion des CAFs ¹⁴¹. Les CAFs pourraient également jouer un rôle indirect dans la progression via les cytokines qu'ils sécrètent et qui pourraient altérer la fonction des cellules immunitaires ou créer une barrière physique en remodelant la matrice extra-cellulaire. De plus, les CAFs expriment PD-L1 et PD-L2 et peuvent donc inhiber directement les lymphocytes T effecteurs. Ces différents rôles sont suggérés par des modèles *in vitro* ou *in vivo* dans la souris ¹⁴¹. On leur attribue également un rôle dans la résistance au traitement. Dans le cancer du sein une signature d'expression de gènes associée au stroma est corrélée à une résistance à la chimiothérapie et est un facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante ¹⁴². Récemment, à partir de CCI primaires Costa et coll. ont identifié, sur base de 6 marqueurs en cytométrie de flux, 4 sous-populations de CAFs enrichies de manière différente selon les sous-types moléculaires ¹⁴³. Les sous-populations CAF-S1 et CAF-S4 sont présentes surtout dans les TN. Les tumeurs TN enrichies en CAF-S1 ont moins de TILs CD8⁺ et plus de TILs FOXP3⁺ que les tumeurs enrichies en CAF-S4. Ils ont réalisé des tests fonctionnels *in vitro* montrant que les CAF-S1 augmentent plus que ne le font les CAF-S4 les capacités de migration des T CD4⁺CD25⁺ et anti-prolifératives des T CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^{low} provenant de cellules mononuclées du sang de donneurs sains. Ces résultats soulignent l'hétérogénéité des CAFs et leurs interactions différentes avec le système immunitaire. Certaines populations de CAFs pourraient donc avoir un rôle dans la progression du cancer du sein par un effet immunosuppresseur. Dans le même ordre d'idée, Lee et coll. ont mis en évidence dans des CCIS que l'expression de plusieurs protéines considérées

comme des marqueurs de CAFs au niveau des cellules du stroma varient selon les sous-types moléculaires et le pattern du stroma (normal versus desmoplastique/fibrotique versus inflammatoire). Cette expression est plus importante dans les tumeurs HER2⁺ et TN ¹⁴⁴. Les autres études du rôle des CAFs dans les tumeurs *in situ* sur des échantillons humains sont moins pertinentes car elles n'évaluent qu'un marqueur à la fois. A notre connaissance, aucun mécanisme impliqué dans la progression des lésions CCIS n'a été formellement établi jusqu'à présent.

4.3.3. L'angiogenèse

La néo-angiogenèse est ce phénomène par lequel la tumeur lorsqu'elle atteint une certaine taille et un certain niveau d'hypoxie, va stimuler la formation de nouveaux vaisseaux en sécrétant des facteurs de croissance. C'est une étape clé dans la progression tumorale et la capacité à métastaser ¹⁴⁵.

Sur base d'études transcriptomiques, le micro-environnement vasculaire des CCIS serait altéré par rapport à celui du tissu mammaire normal ¹⁰⁹. Depuis plusieurs années, deux patterns de vascularisation ont été décrits dans les lésions de CCIS mais pas observés dans le tissu normal: l'infiltration diffuse de petits vaisseaux au sein du stroma ou la formation d'un anneau autour des canaux tumoraux ¹⁴⁶. Bien que le pattern diffus soit associé à des facteurs de mauvais pronostic, aucun lien avec la progression ou la récurrence sous forme invasive n'a été démontré ¹⁰⁹. Peu d'études récentes se sont intéressées à l'angiogenèse dans les stades précoces du cancer du sein comparé à ce qui est décrit dans les stades avancés. Il semblerait que ce phénomène survienne très précocement, bien avant le stade de CCIS. Une majoration de la densité en micro-vaisseaux, évaluée par des marquages CD31 et CD105, s'observe déjà au stade d'hyperplasie canalaire et augmente progressivement avec l'évolution des lésions jusqu'aux différents grades du stade *in situ* ¹⁴⁷. Cette densité en micro-vaisseaux, étudiée cette fois par l'expression du marqueur CD34, est plus importante dans les lésions de CCIS qui récidivent par la suite ¹⁴⁸. De plus, les cellules tumorales de CCIS peuvent exprimer des facteurs de croissance favorisant l'angiogenèse comme le VEGF ¹⁴⁹. Cependant, aucune étude n'a pu démontrer une différence significative avec les lésions invasives ni de valeur prédictive ou pronostique d'un quelconque pattern de vascularisation.

Bien que plusieurs pistes intéressantes impliquant ces différentes populations cellulaires du micro-environnement tumoral aient été avancées, elles nécessitent d'être validées sur des

échantillons humains et de déterminer leur impact sur des données de survie, de réponse au traitement et de récurrence. Certaines sont également à l'étude comme cibles thérapeutiques. Par contre, il existe de plus en plus de données concernant l'implication du système immunitaire dans le processus de progression des lésions de CCIS.

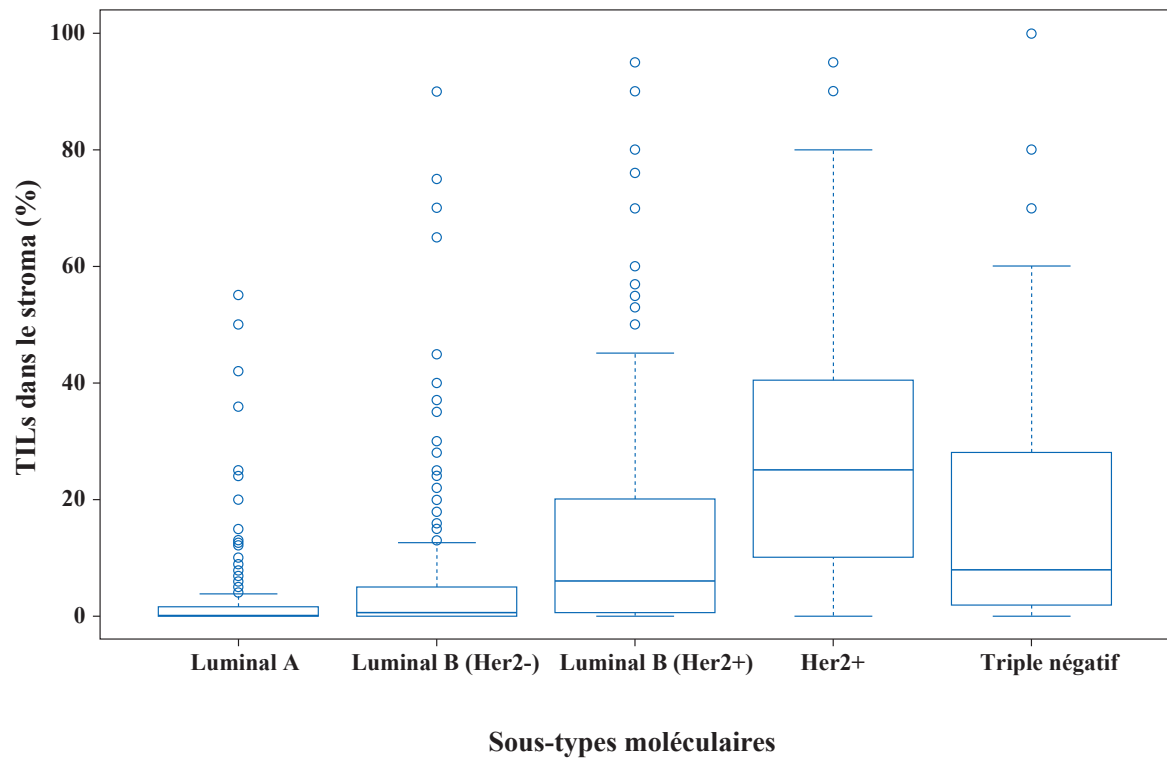


Figure 1.7. Proportions de TILs dans le stroma des CCIS en fonction du sous-type moléculaire. Box-plot de la distribution des TILs au sein de tumeurs de chaque sous-type moléculaire. La ligne horizontale au centre du cadre représente la médiane de la population (Luminal A : <1%, Luminal B/Her2neg: <1%, Luminal B/Her2pos: 6%, Her2 positifs: 25%, Triple négatif: 8%). Les extrémités inférieures et supérieures du cadre représentent les percentiles 25 et 75. Les lignes horizontales supérieures et inférieures marquent les limites de la population, les points représentent les cas extrêmes (outliers). Figure adaptée de G. Pruneri et coll, Annals of Oncology 2017.

4.4. Implication du système immunitaire

Le rôle du système immunitaire tant inné qu'adaptatif dans la progression des cancers du sein *in situ* fait l'objet d'intenses recherches. Nous nous sommes focalisés sur les données concernant les lymphocytes T CD8 vu leur rôle effecteur de la réponse immunitaire antitumorale, et les Tregs pour leur capacité à inhiber cette réponse.

4.4.1. Les TILs

Tout d'abord, bien que ce soit en très petit nombre, il est intéressant de noter que des lymphocytes infiltrent déjà le tissu mammaire normal et essentiellement les lobules plutôt que le stroma adjacent ¹⁵⁰.

Comme dans les CCI, les TILs dans le stroma des CCIS sont associés à des facteurs de mauvais pronostic comme la comédo-nécrose, le haut grade, la taille, le statut ER⁻ et HER2⁺ ¹⁵¹⁻¹⁵⁸. La Figure 1.7 issue de Puneri et Coll. 2017, montre les différences de proportions de TILs en fonction des sous-types moléculaires. Ce sont d'abord les sous-types surexprimant HER2 puis les TN qui contiennent le plus de TILs ^{153,156}. Les CCIS associés à une composante invasive, même micro-invasive c'est-à-dire de <1mm, ont plus de TILs dans le stroma que les CCIS purs ^{152,155,158} et ces TILs sont souvent localisés aux endroits de micro-invasion ^{86,152}. Certains auteurs montrent également une association entre la présence d'une mutation *TP53* et la densité en TILs ^{154,158}.

Concernant la valeur pronostic des TILs dans les CCIS, contrairement à ce qui est démontré pour les CCI, les données sont conflictuelles: certains ne leur attribuent pas de valeur prédictive de la récurrence tumorale ^{151,153-156,159}, alors que d'autres montrent qu'ils ont cette valeur ^{157,158}. Ceci pourrait être dû au fait que les méthodes d'évaluation varient fortement d'une étude à l'autre malgré que des recommandations aient été publiées ¹⁶⁰, ou aux tailles des cohortes étudiées et à la période de suivi. Selon nous, les données les plus convaincantes sont celles issues de l'étude de Puneri en 2017. Il s'agit de la plus grande cohorte de patientes (1488), avec un suivi médian de 8,2 ans. Ils ont quantifié les TILs selon les recommandations du *International Immuno-Oncology Biomarker Working Group* et analysé l'association entre densité de TILs (en variable continue et stratifiée) et survenue d'un événement dans le même sein (*in situ* ou invasif). Ils n'ont trouvé aucun impact sur le risque de récurrence à 10 ans même après une analyse multivariée et de sous-groupe ¹⁵³. Cependant, il serait intéressant d'avoir un suivi plus long sachant que certains CCIS peuvent récidiver jusqu'à 40 ans plus tard.

Cela dépend peut-être aussi des sous-populations de TILs. En effet, plusieurs auteurs suggèrent que les CCIS avec un ratio en faveur des TILs CD4⁺ ou FOXP3⁺ par rapport aux CD8⁺ ont une moins bonne survie sans récurrence ^{151,157,161,162}.

Concernant les CCIS purs, des données suggèrent que l'on peut les séparer en deux sous-groupes sur base de leur proportion de TILs et que ceux qui en ont une densité élevée sont similaires à des CCIS avec micro-invasion en termes de paramètres clinico-pathologiques ¹⁵⁵. Plus précisément, parmi les CCIS considérés à haut risque (grade III et taille >15 mm), deux sous-groupes avec des risques de récurrence différents se distinguent sur base de la densité en TILs et d'un marquage PD-L1⁺ des cellules du stroma ¹⁵⁸.

4.4.2. Les TILs ou T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ sont présents dans le tissu mammaire normal, au sein même de l'épithélium et de manière prédominante par rapport aux TILs CD4⁺. De plus, ils sont associés à la présence de cellules dendritiques (CD11c⁺) également présentes au contact des cellules épithéliales, ce qui suggère qu'il existe une immunosurveillance de la glande mammaire normale ¹⁵⁰.

Par contre, tout comme dans les lésions de CCI, dans les CCIS les TILs CD4⁺ sont majoritaires par rapport aux TILs CD8⁺, bien que la quantité de TILs CD8⁺ augmente dès les premières anomalies prolifératives, donc avant même le stade de CCIS ^{152,156,163,164}.

Les TILs CD8⁺ semblent associés aussi aux grades élevés, au statut ER⁻, HER2⁺, et parfois à la comédo-nécrose ^{151,162}. Cette densité en TILs CD8⁺ est plus importante en cas de micro-invasion ou de lésions mixtes ^{155,158,162}.

Il y a aussi une forte association entre la proportion de TILs CD8⁺ et la présence du « healing phenomenon » décrit plus haut ⁹¹.

Pour les CCIS purs, bien qu'il ne semble pas y avoir de différence entre les sous-types moléculaires, on en observe une plus grande densité dans les CCIS ER⁺HER2⁺ que dans les TN¹⁵⁶.

4.4.3. Les Tregs

On observe une majoration de l'infiltration par les lymphocytes T FOXP3⁺ quand on passe du tissu mammaire normal au CCIS puis au CCI^{158,165}. La densité en TILs FOXP3⁺ semble également associée à des facteurs de mauvais pronostic comme le grade III, la taille de la composante invasive, le statut HER2⁺, le statut ER⁻ et la comédo-nécrose^{151,158,162,165}. La proportion de TILs FOXP3⁺ serait plus importante dans les lésions mixtes CCIS-CCI, même si ce n'est qu'une micro-invasion, que dans les CCIS purs. Elle aurait tendance à être même plus importante dans la composante invasive que la composante *in situ*¹⁶². Certains auteurs suggèrent qu'une forte infiltration en TILs FOXP3⁺ dans les CCIS purs serait corrélée au risque de récurrence^{158,162}.

L'ensemble de ces résultats caractérisant les TILs ou les sous-populations de TILs (CD8⁺, CD4⁺, Tregs/FOXP3⁺), souvent contradictoires, ne permettent pas de mettre en évidence des différences claires entre CCIS purs et mixtes ni entre CCIS et CCI. Quant aux données sur le risque de récurrence ou de progression, elles aussi sont peu robustes. Nous pensons qu'il faut des analyses plus détaillées sur le phénotype de ces TILs en utilisant des techniques plus poussées comme l'imagerie multispectrale associée à des algorithmes de quantification automatisée et de localisation ainsi que la cytométrie de flux. Il serait également intéressant d'y associer des données transcriptomiques de ces TILs.

4.4.4. Signatures d'expression de gènes

Gil del Alcazar et coll. ont réalisé des analyses transcriptomiques sur des populations de cellules CD45⁺CD3⁺ triées à partir de tissus mammaires normaux, de CCIS et de CCI (HER2⁺ et TN)¹⁵². Une analyse de clustering hiérarchique non supervisé sépare les T des tissus normaux, des CCIS, des CCI TN et des CCI HER2⁺, avec un micro-environnement plus immunosuppresseur dans les CCI que dans les CCIS. Les CCIS sont enrichis en CTL et les CCI en Tregs. Ils ont confirmé en immunofluorescence qu'il y avait plus de T CD8⁺ GZMB⁺ Ki67⁺ IFN- γ ⁺ dans les CCIS que dans les CCI. Ils observent cette même tendance quand ils comparent la lésion de CCIS primaire avec la récurrence sous forme invasive.

Dans le même ordre d'idée, Abba et coll. ont analysé les RNAseq de 29 CCIS purs de haut grade¹²⁴. L'analyse non supervisée distingue deux groupes: DCIS-1 avec essentiellement des lésions ER⁻ ou HER2⁺ très prolifératives et DCIS-2 avec uniquement des lésions luminales peu prolifératives. Le groupe DCIS-1 est enrichi en signatures immunitaire et inflammatoire

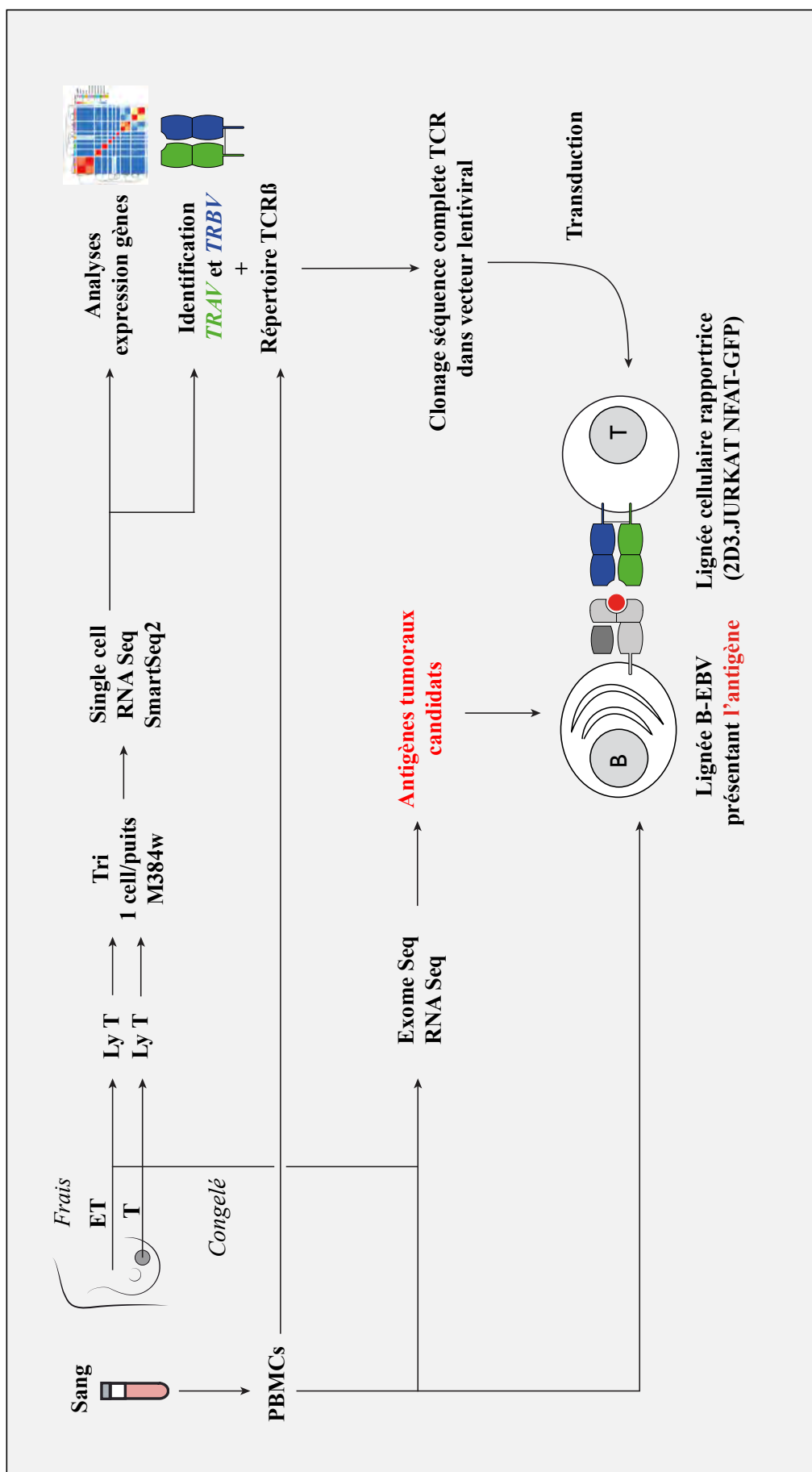


Figure 1.8. Stratégie d'identification de la spécificité de T extraits des CCIS
 ET: extra-tumoral, T: Tumoral, PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells (cellules mononucléées du sang), Ly T: lymphocytes T

corrélées avec une infiltration en TILs plus importante. Le point intéressant est qu'ils ont également identifié une signature de Treg activés dans 80% des échantillons de ce groupe. Le groupe de Sorlie et Perou, ayant identifié les différents sous-types moléculaires de cancer du sein, ont intégré des données transcriptomiques et génomiques afin de déterminer des voies préférentiellement altérées et de les corrélérer au pronostic. Parmi ces voies, on retrouve celles liées à l'immunité T et à la signalisation de certaines interleukines. C'est le ratio des signatures Th1/Th2 qui prédit le mieux la survie entre ces différents groupes, soulignant l'importance de la nature de l'infiltrat lymphocytaire dans le pronostic. Ces signatures ne sont pas présentes dans le tissu mammaire normal mais bien au stade *in situ*. La signature Th2 est de moins bon pronostic dans les CCI, n'est pas visualisée dans les CCIS purs mais bien dans les mixtes ¹⁶⁶. Parmi ces différentes études, aucune corrélation n'a été réalisée entre les signatures observées dans les lésions *in situ* et le risque de récurrence ou de progression sous forme invasive.

L'ensemble de ces données suggère que la nature de l'infiltrat lymphocytaire des lésions *in situ* évolue en parallèle de la progression des CCIS purs vers les mixtes puis CCI, avec un contexte de plus en plus immunosuppresseur. Cette évolution semble différente selon les sous-types moléculaires. Cela pourrait expliquer la faible immunogénicité globale des cancers du sein invasifs et qu'elle serait potentiellement plus importante au stade *in situ*.

4.4.5. Objectif du travail et stratégie

Le principal objectif de notre travail sur l'étude de l'immunogénicité des cancers du sein précoces est de montrer que celle-ci est plus importante au stade *in situ* qu'invasif. Pour cela, il faut démontrer la présence dans les CCIS de lymphocytes T qui reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales. Nous avons suivi la stratégie utilisée par D. Schröder pour son analyse de 6 CCI, avec deux modifications notoires : d'une part éviter de dériver des clones stables de lymphocytes T à partir des TILs, d'autre part s'intéresser aussi aux Tregs (Figure 1.8).

A partir d'échantillons frais de CCIS purs et mixtes et de tissus mammaires normaux nous avons extraits les lymphocytes T que nous avons analysés par cytométrie de flux puis triés à 1 cellule par puits pour réaliser du RNAseq sur cellules individuelles. Les séquences TCR sont extraites de ces données et celles qui sont enrichies dans le tissu tumoral sont clonées dans un vecteur lentiviral pour transduire des cellules reportrices JURKAT NFAT-GFP. Nous avons testé la spécificité de ces TCR d'intérêt contre des antigènes tumoraux candidats prédits à partir du séquençage d'exome et d'ARN tumoral.

RESULTATS

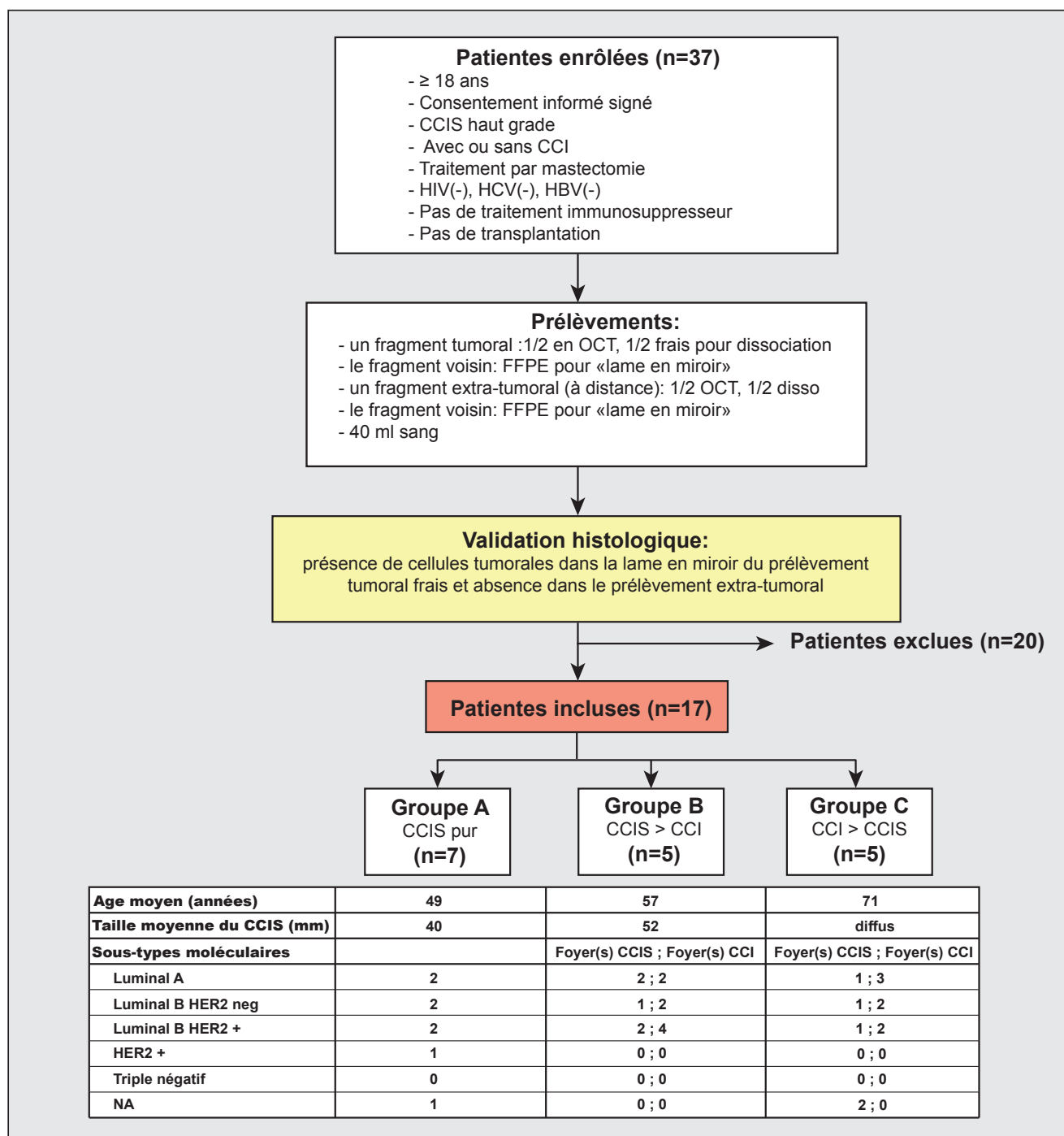


Figure 2.1. Algorithme de sélection des patientes et sous-types moléculaires des tumeurs.

Participation à l'étude de 37 patientes présentant une lésion de CCIS de haut grade traitées par mastectomie. Pour chaque patiente, collecte de 40 ml de sang et d'échantillons tumoral et extra-tumoral frais dont les moitiés sont congelées en OCT. Une lame FFPE dite «en miroir» des échantillons tissulaires frais est examinée pour confirmer la présence de cellules tumorales dans l'échantillon tumoral et leur absence dans l'échantillon extra-tumoral. Après cette validation histologique, 17 patientes ont été incluses et réparties en 3 groupes sur base de la proportion de la composante *in situ* de leur carcinome mammaire (A: CCIS pur, B: mixte à prédominance *in situ*, C: mixte à prédominance invasive).

1. Critères de sélection des patientes et description des prélèvements effectués

Pour cette étude nous avons recruté 37 patientes présentant un CCIS de haut grade pouvant être associé à du CCI et nécessitant un traitement par une chirurgie première de type mastectomie. Les critères d'inclusion et d'exclusion sont repris dans la Figure 2.1. Pour chaque patiente, en post-opératoire immédiat et avant toute fixation de la pièce opératoire au formol, nous avons collecté les échantillons suivants :

- 1) Un fragment tumoral frais dont la moitié est enrobé en OCT et congelé afin d'en extraire l'ADNg et l'ARN tumoral, l'autre moitié fraîche est utilisée pour en extraire les lymphocytes T.
- 2) Un fragment adjacent au premier est fixé et enrobé en paraffine (FFPE) afin de pouvoir réaliser une « lame en miroir » à partir de laquelle l'anatomopathologiste vérifie la présence de cellules tumorales. Cette validation histologique est cruciale car les lésions de CCIS sont difficilement repérables macroscopiquement. Ce fragment FFPE est également utilisé pour réaliser des marquages en immunohistochimie afin de déterminer le sous-type moléculaire de la lésion de CCIS et d'en caractériser l'infiltrat inflammatoire.
- 3) Un fragment extra-tumoral que nous définissons comme étant un fragment prélevé à distance de la tumeur et considéré comme normal, dont la moitié est enrobé et congelé en OCT, et l'autre moitié fraîche est utilisée pour en extraire les lymphocytes T.
- 4) Un fragment adjacent au précédent est fixé et enrobé en paraffine pour réaliser également une « lame en miroir » permettant de vérifier l'absence de cellules tumorales.
- 5) Quarante millilitres de sang sont collectés pour en extraire les PBMCs afin de comparer le phénotype des lymphocytes T sanguins et tissulaires ainsi que créer la lignée B-EBV autologue servant de cellules présentatrices de l'antigène dans nos tests de criblage.

2. Caractérisation des échantillons

Après validation histologique, nous avons inclus 17 patientes pour la suite des analyses. Nous avons réparti celles-ci en 3 groupes sur base de la proportion de la composante *in situ* de leur carcinome mammaire selon un continuum biologique : le groupe A comprend les patientes présentant un CCIS pur, le groupe B une lésion mixte dont la composante *in situ* est prédominante et le groupe C comprenant essentiellement du CCI. Comme groupe contrôle qualifié de tissu mammaire normal (confirmé en histologie), nous avons inclus 7 patientes ayant bénéficié d'une réduction mammaire à visée esthétique ou prophylactique (patientes porteuses

des mutations BRCA1/2) pour lesquelles nous avons collecté exactement les mêmes prélèvements (frais, OCT et FFPE) et ce pour les deux seins.

Un tableau comparatif des données clinico-pathologiques des patientes présentant une lésion de CCIS classées en fonction des 3 groupes décrits ci-dessus est repris dans la Figure 2.1. Premièrement, concernant l'âge moyen des patientes, il est intéressant de noter des différences de 10 ans entre le groupe A et B ainsi qu'entre le groupe B et C. Ceci peut être expliqué par l'augmentation des diagnostics de CCIS liée au dépistage systématique ciblant la population des femmes entre 50 et 69 ans.

Deuxièmement, concernant la répartition des différents foyers de CCIS et CCI selon les sous-types moléculaires, nous constatons l'absence de triple négatif aussi bien parmi les foyers CCIS que CCI. Le fait de ne pas retrouver de lésion triple négative dans les foyers de CCIS est le reflet de la faible prévalence de ce sous-type moléculaire au stade *in situ* témoignant du caractère agressif et rapidement progressif de celui-ci. L'absence de foyer CCI triple négatif est le résultat d'un biais de sélection de nos patientes car la prise en charge thérapeutique classique de ce sous-type moléculaire est une chimiothérapie première (néo-adjuvante) et non une chirurgie.

3. Présence de lymphocytes T essentiellement au pourtour des canaux galactophores envahis par du CCIS

Une observation fréquente abordée dans l'introduction soutenant notre hypothèse, est la présence, parfois importante, de TILs dans les lésions de CCIS essentiellement de haut grade. L'organisation de ces TILs et leur rapport aux cellules tumorales sont cependant différents par rapport à ce qui est observé dans les lésions de CCI.

Afin de caractériser l'infiltrat inflammatoire mononucléé au sein du stroma des lésions de CCIS et le rapport entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales, nous avons réalisé plusieurs marquages par immunohistochimie sur des coupes successives du fragment FFPE en miroir du prélèvement tumoral frais ayant servi à l'extraction des lymphocytes T (Figure 2.2). Nous avons réalisé les mêmes marquages pour les fragments FFPE de tissu mammaire extra-tumoral et normal (Figure 2.3).

Contrairement à ce qui est observé dans les lésions de CCI, les lymphocytes infiltrant les lésions CCIS, plus particulièrement les lymphocytes T CD8, sont situés principalement autour des canaux tumoraux. Le terme 'tumor-infiltrating lymphocytes' ou TILs n'est probablement pas le plus approprié pour décrire cet infiltrat inflammatoire mais étant un terme largement utilisé dans la littérature, nous garderons celui-ci dans la suite du manuscrit. Notons également que ces amas de lymphocytes T ne sont pas répartis de manière homogène autour des canaux tumoraux mais semble plutôt se regrouper à certains endroits particuliers. Est-ce que ceci serait le signe d'une réaction lymphocytaire T spécifique des cellules tumorales suite à une micro-invasion de celles-ci dans le stroma ?

Il est également important de remarquer que l'on trouve de rares lymphocytes T, CD4 ou CD8, dans les canaux au contact des cellules tumorales. Cependant, comme illustré dans la Figure 2.3, nous observons également ceux-ci dans les canaux galactophores au sein du tissu mammaire normal, au contact des cellules épithéliales.

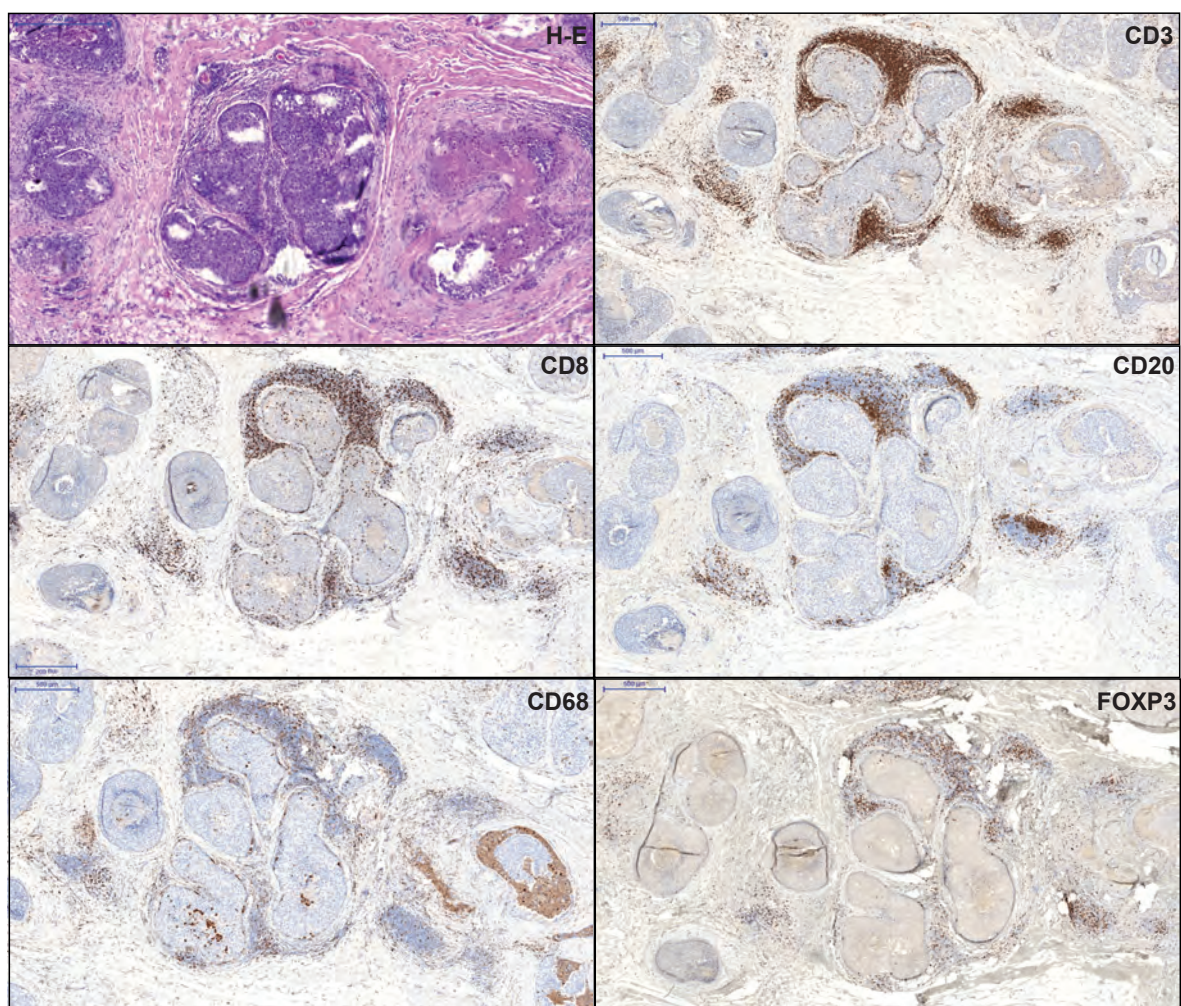


Figure 2.2. Localisation des cellules immunitaires dans une lésion de CCIS.

Images histologiques illustrant les différents marquages réalisés par immunohistochimie sur le fragment FFPE en miroir du prélèvement tumoral (exemple d'une lésion CCIS de la patiente FETU dans le groupe B). Caractérisation de l'infiltrat inflammatoire mononucléé observé sur la lame en miroir colorée en HE par un marquage CD3 pour les lymphocytes T, CD8 pour les lymphocytes T cytotoxiques, CD20 pour les lymphocytes B, CD68 pour les macrophages et FOXP3 pour les lymphocytes T régulateurs. La barre représente 500 µm.

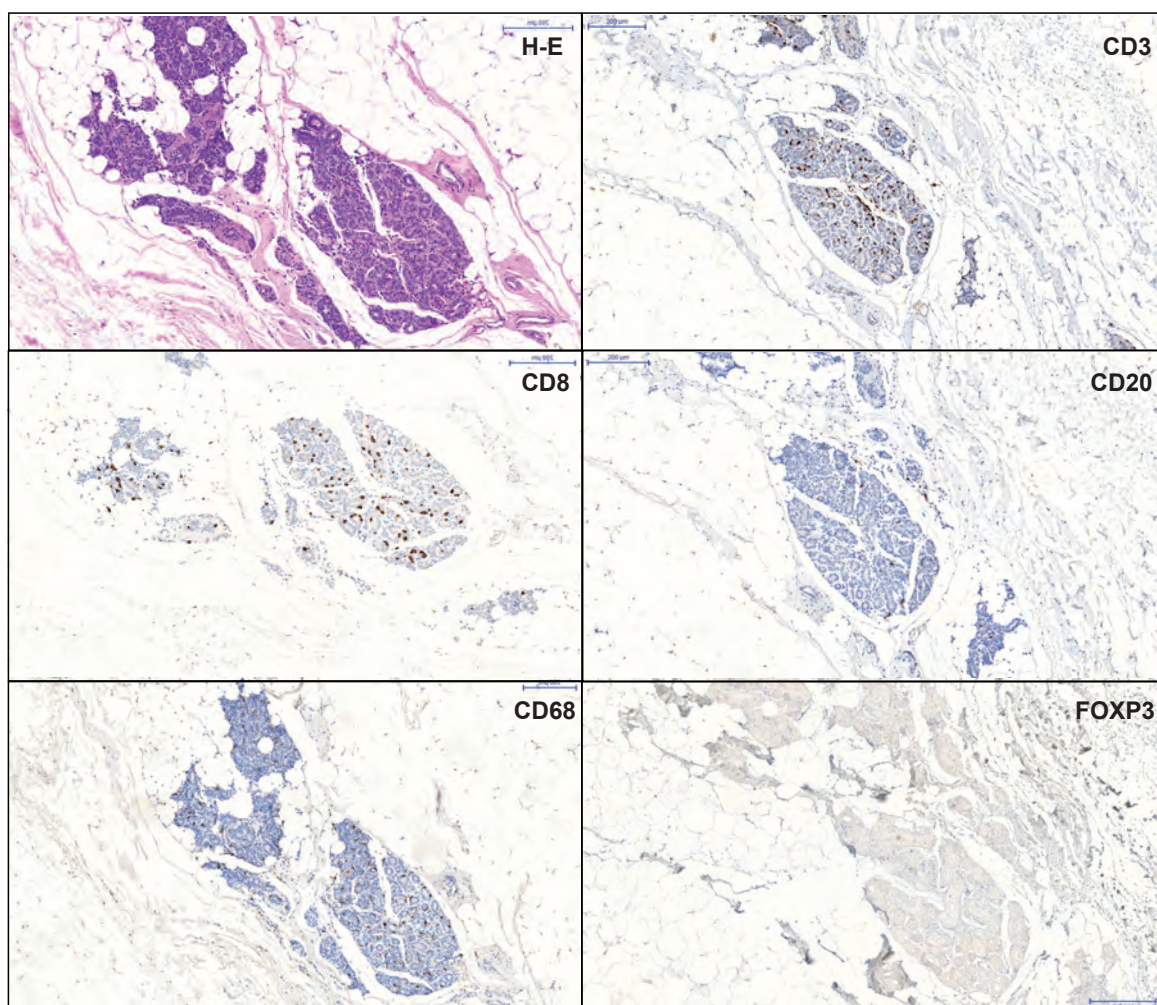


Figure 2.3. Localisation des cellules immunitaires dans le tissu extra-tumoral de cette lésion.
 Images histologiques illustrant les différents marquages réalisés par immunohistochimie sur le fragment FFPE en miroir du prélèvement de tissu extra-tumoral de cette même patiente. La barre représente 200 µm.

Avec l'aide du Dr. Mieke Van Bockstal (anatomopathologiste spécialiste des pathologies mammaires aux CUSL), nous avons estimé les proportions de lymphocytes T totaux, lymphocytes T CD8, lymphocytes B, Tregs et macrophages présents dans l'ensemble des prélèvements tumoraux et extra-tumoraux des 17 patientes présentant une lésion de CCIS ainsi que pour les prélèvements de tissu mammaire normal des 7 patientes contrôles. Nous voulions comparer ces populations cellulaires entre tissus tumoraux et non-tumoraux (extra-tumoraux et normaux) ainsi qu'entre lésions de CCIS pur (groupe A des patientes) et mixtes CCIS-CCI (groupe B et C). Pour cela, nous avons marqué des coupes sériées FFPE de 4 µm avec un anticorps anti-CD3 (lymphocytes T), anti-CD8 (lymphocytes T CD8), anti-CD20 (lymphocytes B), anti-CD68 (macrophages) et anti-FOXP3 (Tregs). Le pourcentage de chaque type cellulaire est évalué manuellement en parcourant d'abord l'ensemble de la coupe à faible grossissement (40x) pour repérer le ou les foyers tumoraux (CCIS ou CCI). Ensuite, à plus gros grossissement (100x), le champ étant centré sur un foyer à la fois, nous avons estimé la proportion de cellules positives pour le marquage en question par rapport à l'ensemble des cellules du stroma proche de la lésion. Le pourcentage final correspond à la moyenne des pourcentages des différents champs analysés. Pour le marquage CD3, en cas de lésion mixte, nous avons également décrit le pourcentage séparément pour les foyers de CCIS et CCI. Le résultat est exprimé sur une échelle allant de moins de 1%, puis progressant par paliers de 1% jusqu'à 5% et ensuite par paliers de 5%.

Toutes les populations de cellules immunitaires étudiées sont plus importantes dans les tissus tumoraux que dans les tissus extra-tumoraux et normaux (Figure 2.4).

Si on compare les CCIS pur et mixtes CCIS-CCI, seuls les macrophages sont significativement ($P < 0.05$) majorés dans les lésions mixtes (Figure 2.5). Nous n'observons pas non plus de différence significative d'infiltration par les lymphocytes T entre les foyers de CCIS et les foyers de CCI analysés séparément en cas de lésion mixte (Figure 2.5). L'intérêt de cette analyse de l'infiltrat inflammatoire par immunohistochimie réside essentiellement dans la description de l'organisation de celui-ci par rapport aux cellules tumorales. Celle-ci se compose d'amas de lymphocytes T comprenant des lymphocytes T CD8 se localisant au pourtour des canaux tumoraux et à certains endroits uniquement. Ces lymphocytes T sont parfois associés à des lymphocytes B formant dans certains cas des structures lymphoïdes tertiaires pouvant être le signe d'une réponse inflammatoire chronique. Nous n'observons jamais cela dans les tissus mammaires non tumoraux (extra-tumoraux ou normaux) qui sont très peu infiltrés par l'ensemble des cellules immunitaires. Il est possible que ces infiltrats lymphocytaires contiennent des lymphocytes anti-tumoraux.

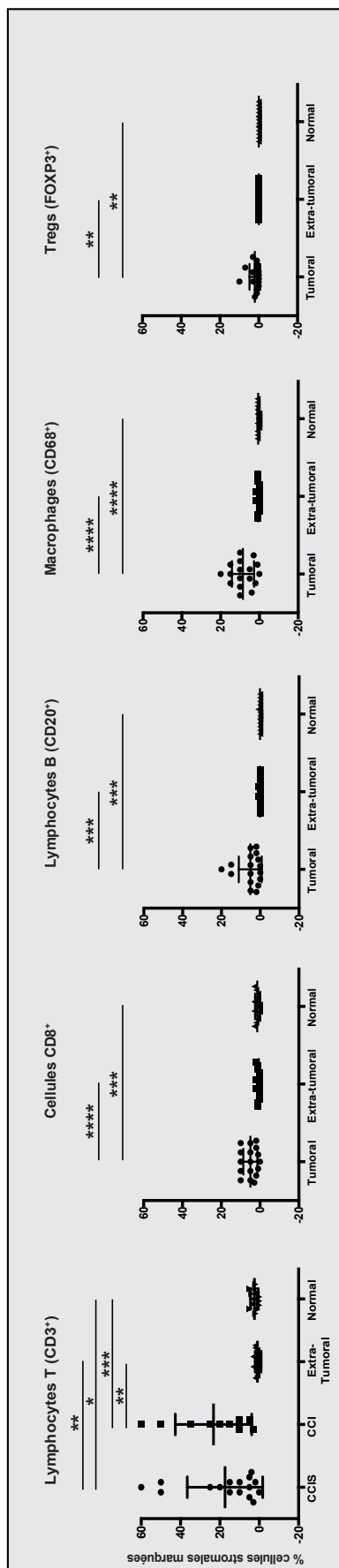


Figure 2.4. Proportion des populations de cellules immunitaires en fonction du type du tissu mammaire.

Chaque point représente un échantillon tissulaire et est classé selon son type (tumoral, extra-tumoral, normal). Moyennes et écart-types du pourcentage de cellules positives pour les marqueurs en immunohistochimie CD3, CD8, CD20, CD68, FOXP3 par rapport au nombre de cellules totales du stroma. Pour l'estimation de la proportion de lymphocytes T (CD3), en cas de lésions mixtes CCIS-CCI, les foyers CCIS et CCI d'une même patiente ont été analysés et représentés séparément.

Analyse statistique par un test ANOVA à un critère: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

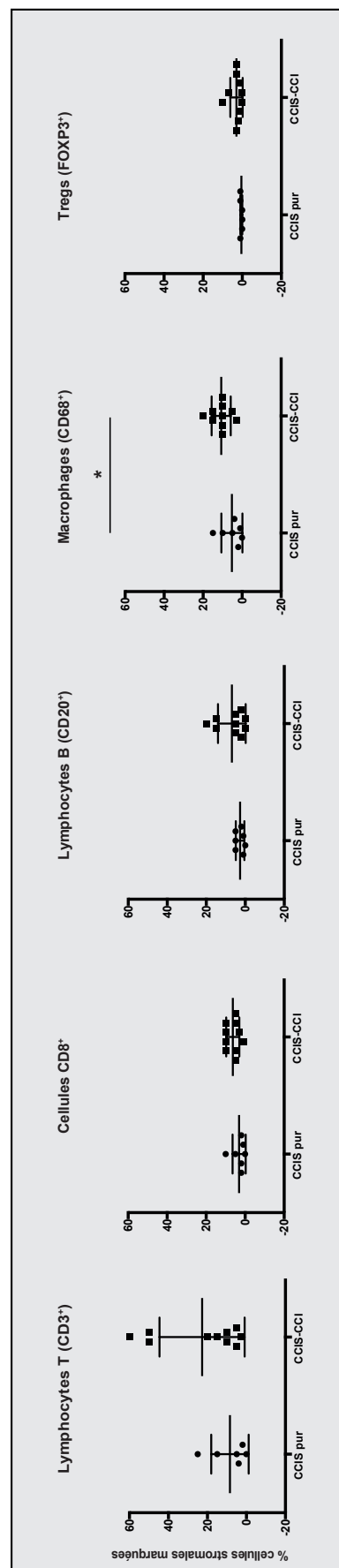


Figure 2.5. Comparaison de la proportion des populations de cellules immunitaires entre lésions de CCIS purs et mixtes CCIS-CCI.

Chaque point représente un échantillon tumoral et est classé selon que la lésion soit du CCIS pur ou mixte (CCIS-CCI). Moyennes et écart-types du pourcentage de cellules positives pour les marqueurs en immunohistochimie CD3, CD8, CD20, CD68, FOXP3 dans la zone de CCIS par rapport au nombre de cellules totales du stroma.

Analyse statistique par un test t non apparié: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

4. Lymphocytes T extraits des tissus tumoraux : marqueurs d'activation

Dans l'hypothèse où certains lymphocytes T extraits des prélèvements tumoraux reconnaissent des antigènes de tumeurs, ils devraient porter des marqueurs d'activation. Nous avons exploré cette question, comme montré dans la Figure 2.6. Nous avons marqué les cellules extraites des différents prélèvements avec un panel d'anticorps puis les avons analysées et triées par cytométrie de flux. Pour chaque patiente nous avons analysé dans la même expérience les cellules extraites des prélèvements tumoraux et extra-tumoraux ainsi que les PBMCs autologues. Pour les échantillons de tissus, les cellules ont été extraites mécaniquement sans utiliser d'enzymes afin d'éviter la perte de certains antigènes de surface et sans incubation à 37°C qui peut modifier le transcriptome. Nous avons réalisé les mêmes analyses avec des prélèvements de tissus mammaires et de sang obtenus lors de réductions mammaires à visée esthétique ou prophylactique (échantillons « normaux »). Comme contrôles, nous avons utilisé des PBMCs allogéniques, provenant de patients hémochromatosiques, dont une partie dite « au repos » est analysée telle quelle et l'autre partie dite « activée » est stimulée pendant 24h avec un anticorps anti-CD3 (OKT3) insolubilisé.

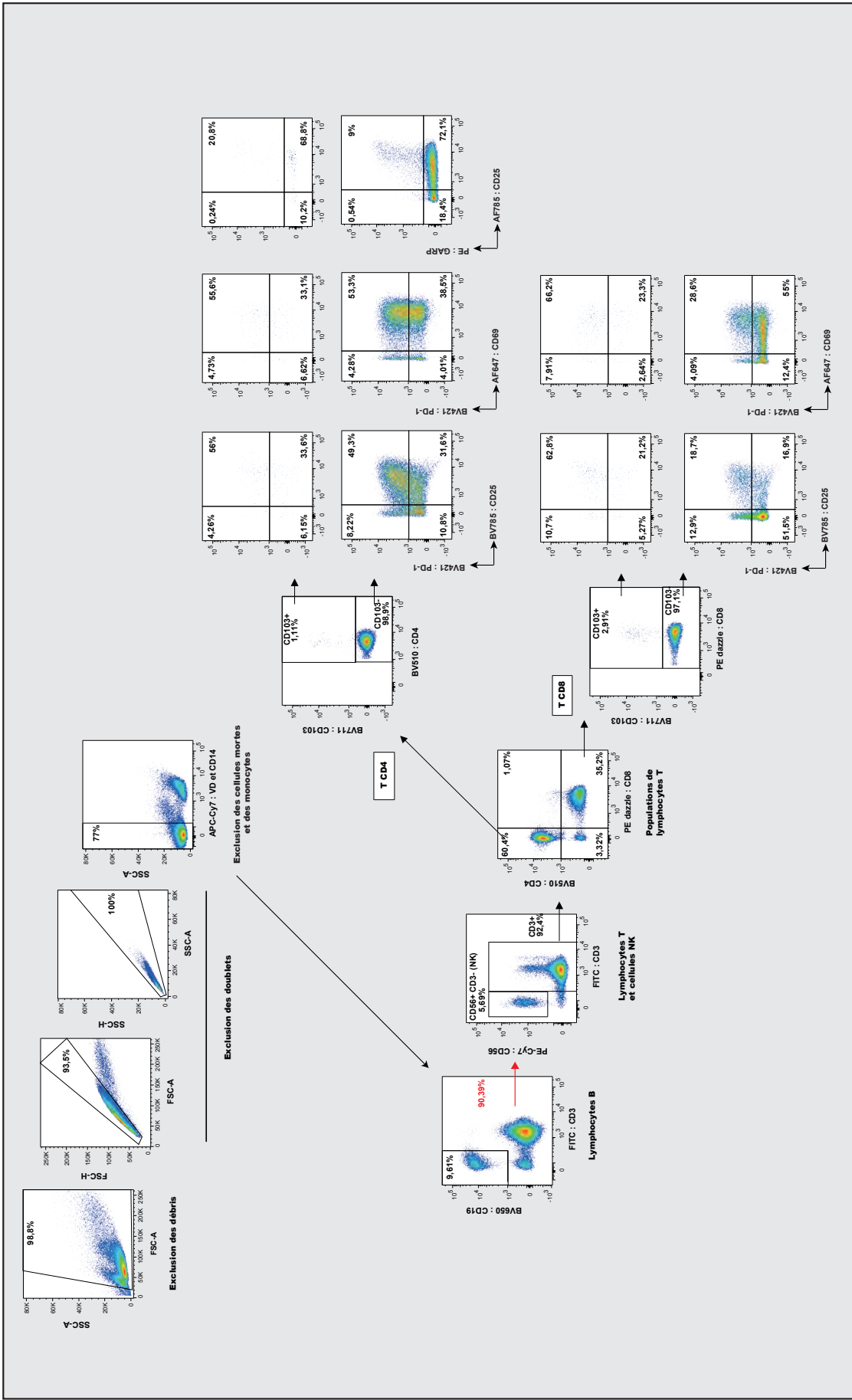


Figure 2.6. Stratégie d'analyse par cytométrie de flux des populations de cellules immunitaires présentes dans les différents prélèvements.
 Exemple d'analyse réalisée sur des PBMCs allogéniques restimulés in vitro. Chaque marqueur est indiqué avec le fluorochrome auquel il est associé. La première partie de l'analyse exclut les débris cellulaires, les doublets, les cellules mortes et les monocytes (même canal de lecture). La seconde partie détermine les proportions de lymphocytes B et T ainsi que les sous-populations de lymphocytes T CD4 et CD8. La dernière partie montre les marqueurs d'activation PD-1, CD69, CD25 et GARP pour les lymphocytes T CD4, et de résidence tissulaire (CD103).

La Figure 2.7 montre la quantification des populations de lymphocytes T totaux, CD4, CD8 et B en fonction de l'origine tissulaire (tumorale, extra-tumorale et normale), ou de type de tumeur (CCIS pur ou mixte). Cette analyse confirme que les tissus tumoraux sont plus infiltrés par des lymphocytes T CD4 et CD8 que les tissus extra-tumoraux et normaux. Notons que le ratio CD4/CD8 est nettement en faveur des CD4 dans les tissus tumoraux alors que c'est l'inverse dans les tissus mammaires normaux (non montré). C'est aussi ce qui avait été observé dans d'autres études des TILs dans des carcinomes canaux infiltrants^{28,42,167} et une étude sur les CCIS¹⁵². Concernant la population de lymphocytes B, celle-ci tend à être également plus importante dans les tissus tumoraux mais cette différence n'est pas significative. Si nous comparons CCIS purs et mixtes, nous nous apercevons que lorsqu'il y a un foyer invasif, il y a plus de lymphocytes T CD4 et CD8. Pour les lymphocytes B, la différence reste non significative.

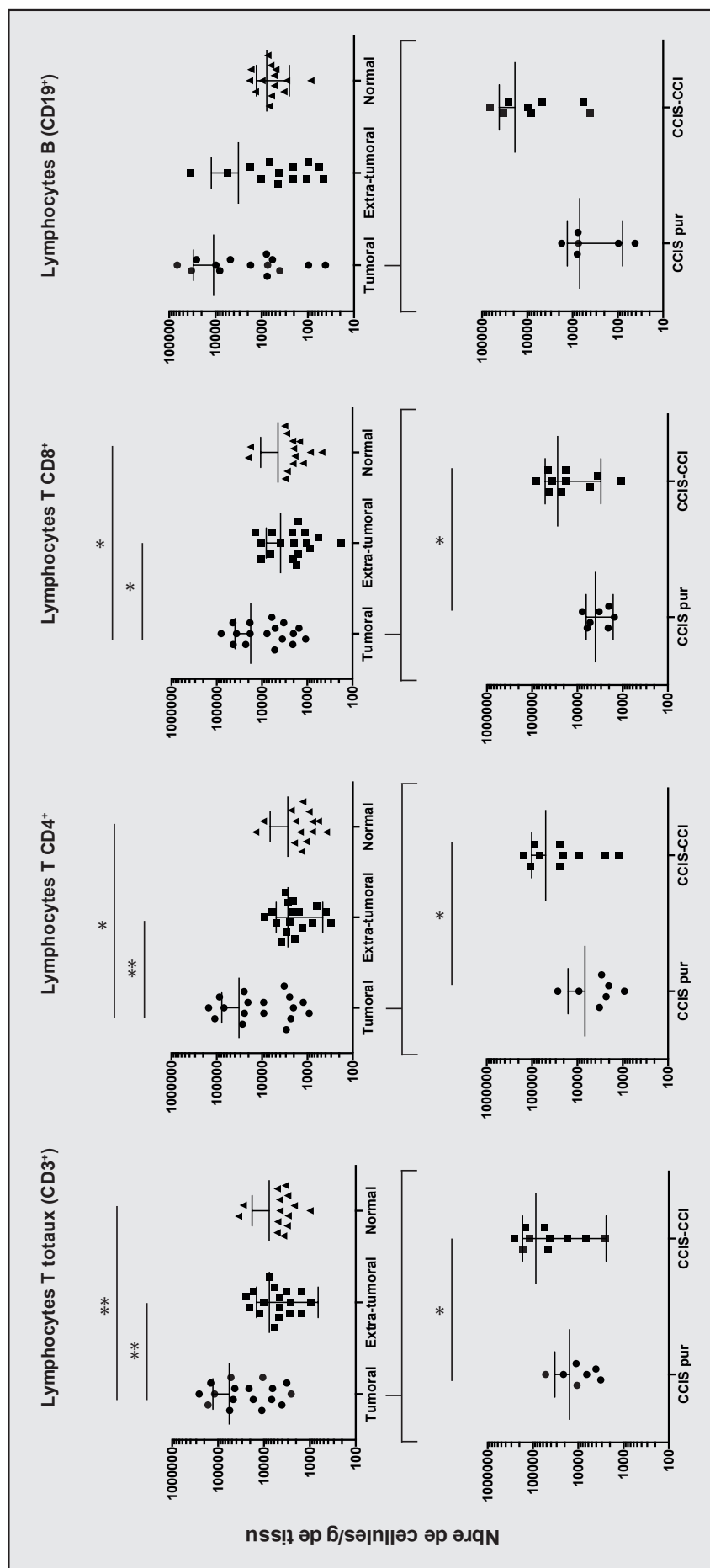


Figure 2.7. Quantité de lymphocytes T totaux, T CD4, T CD8 et B extraits des différents prélèvements.

Chaque point représente un échantillon de tissu mammaire dont les lymphocytes ont été extraits et analysés par cytométrie de flux. Moyennes et écarts-types du nombre de cellules CD3+ (Lymphocytes T) T CD4+, T CD8+ et de CD19+ (lymphocytes B) par gramme de tissu dissocié.

Les graphiques supérieurs montrent les résultats concernant ces différentes populations en fonction du type de prélèvements (tumoraux, extra-tumoraux ou normaux).

Analyse statistique par un test ANOVA à un critère: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Les graphiques inférieurs comparent les résultats obtenus des ces mêmes populations entre lésions de CCIS pur et mixtes CCIS-CCI. Analyse statistique par un test t non apparié: * $P < 0.05$.

Nous nous sommes ensuite focalisés sur l'expression de marqueurs d'activation par les lymphocytes T CD8, cellules effectrices principales de la réponse anti-tumorale par leur capacité à reconnaître spécifiquement les antigènes tumoraux et à tuer les cellules tumorales qui les portent.

CD69 est considéré comme un marqueur d'activation précoce : au niveau transcriptionnel, il apparaît 30 à 60 min après l'activation et décline rapidement après 4 à 6h tandis que la protéine est détectable 2 à 3h après la stimulation. Cependant son expression n'est pas spécifique de l'engagement du TCR car c'est aussi un marqueur de rétention tissulaire par son rôle antagoniste de la sphingosine-1 phosphate limitant la sortie des tissus ou des organes lymphoïdes ^{168,169}. La Figure 2.8 montre que la majorité des lymphocytes T CD8 et CD4 extraits des différents prélèvements (tumoraux, extra-tumoraux et normaux) expriment CD69 sans différence significative entre les tissus ou entre CCIS purs ou mixtes CCIS-CCI. CD25 est la sous unité α du récepteur à l'IL-2, cytokine essentielle pour la prolifération des lymphocytes T ¹⁷⁰. Son expression sur les lymphocytes T activés dépend de la voie de signalisation du TCR suite à l'engagement de celui-ci. CD25 est également un marqueur de Tregs qui l'expriment de manière constitutive et élevée ¹⁷¹. Dans les tissus tumoraux, CD25 est exprimé par une beaucoup plus grande proportion de lymphocytes T CD4⁺ que CD8⁺ (Figure 2.8). Dans les tissus extra-tumoraux et normaux, cette différence n'est pas significative. Ces lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ peuvent être des Tregs. La proportion des lymphocytes T CD4⁺ qui expriment CD25 est significativement plus élevée dans les tissus tumoraux avec un foyer invasif que dans les CCIS purs ainsi que dans les tissus non tumoraux. Globalement les proportions de lymphocytes T CD8⁺ qui portent CD25 est très faible : <1%.

PD-1 apparaît plus tardivement, environ 24h après l'activation du TCR pour être maximale à 72h ¹⁷². C'est un co-récepteur inhibiteur des lymphocytes T jouant un rôle de frein physiologique de cette activation. C'est ce mécanisme qui est ciblé par les anticorps immunomodulateurs inhibant la voie PD-1, utilisés en oncologie. PD-1 peut persister à la surface de lymphocytes T activés chroniquement et devenus peu fonctionnels, on les considère souvent comme « épuisés ». Il n'est pas possible de distinguer lymphocytes T activés et lymphocytes T épuisés sur la seule base de l'expression de PD-1 ¹⁷³. Comme pour CD69, la majorité des lymphocytes T CD4 et CD8 extraits des différents prélèvements expriment PD-1 (Figure 2.8). La seule différence significative entre CD4⁺ et CD8⁺ s'observe dans les CCIS purs avec plus de T CD8 PD-1⁺.

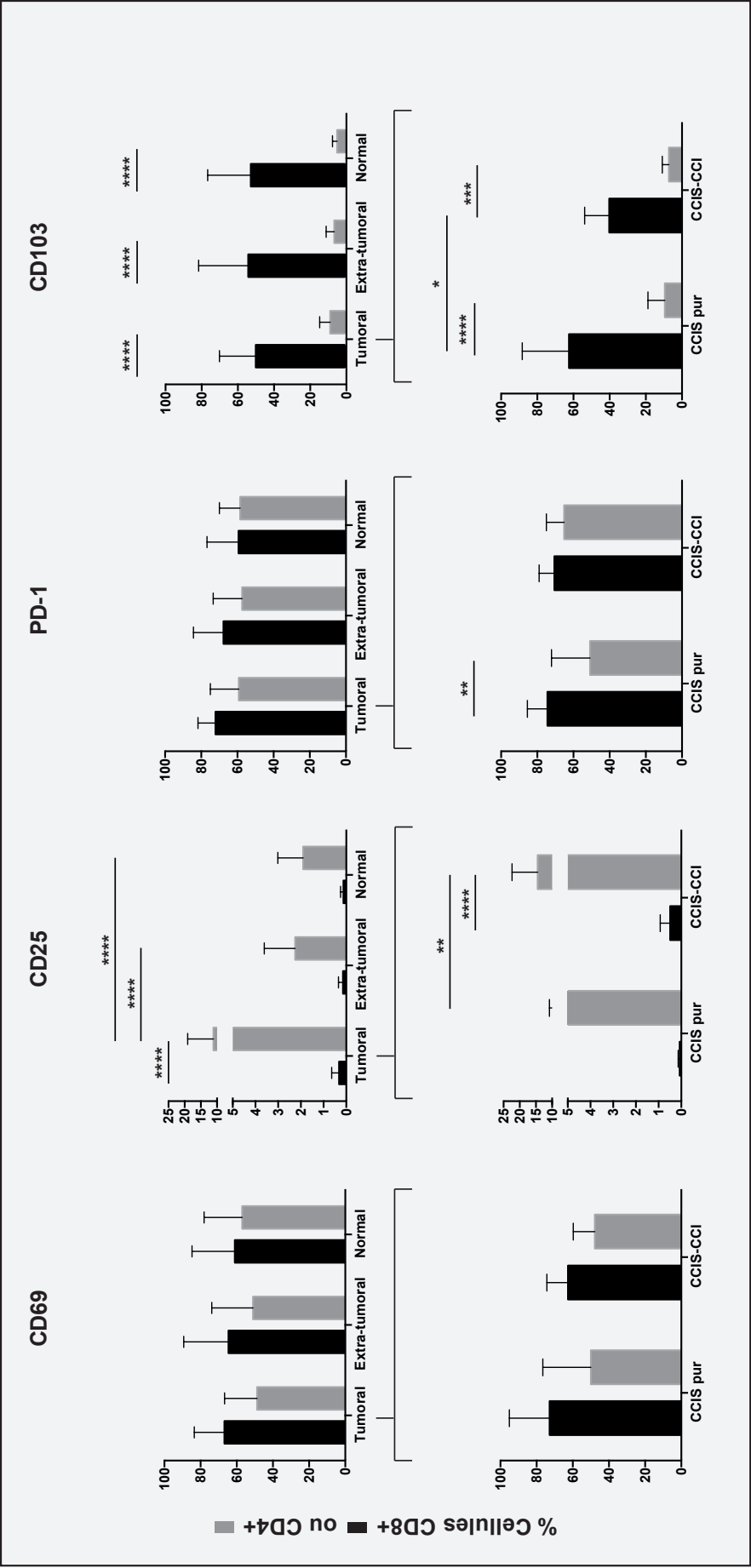


Figure 2.8. Proportions de lymphocytes T CD4 et CD8 exprimant les marqueurs d'activation et de résidence tissulaire. Moyennes et écarts-types du pourcentage de lymphocytes T CD8 (noir) et CD4 (gris) exprimant CD69, CD25, PD-1 et CD103. Les graphiques supérieurs montrent les résultats en fonction du type de prélèvements (tumeurs, extra-tumoraux ou normaux). Les graphiques inférieurs comparent les résultats entre lésions de CCIS pur et mixtes CCIS-CCI parmi les tissus tumoraux. Analyse statistique par un test ANOVA à deux critères: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

En plus des marqueurs d'activation, nous avons étudié l'expression de CD103, un marqueur des lymphocytes T résidents des tissus (TRM pour « resident memory T cells »). CD103 est la sous-unité α de l'intégrine $\alpha E/\beta 7$ dont le ligand est l'E-cadhérine exprimée par les cellules épithéliales, ce qui permettrait l'ancrage des lymphocytes T dans les tissus. C'est plus souvent la co-expression de CD103 et CD69 et/ou PD-1 qui définit cette sous-population de lymphocytes T bien que cela varie d'un tissu à l'autre et qu'il existe des populations de TRM CD103⁻ ou CD69⁻. L'expression de CD103 est induite par l'activation du TCR en présence de TGF- β ^{174,175}. Il a été montré que les TILs CD8⁺CD103⁺ ont de meilleures capacités à tuer les cellules tumorales que les CD8⁺CD103⁻, soit par une meilleure stabilisation de la synapse immunologique avec la cellule cible soit en aidant à la polarisation des granules cytotolytiques ¹⁶⁹. Dans le cancer du sein, plus particulièrement dans le sous-type moléculaire triple négatif au stade précoce, la signature transcriptomique des TRM CD8⁺CD103⁺ est associée à un meilleur pronostic : diminution du risque de rechute et meilleure survie globale ¹⁷⁶. Dans l'étude KEYNOTE-086, l'enrichissement de cette signature CD8⁺ TRM est un marqueur prédictif de la réponse au Pembrolizumab chez les patientes avec un cancer du sein triple négatif métastatique ¹⁷⁴. La Figure 2.8 montre ces lymphocytes T CD8⁺CD103⁺ en proportions plus importantes dans les lésions de CCIS purs que dans les lésions mixtes. Notons également que dans tous les tissus que nous avons analysés, CD103 est présent nettement plus souvent sur les CD8⁺ que sur les CD4⁺. C'était aussi le cas dans les tumeurs invasives analysées dans la littérature ¹⁷⁶.

Si les lymphocytes T résidents du sein contiennent les lymphocytes anti-tumoraux que nous voudrions trier, ces derniers devraient donc être CD8⁺CD103⁺ et porter un marqueur d'activation s'ils sont dans la tumeur mais pas s'ils sont dans du tissu extra-tumoral et a fortiori normal. Nous avons donc comparé les expressions de CD25, CD69 et PD-1 sur les lymphocytes T CD8⁺CD103⁺ tumoraux ou non (Figure 2.9). Comme environ 90% des lymphocytes T CD8⁺CD103⁺ expriment le marqueur CD69 aussi bien dans les tissus tumoraux qu'extra-tumoraux et normaux, et qu'il est également considéré comme un marqueur de rétention tissulaire, nous avons qualifié la population de T CD8⁺ CD103⁺ CD69⁺ de CD8 TRM. Il semble que cette population soit plus importante dans les lésions de CCIS purs.

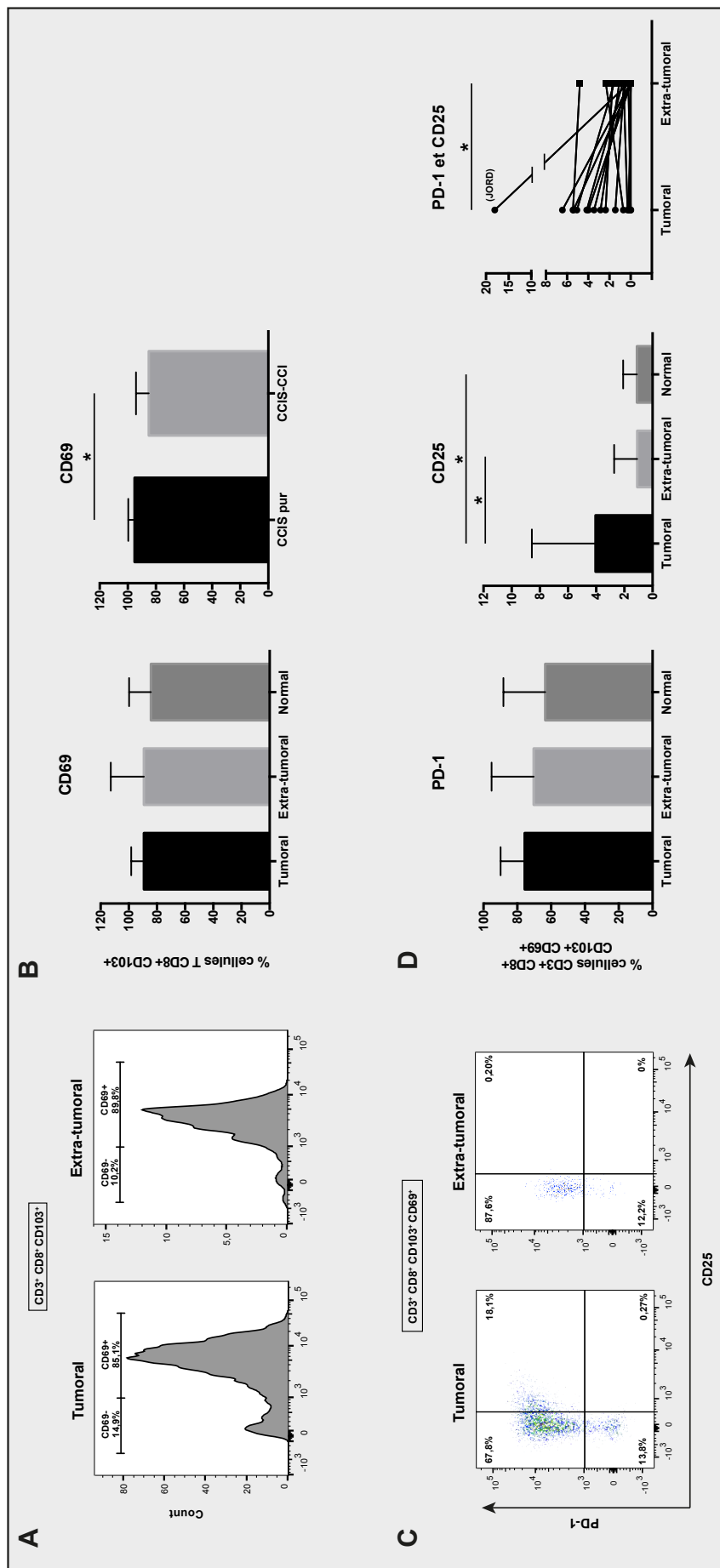


Figure 2.9. Analyse de l'expression des marqueurs d'activation par la population de T CD8 résidents des tissus (Tissue-resident memory, TRM).

A. Proportion des cellules CD103⁺CD69⁺ parmi les CD3⁺CD8⁺ tumoraux et extra-tumoraux pour une patiente (JORD).

B. Proportion de lymphocytes CD8 TRM en fonction du type de prélèvement et de lésion tumorale.

C. Marqueurs d'activation CD25 et PD-1 sur les CD8 TRM (CD103⁺CD69⁺) dans les prélèvements tumoral et extra-tumoral d'une patiente (JORD).

D. Proportion de lymphocytes CD8 TRM PD-1⁺, CD25⁺, PD-1⁺ et CD25⁺ en fonction du type de prélèvement. Pour l'analyse de la population CD8 TRM PD-1⁺ et CD25⁺, appariement des prélèvements tumoraux et extra-tumoraux de chaque patiente.

Analyse statistique des moyennes et écarts-types par un test ANOVA à deux critères ou test t non apparié selon la situation: * $P < 0.05$.

Nous avons ensuite analysé l'expression de PD-1 et CD25 par cette population. Les résultats montrent que PD-1 se retrouve sur la majorité des CD8 TRM mais aussi bien dans la tumeur que dans les tissus non tumoraux. Par contre, CD25 se trouve sur une petite proportion de CD8 TRM tumoraux alors qu'il est quasi absent sur ceux dans les tissus non tumoraux. Cependant, il n'y a pas de différence entre CCIS purs et mixtes (résultats non montrés). Si on s'intéresse à la co-expression de PD-1 et CD25 par cette population, à nouveau, celle-ci est plus fréquente parmi les CD8 TRM provenant des tissus tumoraux comparée aux tissus extra-tumoraux des mêmes patientes.

Nous faisons l'hypothèse que cette population de CD8 TRM PD-1⁺ et CD25⁺ contient les lymphocytes T CD8 spécifiques des cellules tumorales. Pour le confirmer, il faut les récupérer et les tester vis-à-vis de potentiels antigènes tumoraux. C'est ce que nous avons fait grâce à la technique de single cell RNAseq qui nous a permis d'identifier la séquence complète des TCR d'intérêt afin de les reconstruire et de les faire exprimer par des cellules reporthées.

Concernant les lymphocytes T CD4, nous avons analysé un marqueur d'activation spécifique des Tregs : la protéine GARP (Glycoprotein A repetitions predominant) ou LRRC32. GARP est une protéine transmembranaire qui participe à l'activation du TGF- β produit par les Tregs. Le TGF- β inhibe de manière paracrine la prolifération et la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T effecteurs. La voie GARP-TGF- β joue un rôle important pour la fonction immunosuppressive des Tregs¹⁷⁷. Au contraire de CD25, qui est présent sur les Treg activés ou non, GARP n'est présent qu'après activation par le TCR. De plus, GARP n'est pas présent sur les T conventionnels (non Tregs) activés. La présence de Tregs (cellules CD3⁺CD4⁺CD127⁻CD25⁺FOXP3⁺) a déjà été observée dans des lésions de CCI et en proportion plus importante que parmi les lymphocytes T extraits du parenchyme mammaire normal²⁸. Plusieurs études ont mis en évidence que la présence de Tregs était un facteur de mauvais pronostic dans différents cancers dont le cancer du sein⁶¹. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux Tregs activés et non pas aux Tregs de manière générale car il aurait fallu pour cela faire un marquage FOXP3 qui est un marquage intracellulaire nous empêchant par la suite de récupérer les cellules vivantes. La Figure 2.10 montre que la population de Tregs activés (cellules CD3⁺CD4⁺CD25⁺GARP⁺) s'observe uniquement dans les tissus tumoraux et plutôt dans les lésions mixtes CCIS-CCI.

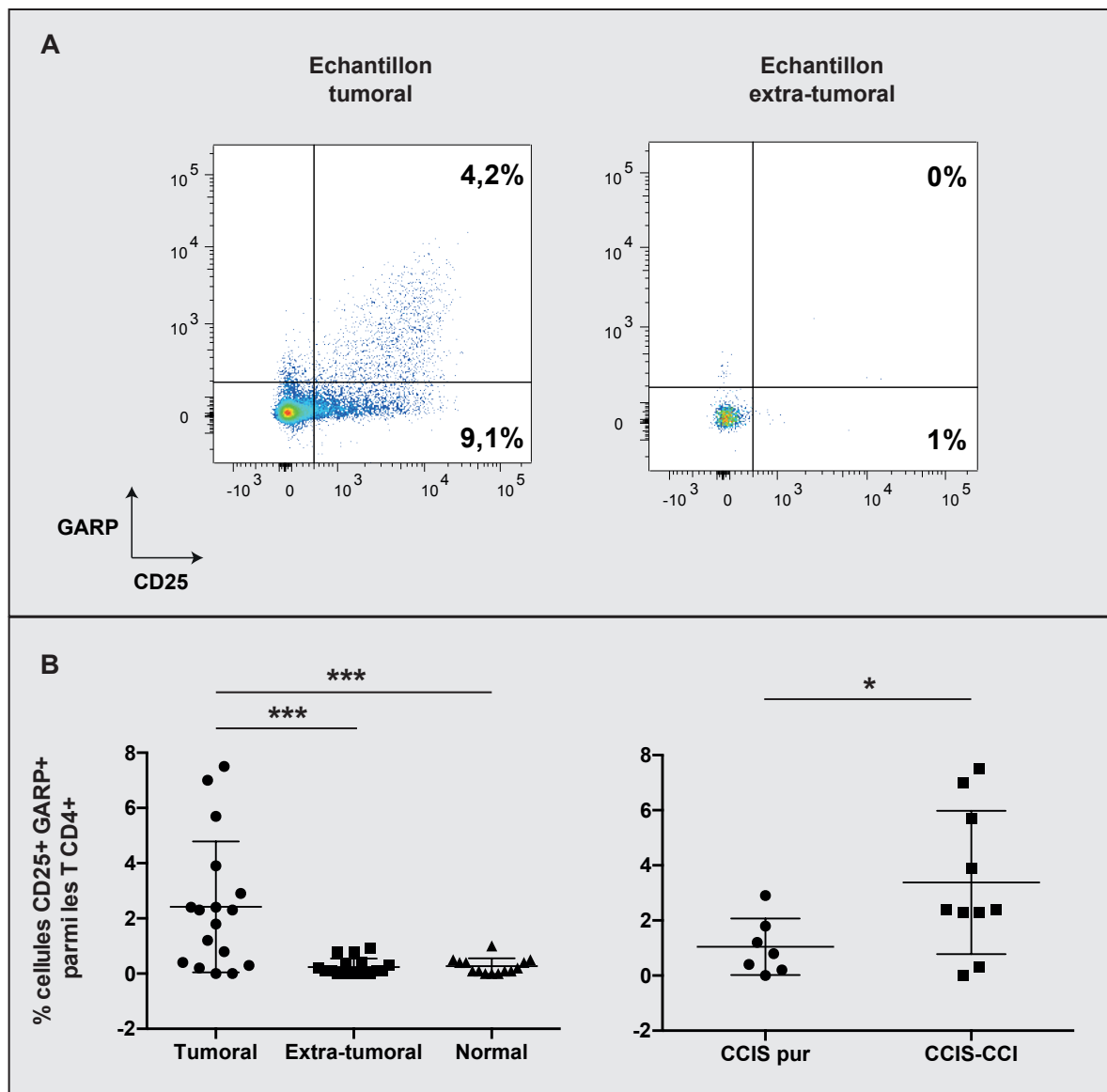


Figure 2.10. Mise en évidence de Tregs actifs dans les prélèvements tumoraux.

A. Représentation de l'analyse par cytométrie de flux des populations de lymphocytes T CD4 régulateurs (marqueurs CD25 et GARP), extraits des échantillons tumoraux et extra-tumoraux de la patiente JORD.

B. Chaque point représente un échantillon tissulaire classé selon le type de prélèvement (à gauche: tumoral, extra-tumoral, normal) ou selon le type de lésion tumorale (à droite: CCIS pur vs mixte CCIS-CCI). Moyennes et écarts-types du pourcentage de cellules CD25+GARP+ (population de Tregs actifs) parmi les T CD4+. Analyses statistiques par test ANOVA unidirectionnel (gauche) et test t non apparié (droite) : * $P < 0.05$. ; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

A notre connaissance, c'est la première fois que cette population est mise en évidence dans le cancer du sein au stade *in situ*. Jusqu'à présent, il existe très peu de données dans la littérature mentionnant que les Tregs présents parmi les TILs reconnaissent spécifiquement des antigènes tumoraux, et a fortiori, personne ne sait si c'est déjà le cas au stade très précoce du cancer du sein ¹⁷⁸. Pour pouvoir répondre à cette question, nous avons également trié les Tregs activés (CD3⁺CD4⁺CD25⁺GARP⁺) à une cellule par puits afin de reconstruire leurs TCR et tester leur spécificité envers des potentiels antigènes tumoraux.

5. Lymphocytes T anti-tumoraux candidats : sélection des clonotypes répétés et enrichis dans les prélèvements tumoraux

Précédemment dans le laboratoire, David Schröder a étudié la spécificité de lymphocytes T CD8 infiltrant des carcinomes primaires invasifs du sein. Sur 6 tumeurs analysées, il a mis en évidence des lymphocytes T spécifiques des cellules tumorales dans une seule. Une des limites techniques de son travail concernait le clonage des TILs et leur amplification en culture. L'efficacité du clonage était de l'ordre de 10%. Il se peut donc qu'il n'ait pas pu identifier certains clones anti-tumoraux car ceux-ci n'arrivaient plus à proliférer *in vitro*. Pour éviter ce biais de sélection, Orian Bricard, un autre doctorant travaillant dans notre laboratoire, a mis au point une technique permettant de séquencer le transcriptome d'une seule cellule (single cell RNAseq selon le protocole SmartSeq2) tout en permettant également l'identification du *TRA* et du *TRB* du TCR. Suite à cette identification, nous pouvons reconstruire le TCR dans un vecteur lentiviral afin de le faire exprimer par une lignée de cellules reportrices, plus facilement manipulable *in vitro* qu'un clone CTL, pour des tests de criblage d'antigènes tumoraux candidats. Ces données de séquençage et l'identification du *TRB* nous ont servi à établir le répertoire *TRB* d'un petit nombre de lymphocytes T triés à partir des échantillons tumoraux et extra-tumoraux. Sur base de ces résultats nous avons sélectionné des clonotypes candidats pour la reconstruction TCR. Un clonotype est défini par une séquence nucléotidique unique couvrant la région CDR3 de la chaîne β du TCR.

La Table 2.1 reprend pour les patientes pour lesquelles nous avons assez de cellules pour réaliser le tri (14 patientes sur 17), les informations sur le nombre de T triés, le nombre de *TRB* identifiés, le nombre de clonotypes différents, l'index de répétition, la fréquence du clonotype le plus représenté, la fréquence cumulée des dix clonotypes les plus représentés ainsi que le nombre de clonotypes dont nous avons décidé de reconstruire le TCR.

Table 2.1. Données de répertoire TCRβ des lymphocytes T extraits des tissus tumoraux et extra-tumoraux pour chaque patiente

Type de lésion tumorale		Groupe A										Groupe B						Groupe C												
Code Patient		LOKI	OJEC	ORBI	RAFI	RUBI	ULDA	DALA	FETU	JORD	KOBE	KVLO	ELID	NOTT*	RIND															
Origine tissulaire		T ET	T ET	T ET	T ET	T ET	T ET	T ET	T ET	T ET	T ET	T ET	T ET	T ET	T ET															
Tri	Nbre CD3+ (CD4+ ou CD8+)	0	384	384	0	0	320	384	384	382	132	0	0	0	0	0	384	384	0	0	0	0	0	0	0	0				
	Nbre CD3+ CD8+	96	96	0	0	96	48	96	0	0	0	0	96	96	96	32	96	96	96	96	96	96	0	0	192	96	96	96		
	Nbre CD3+ CD4+	96	96	0	0	96	48	96	0	0	0	0	96	96	96	96	32	96	96	96	96	96	0	0	192	96	91	96		
	Nbre CD3+CD4+CD25+GARP+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	96	0	72	0	96	0	192	0	0	0	0	48	0	0	0		
Clonotypes CD8																														
	Nbre TRB identifiés					69	29	80	205	213	235		62	82	79	88	86	27	64	73	84	58				/	/	90	92	
	Nbre de clonotypes					63	26	40	100	104	106		40	28	62	54	65	22	50	54	57	19				/	/	60	50	
	Index de répétition					0,9	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5		0,6	0,3	0,8	0,6	0,8	0,8	0,7	0,7	0,3				/	/	0,7	0,5		
	Freq TOP 1 (%)					5,8	10,3	10	16,1	8,9	7,2		12,9	26,8	8,9	9,1	10,5	11,1	6,3	11	6	41,4				/	/	10	18,5	
	Freq cumul. TOP10 (%)					23,2	48,3	57,5	45,9	38	41,7		51,6	78	34,2	45,5	35,6	48,1	37,5	42,5	38,1	89,7				/	/	42,2	53,3	
	Nbre de TCR reconstruits					1	NA	2	NA	0	NA		0	NA	1	NA	1	NA	5	NA	2	1				/	/	1	1	
Clonotypes CD4																														
	Nbre TRB identifiés					82	35	81	67	108	86		81	80	93	87	84	30	84	73	88	81				/	/	73	82	
	Nbre de clonotypes					70	35	79	63	103	86		81	73	91	81	81	29	83	69	81	80				/	/	73	79	
	Index de répétition					0,9	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0		1,0	0,9	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	1,0				/	/	1,0	1,0	
	Freq TOP 1					3,7	2,9	2,5	6	3,7	1,2		1,2	3,8	2,2	3,4	2,4	6,7	2,4	4,1	3,4	2,5				/	/	1,4	2,4	
Freq cumul. TOP10					25,6	28,6	14,8	20,9	13,9	11,6		12,3	21,3	12,9	18,4	15,5	36,7	13,1	19,2	19,3	13,6				/	/	13,7	15,9		
Clonotypes Treg actifs																														
	Nbre TRB identifiés	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	93	/	69	/	92	/	185	/	/	/	/	/	46	/	/	/
	Nbre de clonotypes	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	79	/	64	/	66	/	83	/	/	/	/	/	36	/	/	/
	Index de répétition	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,8	/	0,9	/	0,7	/	0,4	/	/	/	/	/	0,8	/	/	/
	Freq TOP 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3,2	/	2,9	/	12	/	13	/	/	/	/	/	13	/	/	/
	Freq cumul. TOP10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	22,6	/	21,7	/	34,8	/	42,7	/	/	/	/	/	43,5	/	/	/
	Nbre de TCR reconstruits	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0	NA	0	NA	5	NA	5	NA	NA	/	/	/	2/5	NA	/	/

T : Tumeur

ET: Extra-tumeur

*: échec des librairies T CD8 et CD4

Les analyses sont en cours pour les patientes LOKI, OJEC, ULDA et ELID.

Les patientes sont classées par groupe selon le type de lésion tumorale (comme défini dans le paragraphe sur les caractéristiques des échantillons) puis par ordre alphabétique. L'index de répétition est le rapport entre le nombre de clonotypes différents et le nombre total de *TRB* identifiés. Une valeur de 1 signifie qu'il n'y a aucun clonotype répété dans l'échantillon et plus cette valeur diminue plus il y a de clonotypes répétés. La fréquence d'un clonotype est déterminée par le rapport en pourcentage du nombre de cellules partageant le même CDR3 du *TRB* sur le nombre total de *TRB* identifiés. La somme des fréquences des dix clonotypes les plus représentés (fréquence cumulée du top 10) permet de repérer assez simplement les échantillons qui peuvent contenir de manière plus importante des clones T localement amplifiés.

Actuellement, nous avons réalisé l'analyse des répertoires *TRB* pour 10 patientes. Pour les premiers échantillons, nous avons trié 96 CD4 et 96 CD8 pour chaque prélèvement tumoral et extra-tumoral. Par la suite, pour augmenter notre rendement, nous avons trié les cellules sur CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺ et utilisé l'Index Sort pour identifier CD4 ou CD8.

Nous avons identifié une séquence *TRB* pour 87,3% des cellules triées.

La première constatation concerne l'index de répétition. Il est systématiquement entre 0,9 et 1 pour les clonotypes CD4 mais souvent plus faible pour les CD8, jusqu'à 0,5 dans les tissus tumoraux et 0,3 dans les tissus extra-tumoraux.

Dans la tumeur, la fréquence la plus élevée parmi les clonotypes CD8 est de 12,9% et de 3,7% parmi les CD4. Par contre, elle est de 41,4% parmi les T CD8 extra-tumoraux. Quant aux Tregs activés (CD4⁺CD25⁺GARP⁺), population observée uniquement dans les échantillons tumoraux, chez plusieurs patientes le clonotype le plus répété a une fréquence de l'ordre de 12-13%.

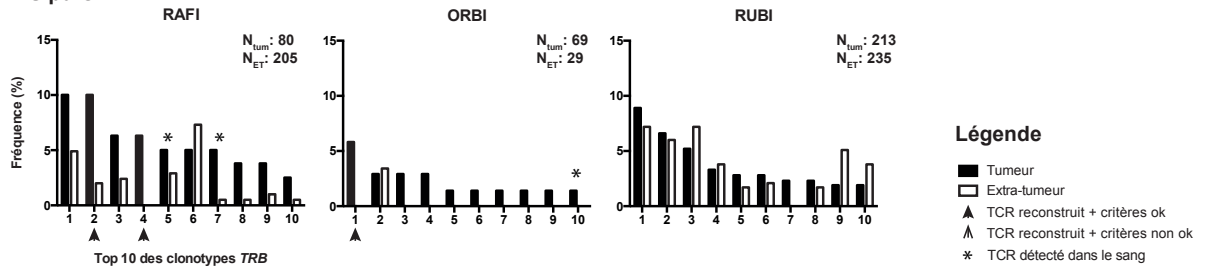
La fréquence cumulée des 10 premiers clonotypes tumoraux est en moyenne de 39,8% pour les CD8 et de 16% pour les CD4. Nous observons la même différence dans le tissu extra-tumoral avec une fréquence cumulée moyenne du top 10 des clonotypes CD8 de 54,8% et 20,7% pour les CD4. La fréquence cumulée moyenne du top 10 des clonotypes Tregs quant à elle est de 33,1%.

Ces résultats montrent qu'il y a des clonotypes CD8 répétés dans la tumeur mais également dans le tissu extra-tumoral, même si celui-ci est beaucoup moins infiltré par des lymphocytes T. Ceci ne semble pas être le cas, ou ils sont très faiblement répétés, pour les lymphocytes T CD4 tumoraux ou extra-tumoraux sauf si on s'intéresse à la sous-population des Tregs activés. Nos résultats dans le CCIS sont comparables à ce qui a été décrit pour des CCI. Une étude en 2016 analysant la clonalité des TILs dans les CCI a montré que celle-ci était identique dans les tissus tumoraux et extra-tumoraux ¹⁷⁹. Une autre étude a montré que la fréquence cumulée du

top 50 des clonotypes était similaire dans la tumeur et le tissu extra-tumoral ¹⁸⁰. L'ensemble de ces résultats ainsi que les nôtres soulignent le fait qu'il n'y a pas que dans la tumeur que l'on peut trouver des clonotypes répétés.

Ce qui nous intéresse, c'est de pouvoir sélectionner des lymphocytes T CD8 potentiellement anti-tumoraux afin de reconstruire leur TCR. Pour cela nous avons voulu savoir si les clonotypes les plus répétés dans la tumeur l'étaient aussi dans le tissu extra-tumoral ou dans le sang.

CCIS purs



CCIS-CCI

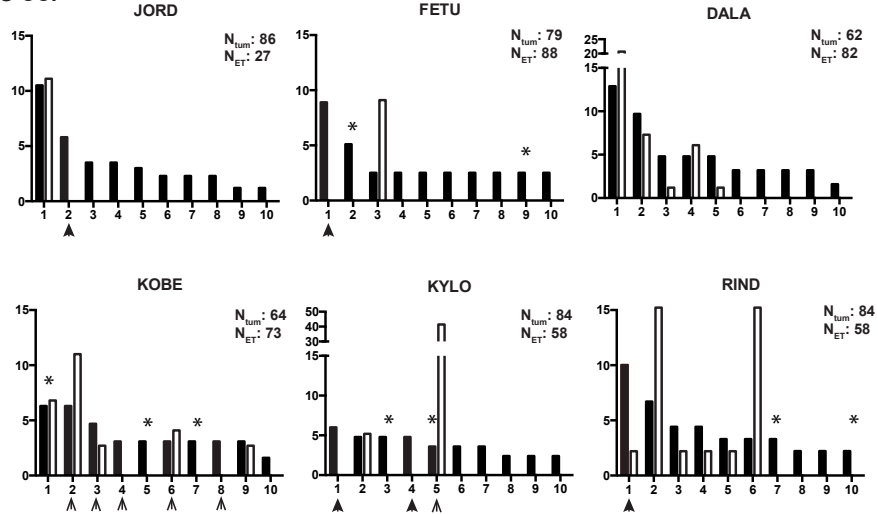


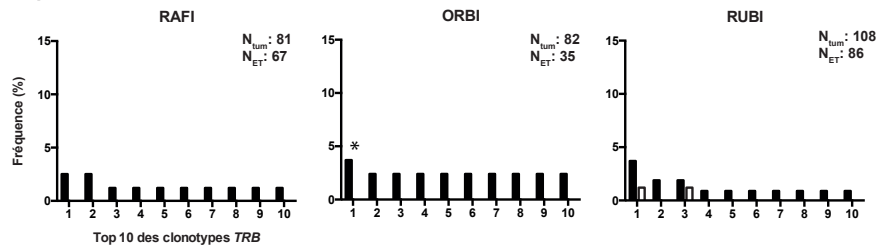
Figure 2.11. Répertoire *TRB* des 10 clonotypes T CD8 les plus fréquents dans la tumeur pour chaque patiente.

Pour chaque patiente, fréquences des 10 premiers clonotypes T CD8 les plus répétés dans la tumeur (en noir), classés par ordre décroissant de leur fréquence. En blanc, fréquences dans le tissu extra-tumoral. Les flèches pleines indiquent les clonotypes pour lesquels le TCR a été reconstruit. Flèches vides: TCR reconstruits en dehors des critères de sélection. Les patientes sont classées selon le type de lésions de CCIS (pures ou mixtes) et par ordre décroissant du taux d'infiltration des TILs (nombre de CD3⁺/g de tissu, déterminé par cytométrie de flux).

Les fréquences sont les rapports en pourcentage du nombre de cellules partageant la même séquence nucléotidique du CDR3 du *TRB* sur le nombre de cellules pour lesquelles un *TRB* a été identifié.

Les Figures 2.11, 2.12 et 2.13 montrent toutes les fréquences des 10 clonotypes les plus représentés dans les tumeurs, séparément pour les CD8, CD4 et Tregs activés (CD25⁺ GARP⁺). Pour les clonotypes CD8 les plus répétés dans les tumeurs, nous observons que certains le sont aussi (et parfois même plus) dans le tissu extra-tumoral (Figure 2.11). Par contre, peu sont détectés dans le sang. Dans les CCI analysés ¹⁸⁰, 50% des clonotypes CD3 étaient partagés entre le tissu tumoral et extra-tumoral, et le partage était d'autant plus probable que la fréquence du clonotype était élevée. Pour les clonotypes CD4 (Figure 2.12), ils sont peu ou pas répétés dans la tumeur et sans surprise, pas retrouvés en extra-tumoral. Pour les clonotypes Tregs activés (CD4⁺CD25⁺GARP⁺) (Figure 2.13), nous en avons suffisamment que chez 5 patientes. Dans 2 tumeurs, tous les clonotypes sont peu fréquents. Dans les 3 autres, il y a un clonotype qui prédomine nettement (fréquence de 12%, 13% et 13%).

CCIS purs



CCIS-CCI

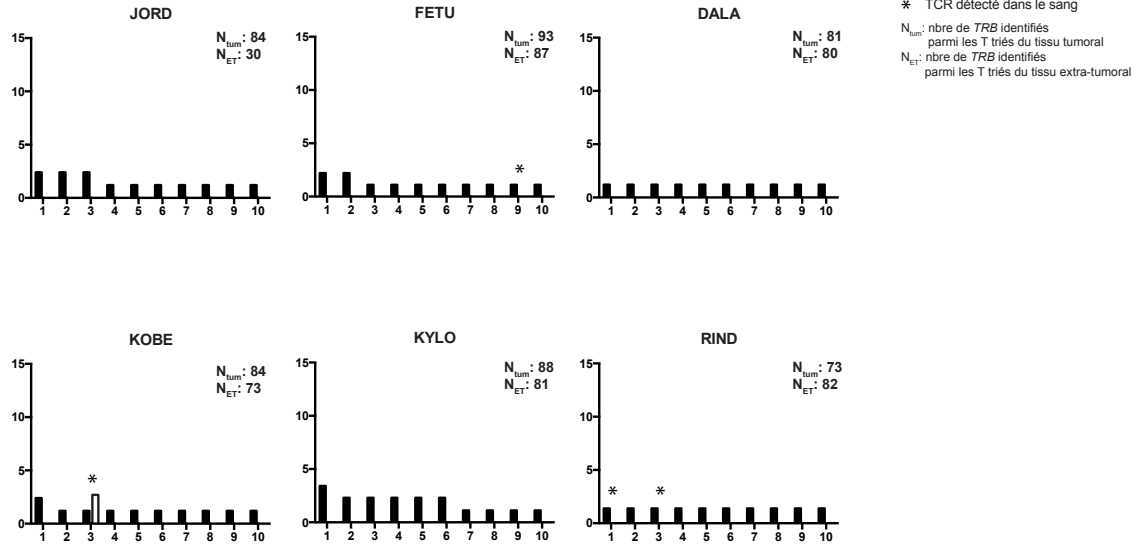


Figure 2.12. Répertoire *TRB* des 10 clonotypes T CD4 les plus fréquents dans la tumeur pour chaque patiente.

Pour chaque patiente, fréquences des 10 premiers clonotypes T CD4 les plus répétés dans la tumeur (en noir), classés par ordre décroissant de leur fréquence. En blanc, fréquences dans le tissu extra-tumoral. Les patientes sont classées selon le type de lésions de CCIS (pures ou mixtes) et par ordre décroissant du taux d'infiltration des TILs (nombre de CD3⁺/g de tissu, déterminé par cytométrie de flux).

Les fréquences sont les rapports en pourcentage du nombre de cellules partageant la même séquence nucléotidique du CDR3 du *TRB* sur le nombre de cellules pour lesquelles un *TRB* a été identifié.

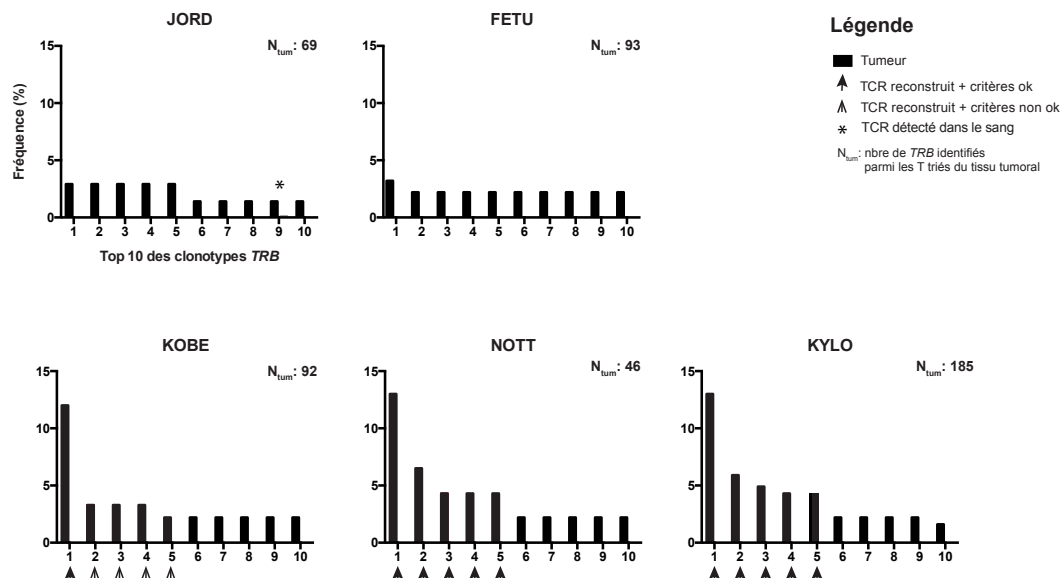


Figure 2.13. Répertoire *TRB* des 10 clonotypes Tregs activés les plus fréquents dans la tumeur pour chaque patiente.

Pour chaque patiente, fréquences des 10 premiers clonotypes Tregs activés ($CD4^+CD25^+GARP^+$) les plus répétés dans la tumeur (en noir), classés par ordre décroissant de leur fréquence. Les flèches pleines indiquent les clonotypes pour lesquels le TCR a été reconstruit. Flèches vides: TCR reconstruits en dehors des critères de sélection. Les patientes sont classées selon le type de lésions de CCIS (pures ou mixtes) et par ordre décroissant du taux d'infiltration des TILs (nombre de $CD3^+$ /g de tissu, déterminé par cytométrie de flux).

Les fréquences sont les rapports en pourcentage du nombre de cellules partageant la même séquence nucléotidique du CDR3 du *TRB* sur le nombre de cellules pour lesquelles un *TRB* a été identifié.

Sur base de ces observations, nous avons sélectionné des clonotypes à reconstruire pour les tests de reconnaissance d'antigènes avec les critères suivants :

- 1) Pour les T CD8 ou Tregs activés ;
- 2) Fréquence tumorale $\geq 4\%$;
- 3) Fréquence du clonotype dans la tumeur 5x plus importante que dans le tissu extra-tumoral ;

Ces critères sont arbitraires, guidés d'une part par la charge de travail technique que cela représente, et d'autre part par un plus grand intérêt pour les clonotypes clairement répétés localement et enrichis dans la tumeur par rapport au tissu extra-tumoral. Cela nous donne 11 clonotypes CD8 et 11 clonotypes Tregs activés à reconstruire.

Ensuite, nous avons apportés deux correctifs à ces critères. Le premier se base sur les analyses de répertoires TCR dans le sang que nous avons réalisées, non pas par « single cell RNAseq » mais à partir de librairies d'ADNc de PBMC. Le nombre de clonotypes CD3 identifiés est beaucoup plus élevé, en moyenne 14 000 par échantillon. La grande majorité des clonotypes les plus représentés dans les tumeurs ne sont pas retrouvés dans les répertoires sanguins. Seulement 18/230 sont détectés dans le sang et indiqués par une astérisque (*) dans les Figures 2.11, 2.12, 2.13. Par mesure de précaution afin d'éviter de tester des clonotypes fréquents dans le sang et donc présents dans tous les tissus, nous avons désélectionné 3 clonotypes CD8.

L'autre correctif concerne la patiente KOBE qui fut la première patiente pour laquelle nous avons réalisé cette analyse et tenté la reconstruction TCR. Nous avons décidé de reconstruire les TCR des 5 premiers clonotypes T CD8 et Tregs activés tumoraux non détectés dans le sang (sans notion d'enrichissement par rapport au tissu extra-tumoral).

Nous avons fait une autre exception concernant la patiente KYLO car nous avons été intrigués par le clonotype numéro 5 (Figure 2.11) dont la fréquence dans le tissu extra-tumoral atteint 41% et est de 5,7% dans le sang. Notre première hypothèse est que ce clonotype reconnaît probablement un peptide viral. Nous avons reconstruit son TCR afin de le tester également contre des pools de peptides EBV, CMV et influenza.

Jusqu'à présent, nous avons reconstruit 13/14 TCR de clonotypes CD8 et 12/15 TCR de clonotypes de Tregs activés. Ceci concerne 8 patientes sur 14 pour lesquelles nous avons pu trier une cellule par puit. La question suivante est : quels vont être les antigènes tumoraux candidats contre lesquels nous allons tester ces TCR reconstruits ?

6. Sélection des antigènes tumoraux candidats

Comme décrit dans l'introduction, il existe plusieurs types d'antigènes tumoraux pouvant être reconnus par des lymphocytes T, ceux considérés comme spécifiques des tumeurs et ceux dits « associés » aux tumeurs. Parmi les antigènes spécifiques des tumeurs, nous nous sommes intéressés aux antigènes mutés et aux antigènes issus de l'expression des gènes de type *MAGE*. De plus, certains sous-types moléculaires de cancer du sein surexpriment la protéine HER2 ce qui en fait également un antigène candidat, malgré qu'il ne soit pas spécifique des cellules tumorales.

6.1. Sélection des antigènes mutés

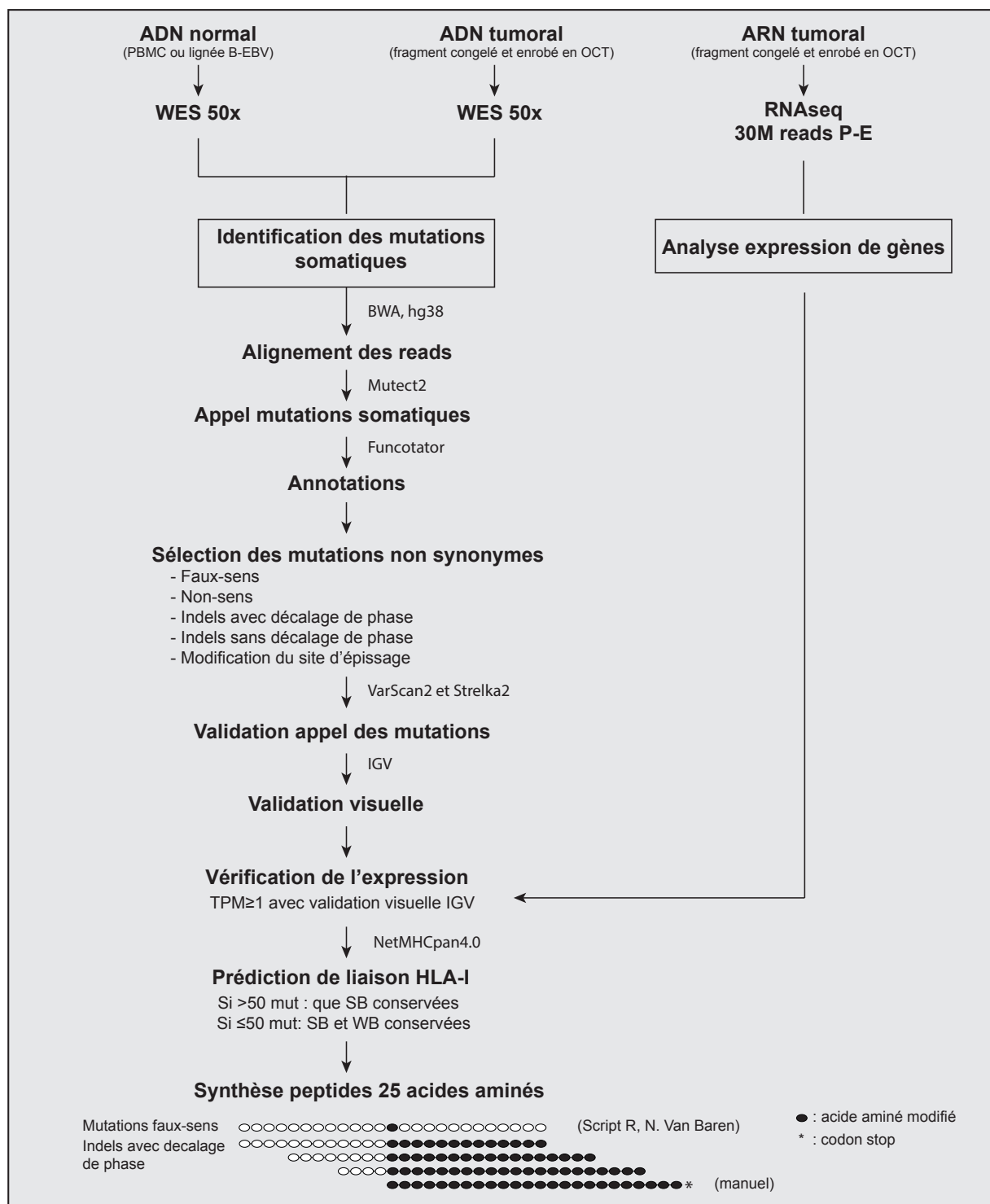
Pour chaque patiente, nous avons séquencé les exomes (WES pour « whole-exome sequencing ») tumoral et normal, ce dernier à partir des cellules mononuclées du sang ou des lymphocytes B transformés par EBV, afin d'identifier les mutations somatiques de la tumeur. Parmi celles-ci, nous avons sélectionné les mutations non synonymes: substitutions de nucléotides qui génèrent un changement d'acide aminé (faux-sens) ou un codon stop (non-sens), insertions et délétions (indels) d'un ou plusieurs nucléotides avec ou sans décalage du cadre de lecture et mutations modifiant un site d'épissage. La Figure 2.14 montre le procédé de sélection des mutations candidates.

Brièvement, les mutations somatiques ont été identifiées avec Mutect2 puis annotées avec Funcotator (deux fonctions de GATK v4). Ces analyses ont été réalisées par Orian Bricard en suivant les recommandations du Broad Institute. Ensuite, nous avons procédé à trois validations:

- 1) Validation de l'appel des mutations somatiques en comparant Mutect2 avec VarScan2 et Strelka2 (analyse réalisée par Nicolas Van Baren). La majorité des mutations détectées par Mutect2 l'étaient également par VarScan2 et Strelka2 mais ces derniers sélectionnaient beaucoup plus de variants qui s'avéraient être des polymorphismes.
- 2) Validation visuelle avec IGV (Integrative Genomic Viewer) afin d'exclure les faux-positifs (mutations présentes dans l'échantillon normal et non éliminées par Mutect2) et de valider les mutations détectées par Mutect2 mais pas par VarScan2 ni Strelka2.

- 3) Pour les patientes pour lesquelles nous avons décidé de reconstruire des TCR, nous avons vérifié l'expression des gènes mutés, quand nous disposions des données RNAseq, avec un seuil d'expression ≥ 1 TPM (Transcripts per kilobase million).

Ensuite, pour sélectionner les mutations pour lesquelles un peptide candidat serait synthétisé, nous avons fait une analyse de prédiction de liaison aux HLA-I par NetMHCpan4.0. Quand il y avait plus de 50 mutations dans la tumeur, nous n'avons gardé que celles prédites pour se lier avec une affinité forte ($K_d < 50$ nM) tandis que lorsqu'il y avait moins de 50 mutations, nous avons également gardé les peptides prédits pour se lier avec une affinité faible ($K_d < 500$ nM). Pour les patientes pour lesquelles des TCR ont été reconstruits, des peptides de 25 acides aminés ont été synthétisés pour les mutations faux-sens et les indels. Pour les mutations faux-sens, Nicolas Van Baren a écrit un script R pour sortir une séquence de 25 AAs avec le résidu mutant en position 13. Pour les indels avec décalage de phase, nous avons déterminé manuellement la séquence de plusieurs peptides de 25 AAs se chevauchant sur 21 AAs jusqu'au premier codon stop. Pour les indels en phase, nous avons synthétisé un seul peptide de 25 AAs centré sur la modification.



La Table 2.2 reprend pour toutes les patientes, classées par type de lésion puis par ordre alphabétique, les nombres de mutations somatiques non synonymes détectées par Mutect2 puis validées.

Nous avons indiqué la fréquence allélique moyenne des mutations, déterminée en faisant le rapport du nombre de reads mutés sur le nombre total de reads couvrant la position mutée. Dans un échantillon avec 100% de cellules tumorales diploïdes et sans perte d'hétérozygotie, la fréquence allélique est de 50%. Pour la majorité des patientes (3 exceptions), cette fréquence est positivement corrélée au pourcentage de cellules tumorales. Nous avons indiqué aussi la fréquence allélique maximale, celle de la mutation la plus représentée.

Les proportions de cellules tumorales dans les échantillons congelés utilisés pour l'extraction d'acides nucléiques ont été estimées avec l'aide du Dr Sophie Pirenne, assistante en anatomo-pathologie du sein, sur base de 3 cryocoupes de 7 µm colorées par hématoxyline-éosine. Ces coupes se trouvent au début, au milieu et à la fin des 30 coupes de 25 µm utilisées pour la génétique.

Le nombre moyen de mutations non synonymes a tendance à être plus faible dans les lésions de CCIS purs que dans les lésions mixtes CCIS-CCI mais cette différence n'est pas significative ($p=0,0581$). Comme décrit dans la littérature, ce sont les mutations faux-sens qui prédominent^{124,126}.

Le nombre de peptides antigéniques candidats est indiqué en bas de la table. La sélection de ces peptides s'est faite sur base de la prédiction de liaison aux HLA et du niveau d'expression du gène concerné. A noter que pour la patiente KOBE, première patiente pour laquelle nous avons réalisé des reconstructions TCR, nous avons testé toutes les mutations validées sans tenir compte de l'expression car nous ne disposions pas du RNAseq. De plus, comme nous voulions tester aussi des Tregs de cette patiente, nous n'avons pas fait de sélection sur base de NetMHCpan, moins validées pour les HLA de classe II.

Table 2.2. Sélection des antigènes mutés candidats

Type de lésion tumorale	Groupe A							Groupe B					Groupe C				
Code Patient	BIFI	LOKI	OJEC	ORBI	RAFI	RUBI	ULDA	DALA	FETU	JORD	KOBE	KYLO	ELID	NOTT	POCA	RIND	ROKY
% de cell. Tum.	<10	60	50	70	10	50	<10	90	10	20	30	40	50	20	50	10	100
Nbre Mutations non syn.	1	38	8	29	5	3	4	43	67	10	32	25	104	27	38	9	17
Fréq. All. Moy (%)	1	23	14	32	5	20	28	21	10	6	12	28	20	15	13	14	35
Fréq. All. Max (%)	1	65	34	81	7	46	43	50	37	10	33	56	79	28	72	36	82
Nbre de :																	
mut. Faux sens	1	28	7	19	5	3	3	40	57	7	29	21	71	21	33	7	16
mut. Non sens	0	3	0	4	0	0	0	1	5	0	2	1	7	1	0	0	0
indels en phase	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	0
indels avec décalage	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	1	1	10	3	4	1	1
modif site épissage	0	0	0	3	0	0	1	2	5	3	0	2	11	3	1	1	0
Faux positif	1	3	4	1	5	0	0	1	1	0	3	4	0	0	0	1	0
Nbre de peptides	0	EA	EA	22	3	0	EA	0	41	5	31	16	EA	17*	0	14*	0

EA: En attente des résultats des répertoires TCR pour déterminer le nombre de TCR à reconstruire

*: 3 peptides communs basés sur 2 mutations proches (RETSAT A533V et G536R) partagées par ces deux tumeurs

6.2. Sélection des antigènes de type MAGE

Pour les patientes pour lesquelles nous disposons des données de RNAseq, nous avons regardé l'expression des gènes de type *MAGE*. La Table 2.3 en comprend une série de ces gènes sélectionnés sur base de données publiées pour le cancer du sein ^{16,181,182}, avec leur niveau d'expression en TPM. A titre comparatif, sont également rapportées, les valeurs en TPM pour des gènes de ménage, fortement exprimés comme *ACTB* et *GAPDH*, moyennement exprimé comme *OAZ1* et faiblement exprimé comme *ABL1*, ainsi que pour le gène *ERBB2*. Nous avons fixé un seuil arbitraire de $TPM \geq 1$ avec vérification sur IGV pour sélectionner les gènes encodant les peptides candidats à tester (en rouge dans la Table 2.3). Globalement, l'expression des gènes de type *MAGE* est faible sauf pour la tumeur de la patiente ELID qui co-exprime l'ensemble des gènes *GAGE*.

Table 2.3. Expression en TPM de gènes de ménage, ERBB2 et de type MAGE.

Type de lésion tumorale	Groupe A				Groupe B			Groupe C				
Code Patient	LOKI	OJEC	ORBI	RAFI	DALA	FETU	JORD	ELID	NOTT	POCA	RIND	ROKY
<i>ACTB</i>	1068	2228	1383	1964	1764	1949	2039	1533	1389	2473	904	2157
<i>GAPDH</i>	2367	1609	1275	1760	1557	1048	1118	1398	2279	1438	1422	1483
<i>OAZ1</i>	566	397	194	294	201	259	258	325	485	428	333	418
<i>ABL1</i>	21	61	38	61	35	28	45	28	12	30	19	33
<i>ERBB2</i>	1111	228	84	681	258	22	1018	150	39	88	23	137
<i>CTAG1A</i> ⁽¹⁾	0	1,6	0,0	1,9	0	0	0,5	0	0	0,4	0,3	0
<i>CTAG1B</i> ⁽¹⁾	0	1,2	0,0	1,9	0	0	0,6	0	0	0,4	0,3	0
<i>CTAG2</i> ⁽²⁾	0	0	0,0	0,3	0	0	7,0	1,0	0	0	0	0
<i>GAGE1</i>	0	0	0	0	0	0	0	1,0	0	0	0	0
<i>GAGE10</i>	0	0	0	0	0,2	0	0	2,5	0,1	0	0	0
<i>GAGE12B</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0
<i>GAGE12C</i>	0	0	0	0	0	0	0	6,4	0	0	0	0
<i>GAGE12D</i>	0	0	0	0	0	0	0	6,0	0	0	0	0
<i>GAGE12E</i>	0	0	0	0	0,2	0	0	5,4	0	0	0	0
<i>GAGE12F</i>	0	0	0	0	0	0	0	4,4	0	0	0	0
<i>GAGE12G</i>	0	0	0	0	0	0	0	7,2	0,3	0	0	0
<i>GAGE12H</i>	0	0	0	0	0	0	0	21,0	0	0	0	0
<i>GAGE12J</i>	0	0	0	0	0,2	0	0	1,1	0,2	0	0	0
<i>GAGE13</i>	0	0	0	0	0	0	0	3,2	0,1	0	0	0
<i>GAGE2A</i>	0	0	0	0	0	0	0	25,0	0,2	0	0	0
<i>GAGE2E</i>	0	0	0	0	0	0	0	15,9	0	0	0	0
<i>MAGEA1</i>	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0
<i>MAGEA10</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA11</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0
<i>MAGEA12</i>	0	0	0	0,2	0	0	0,2	0	0	0	0	0
<i>MAGEA13P</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA2</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA2B</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA3</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA4</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA4-AS1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA5</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA6</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA7P</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA8</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA8-AS1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA9</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEA9B</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0
<i>MAGEB1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0
<i>MAGEB10</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEB16</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEB17</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>MAGEB18</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEB2</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0	0
<i>MAGEB3</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEB4</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEB5</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEB6</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEB6B</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEC1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0
<i>MAGEC2</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MAGEC3</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0
<i>SSX1</i>	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0,3	0
<i>TFDP3</i>	5,9	2,5	0,0	0,6	0,3	0,1	2,0	0	0,2	0,3	0,9	0

(1) *CTAG1A* et *1B* ont été initialement décrits comme *NY-ESO-1* ou *LAGE-2* (*A* et *B*)

(2) *CTAG2* a été initialement décrit comme *LAGE-1*

Le gène *NY-ESO-1* (*CTAG1A/IB*) a été sélectionné comme candidat pour tester les TCR reconstruits des patientes RAFI et OJEC. Ce test de reconnaissance antigénique a été réalisé au moyen d'un pool commercial de peptides couvrant la séquence entière de la protéine, préalablement validé avec une lignée cellulaire reportrice exprimant un TCR spécifique du peptide NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ SLLMWITQC présenté par HLA-A2 (Figure 2.15). Le gène *CTAG2* (ou *LAGE-1*) sera également testé pour le TCR de la patiente JORD et éventuellement pour la patiente ELID en fonction des résultats de l'analyse des répertoires TCR. Pour cela, nous allons utiliser un pool existant de 74 peptides de 16 AAs se chevauchant sur 12 AAs. Enfin, le dernier candidat que nous pourrions tester est le gène *TFDP3* pour les patientes JORD ainsi que LOKI et OJEC si nous sélectionnons des TCR à reconstruire pour ces patientes. Rien n'est connu de l'antigénicité du produit de ce gène.

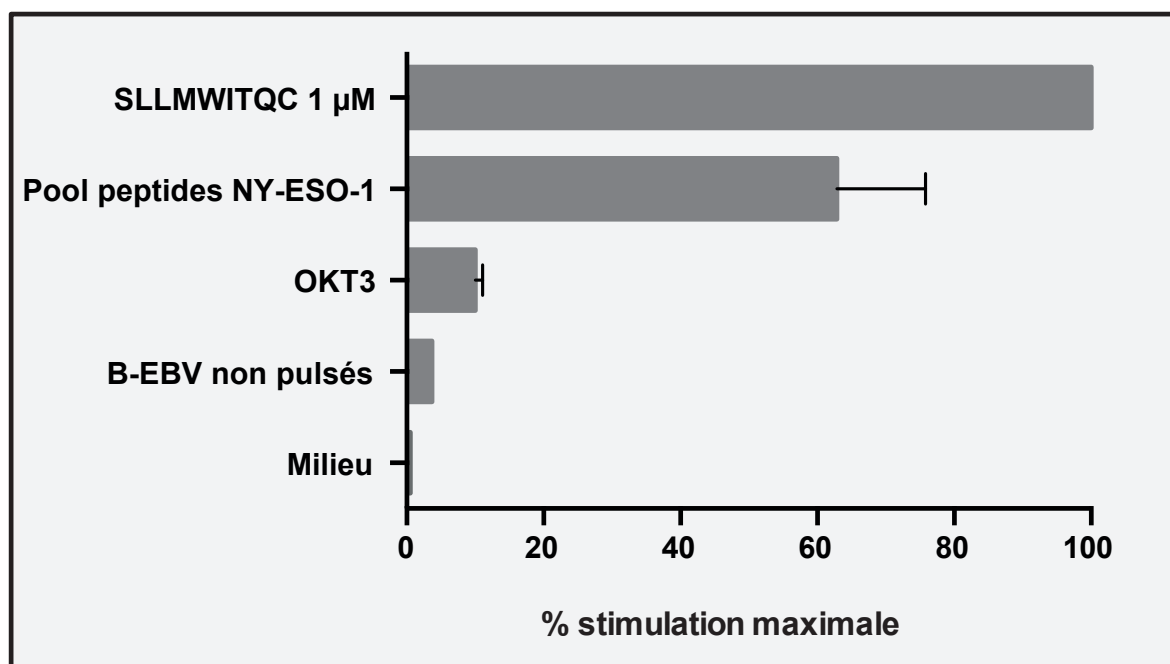


Figure 2.15. Contrôle de stimulation par un pool de peptides NY-ESO-1.

Une lignée cellulaire Jurkat transduite avec un TCR reconnaissant le peptide NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ SLLMWITQC sur HLA-A2 et possédant un élément de réponse NFAT-RFP a servi de contrôle pour les tests de stimulation par un pool commercial de peptides couvrant la protéine NY-ESO-1. Les B-EBV (60 000 cell/puits en M96U) ont été pulsés 4h à 37°C avec le peptide SLLMWITQC à 1 µM (contrôle positif) ou le pool de peptides NY-ESO-1 à 750 nM (concentration recommandée par la firme JPT). Comme contrôles, les cellules effectrices (30 000 cell/puits) ont été également stimulées avec de l'OKT3 insolubilisé, des B-EBV non pulsés ou du milieu seul. L'activation du TCR a été évaluée après une incubation d'une nuit à 37°C par le pourcentage de cellules effectrices exprimant la RFP en cytométrie de flux. Le test a été réalisé en duplicat. Les moyennes et les écarts-types pour chaque condition de stimulation sont présentés en pourcentage de la stimulation maximale obtenue, ici avec le peptide seul.

RFP: red fluorescent protein.

6.3. HER2

Avec l'aide du Dr Mieke Van Bockstal, anatomo-pathologiste responsable de la pathologie mammaire aux CUSL, nous avons déterminé, séparément pour les foyers CCIS et CCI, le score HER2 classiquement utilisé en IHC (Recommandations ASCO/CAP HER2Testing in Breast Cancer Update 2018 ¹⁸³). La Table 2.4 reprend ce score pour chaque foyer tumoral de toutes les patientes. Lorsqu'un ou plusieurs TCR ont été reconstruits, nous les avons testés pour la reconnaissance de peptides HER2 si le score IHC était 3+ pour la lésion CCIS.

Table 2.4. Expression de la protéine HER2

Type de lésion tumorale	Groupe A							Groupe B					Groupe C				
Code Patient	BIFI	LOKI	OJEC	ORBI	RAFI	RUBI	ULDA	DALA	FETU	JORD	KOBE	KYLO	ELID	NOTT	POCA	RIND	ROKY
Score IHC (0+,1+,2+,3+)																	
Foyer CCIS	1	3	2	1	3	3	2	2	2	3	3	2	2	NA	2	2	1
Foyer CCI	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	1	3	3	0	2	1	2	1	2

NA: Non attribuable

Pour tester ces TCR, nous avons utilisé deux pools de peptides commerciaux couvrant les domaines extracellulaire et intracellulaire de la protéine. Ces pools de peptides ont été validés avec un clone CTL reconnaissant le peptide HER2₃₆₉₋₃₇₇ KIFGSLAFL¹⁸⁴ (Figure 2.16).

Incidemment, une mutation dans un autre gène de la famille *EGFR* (*ERBB3* D297Y) a été détectée dans la tumeur de la patiente KOBE. Cette mutation nous a intéressés car elle a été décrite dans plusieurs cancers (estomac, vessie, sein, voies biliaires et colon) et dans le cancer du sein elle aurait un potentiel oncogénique et induirait une résistance *in vitro* au Lapatinib¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

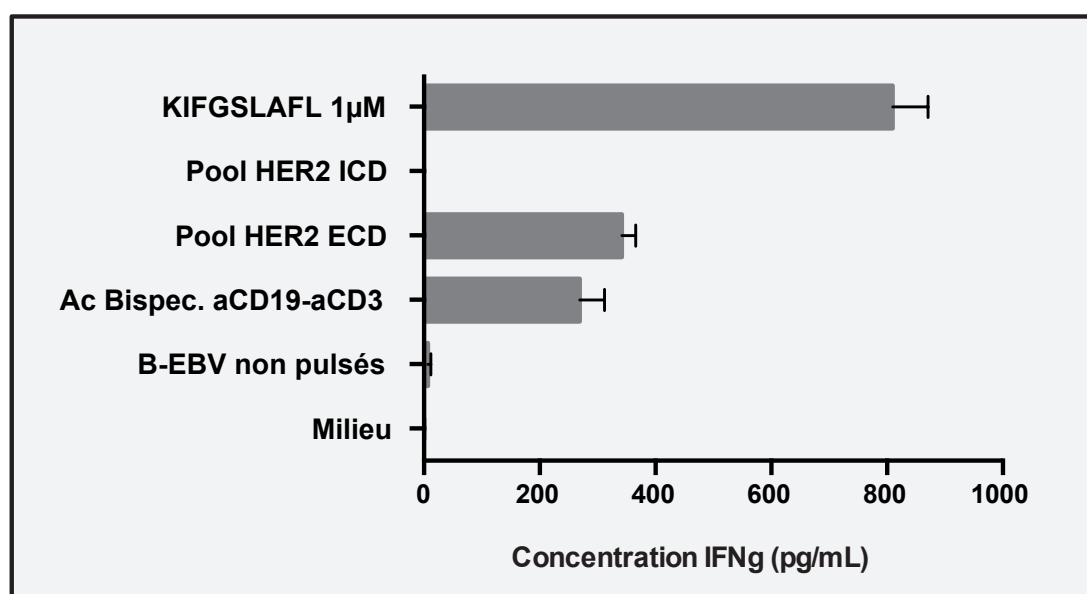


Figure 2.16. Contrôle de stimulation par des pools de peptides HER2.

Le clone CTL (VEMI JVE672 6.10/8) reconnaissant le peptide HER2₃₆₉₋₃₇₇ KIFGSLAFL sur HLA-A2, a servi de contrôle pour les tests de stimulation avec des pools de peptides commerciaux couvrant la partie extracellulaire (ECD) et intracellulaire (ICD) de la protéine HER2. Les B-EBV (20 000 cell/puits en M96U) ont été pulsés 1h à 37°C avec le peptide KIFGSLAFL à 1μM (contrôle positif) ou les pools de peptides HER2 à 750 nM (concentration recommandée par la firme JPT). Comme contrôles, le clone CTL (20 000 cell/puit) a été également stimulé avec un anticorps bispécifique anti-CD19/anti-CD3 ou des B-EBV non pulsés ou du milieu seul. L'activation a été évaluée après une incubation d'une nuit à 37°C par un ELISA IFNγ. Le test a été réalisé en triplicat dont les moyennes et écarts-types sont représentés.

7. Tests de reconnaissance des peptides tumoraux candidats par les TCR reconstruits

Après le clonage des séquences *TRA* et *TRB* dans un vecteur lentiviral, nous avons transduit le variant Jurkat 2D3 qui contient un transgène GFP derrière un élément de réponse à NFAT. Cela nous permet de détecter l'activation du TCR par cytométrie de flux. La Figure 2.17 montre le protocole des tests de reconnaissance des antigènes tumoraux candidats. Chaque TCR a été testé individuellement contre chaque peptide muté candidat et, quand cela était approprié, avec les pools de peptides NY-ESO-1 ou HER2. Les B-EBV autologues ont été incubés pendant 4h à 37°C avec chaque peptide à 10 μ M seul ou à 750 nM dans un pool (concentration recommandée par la firme). Ensuite les cellules effectrices 2D3 sont rajoutées à un ratio Jurkat:B-EBV de 1:2 et incubées pendant une nuit à 37°C. Comme contrôles positifs, nous avons stimulé les Jurkat 2D3 avec un anticorps anti-CD3 (OKT3) insolubilisé ou un anticorps bispécifique anti-CD19/anti-CD3 soluble. Comme contrôles négatifs, nous les avons incubées avec du milieu seul ou avec les B-EBV sans peptide. L'activation TCR a été mesurée le lendemain par cytométrie de flux et exprimée en pourcentage de cellules effectrices devenues GFP positives.

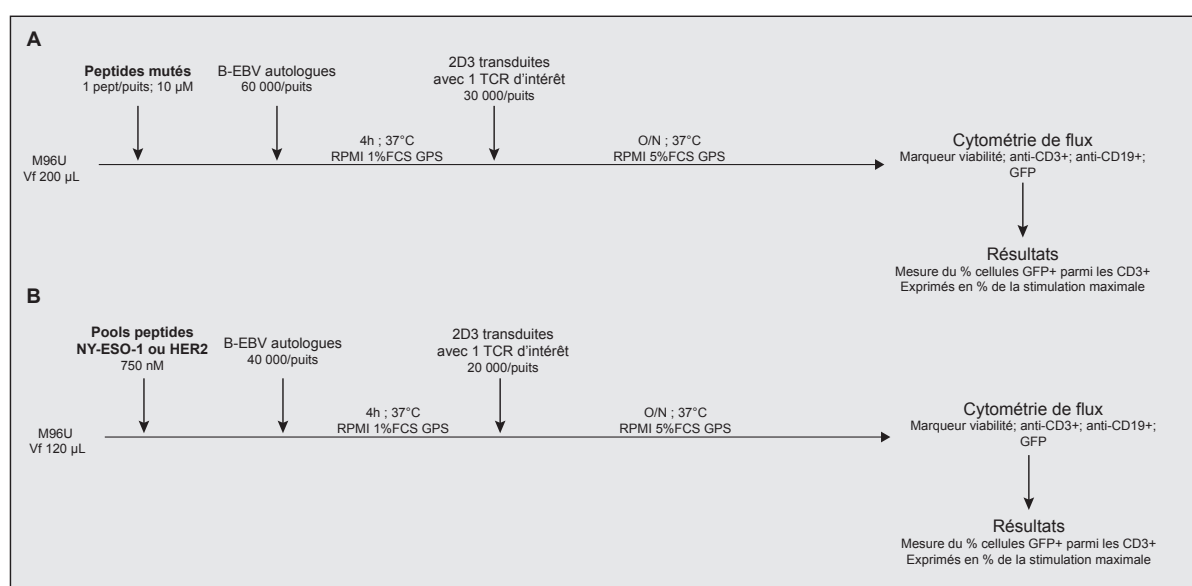


Figure 2.17. Protocole du test de reconnaissance d'antigènes tumoraux.

A. Pour les peptides mutés. Tests réalisés en triplicat.

B. Pour les pools de peptides commerciaux NY-ESO-1 et HER2. Tests réalisés en duplicat.

Comme nous voulions tester aussi bien des TCR de T CD8 que CD4 Tregs avec les mêmes peptides mutés, nous avons utilisé des peptides de 25 acides aminés. Nous avons vérifié que notre protocole de criblage des TCR reconstruits dans les Jurkat 2D3 avec des peptides de cette longueur était suffisamment sensible. Pour cela, nous avons reconstruit et cloné dans les 2D3, les TCR du clone CD8 DAUV159/3 reconnaissant un peptide mutant de 9 acides aminés codé par le gène *ASCC3* (initialement *MUM3*) et présenté par HLA-A28¹⁸⁸ et du clone CD4 DAJU721A10/28 reconnaissant un peptide mutant de 16 acides aminés codé par le gène *HUWE1* et présenté par HLA-DRB4 (C. Muller et P.G. Coulie, données non publiées). Les 25-mères contiennent l'acide aminé mutant en position 13.

La Figure 2.18 montre les résultats de ces contrôles. Comme attendu, pour le clone CD8, la stimulation par le 25-mère est plus faible qu'avec le 9-mère mais elle reste très clairement détectable : 19x au-dessus de la reconnaissance du peptide sauvage et des B-EBV seuls. Pour le clone CD4, la stimulation par le 25-mère est comparable à celle du peptide présenté naturellement.

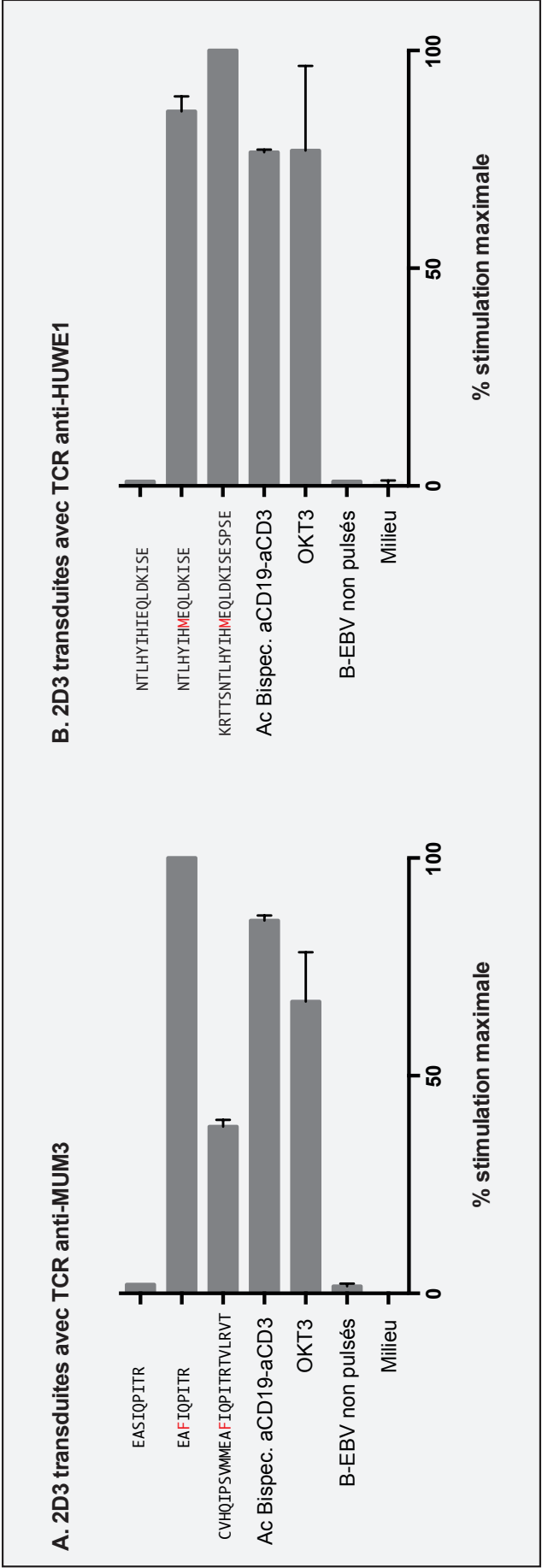


Figure 2.18. Contrôles des tests de reconnaissance avec peptides mutés de 25 acides aminés.
A. Moyennes et écarts-types des pourcentages de stimulation maximale obtenus pour les 2D3 transduites avec le TCR du clone CD8 DAUV159/3 reconnaissant le peptide muté MUM3₃₂₂₋₃₃₀ de 9 acides aminés sur HLA-A28.
B. Moyennes et écarts-types des pourcentages de stimulation maximale obtenus pour les 2D3 transduites avec le TCR du clone CD4 DAJU721A10/28 reconnaissant le peptide muté HUWE1₂₁₉₋₂₃₄ de 16 acides aminés sur HLA-DRB4.
En rouges : acides aminés mutants.

La Table 2.5 résume, pour les patientes pour lesquelles un ou des TCR ont été ou vont être reconstruits, les antigènes et TCR candidats ainsi que les résultats obtenus lors des tests de criblage réalisés jusqu'à présent.

Table 2.5. Résultats des tests de reconnaissance antigénique

Type de lésion tumorale	Groupe A					Groupe B				Groupe C		
Code Patient	LOKI	OJEC	ORBI	RAFI	ULDA	FETU	JORD	KOBE	KYLO	ELID	NOTT	RIND
Antigènes testés												
Peptides mutés	EA	EA	22	3	EA	41	5	31	16	EA	17	14
Type MAGE	TFDP 3	NY-ESO-1 TFDP3		NY-ESO-1	-	-	CTAG2 TFDP3	-	-	CTAG2 Famille GAGE	-	-
HER2	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
TCR reconstruits et testés												
CD8	EA	EA	1	2	EA	1	1	5	3	EA	0	1
CD4 Tregs activés	0	0	0	0	0	0	0	5	4	0	2	0
Résultats	EA	EA	0	0	EA	0	0	1	0	EA	EC	EC

EA: En attente des résultats des répertoires TCR pour déterminer le nombre de TCR à reconstruire

EC: En cours

Tests réalisés

Concernant les antigènes mutés, nous avons déjà testé les TCR reconstruits de 6 patientes : ORBI (1CD8), RAFI (2 CD8), FETU (1 CD8), JORD (1CD8), KOBE (5 CD8 et 5 CD4 Tregs) et KYLO (3/3 CD8 et 4/5 Tregs). Pour tous les TCR de CD8, les résultats de criblage avec les peptides mutés se sont avérés négatifs. La Figure 2.19 montre les résultats de ce test pour les deux TCR de la patiente RAFI.

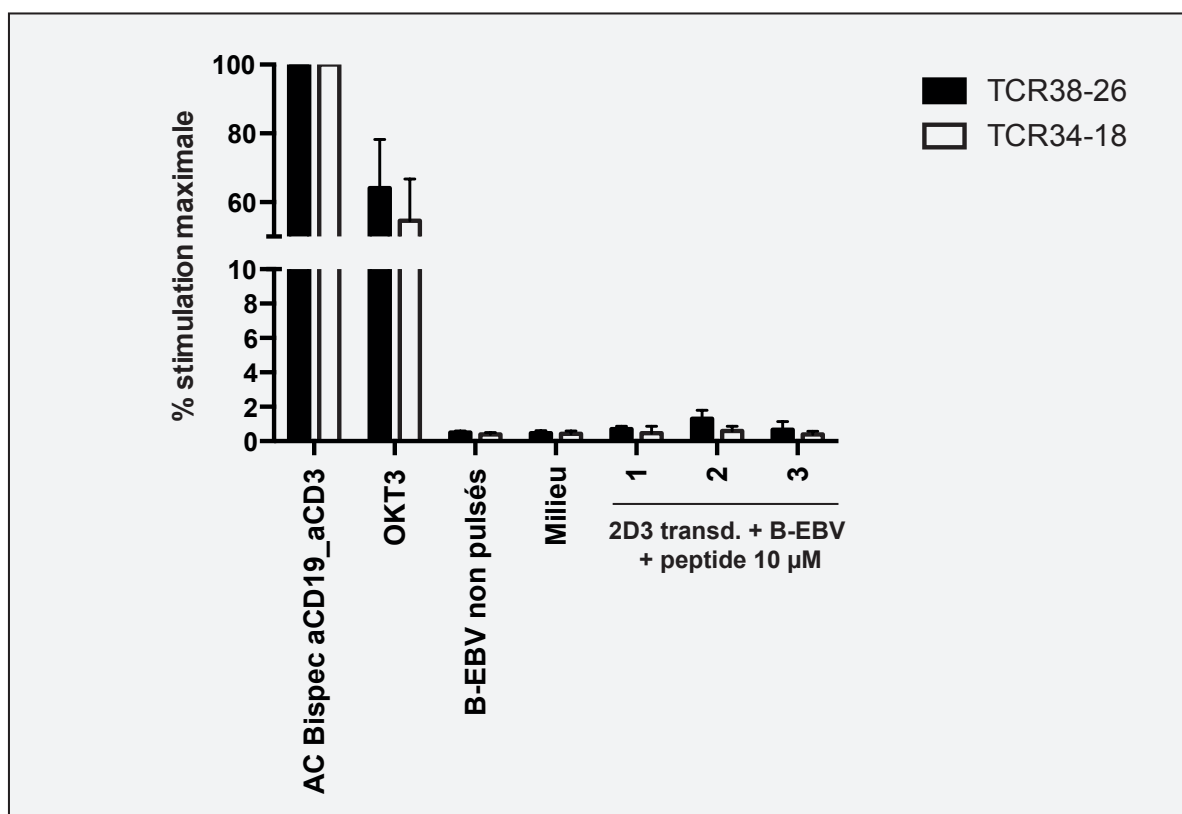


Figure 2.19. Test de reconnaissance des peptides mutés candidats par les TCR CD8 de la patiente RAFI.

Moyennes et écarts-types des pourcentages de stimulation maximale des cellules 2D3 transduites avec les TCR38-26 et TCR34-18 de la patiente RAFI (expérience réalisée en triplicat). Incubation 4h à 37°C des B-EBV autologues avec les 3 peptides mutés individuellement à 10 µM. Ensuite ajout des cellules 2D3 pour une incubation d'une nuit à 37°C (ratio Jurkat 2D3:B-EBV de 1:2). Mesure de l'activation TCR par le pourcentage de cellules 2D3 GFP positives en cytométrie de flux. Contrôles positifs: 2D3 avec OKT3 insolubilisé (300 ng /mL) ou 2D3 avec B-EBV + anticorps bispécifique anti-CD19/anti-CD3 (10 ng/mL). Contrôles négatifs: 2D3 avec milieu seul ou 2D3 avec B-EBV sans peptide (non pulsés).

Pour la patiente KYLO, un des trois TCR de CD8 reconstruits (clonotype 5, TCR9-3) ne rentrait pas dans les critères de sélection. Nous avons été intrigués par sa fréquence très élevée dans le tissu extra-tumoral (41%) et dans le sang (5,7%). Notre hypothèse était que celui-ci reconnaissait un peptide viral. La Figure 2.20 montre les résultats du test de reconnaissance des peptides mutés candidats par ce TCR. Nous voyons qu'il s'active en présence des B-EBV seuls. Il est donc presque certain que ce TCR reconnaît un peptide du virus EBV. Nous avons observé la même chose pour un des 5 TCR CD8 de la patiente KOBE qui ne satisfaisait pas non plus aux critères de sélection (données non montrées). Ces résultats confortent l'hypothèse qu'en ne reconstruisant pas les TCR de clonotypes fréquents aussi bien dans la tumeur qu'en dehors et en favorisant ceux nettement enrichis dans la tumeur, nous diminuons le risque de sélectionner des T anti-viraux.

Concernant les antigènes de type MAGE, le seul candidat testé est *NY-ESO-1* pour les 2 TCR reconstruits de la patiente RAFI et les résultats sont négatifs. Il sera éventuellement testé pour la patiente OJEC en fonction des résultats du répertoire TCR. Nous allons tester prochainement *CTAG2* pour la patiente JORD et éventuellement *ELID* si nous reconstruisons des TCR pour cette patiente. Les autres candidats repris dans la Table 2.5 (*TFDP3* et les gènes *GAGE*) seront testés en fonction des résultats de l'analyse des répertoires TCR des patientes concernées.

Enfin, concernant l'antigène HER2, nous avons déjà réalisé les tests de reconnaissance pour les patientes RAFI, JORD et KOBE. Aucun TCR reconstruit pour ces patientes n'a montré un signal positif. Cet antigène pourra encore être testé pour la patiente LOKI en fonction des résultats de son répertoire TCR.

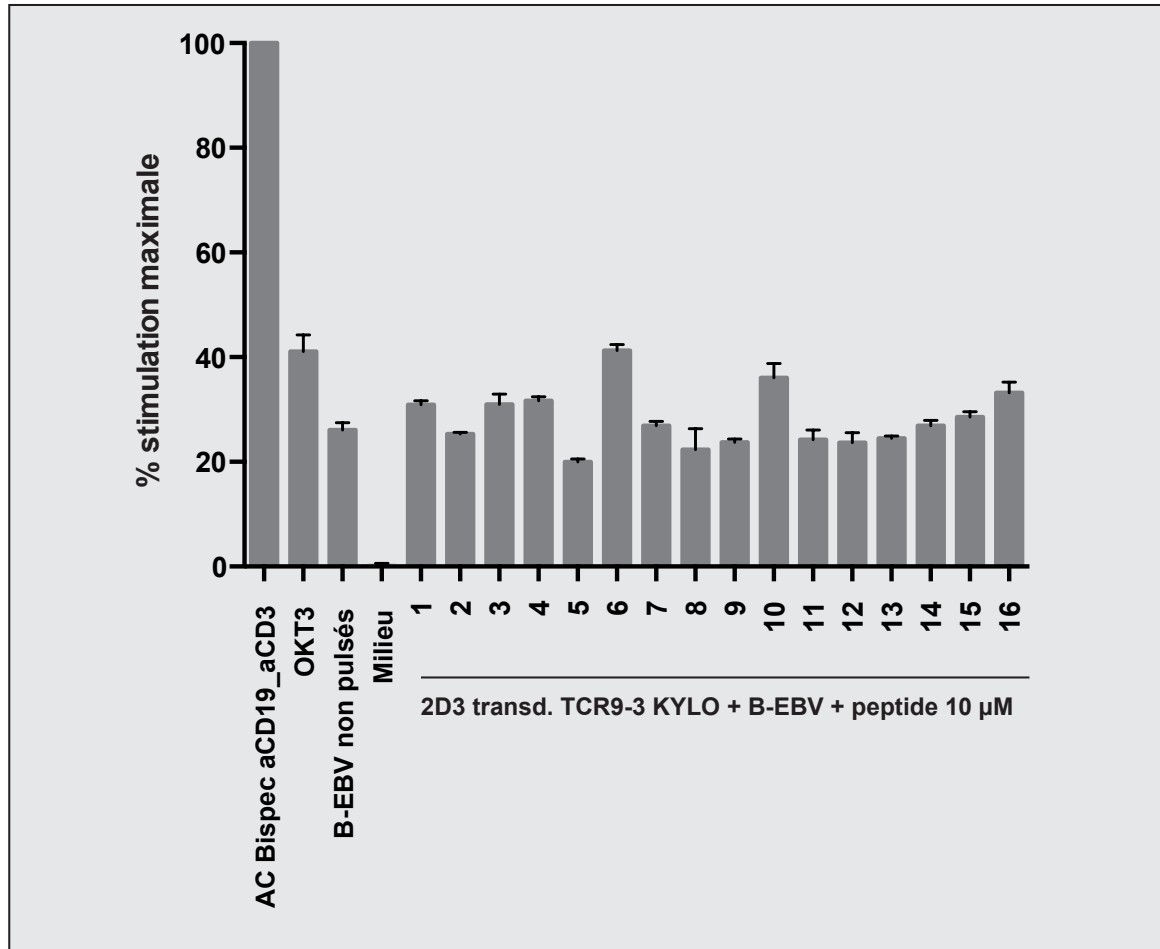


Figure 2.20. Test de reconnaissance des peptides mutés candidats par un TCR CD8 de la patiente KYLO.
Moyennes et écarts-types des pourcentages de stimulation maximale des cellules 2D3 transduites avec les TCR9-3 de la patiente KYLO (expérience réalisée en triplicat). Incubation 4h à 37°C des B-EBV autologues avec chacun des 3 peptides mutés à 10 μ M. Ensuite ajout des cellules 2D3 pour une incubation d'une nuit à 37°C (ratio Jurkat 2D3:B-EBV de 1:2). Mesure de l'activation TCR par le pourcentage de cellules 2D3 GFP positives en cytométrie de flux. Contrôles positifs: 2D3 avec OKT3 insolubilisé (300 ng/mL) ou 2D3 avec B-EBV + anticorps bispécifique anti-CD19/anti-CD3 (10 ng/mL). Contrôles négatifs: 2D3 avec milieu seul ou 2D3 avec B-EBV sans peptide (non pulsés).

8. Possible reconnaissance d'un antigène muté par un clonotype dominant Treg activé de la patiente KOBE

Parmi les 5 TCR de Tregs activés testés pour la patiente KOBE, nous avons mis en évidence l'activation du TCR du clonotype le plus représenté avec le peptide numéro 3 dans deux expériences réalisées en monoplicat (Figure 2.21). Le signal obtenu avec ce peptide (41% de la stimulation maximale) est comparable à celui observé lorsque les cellules effectrices sont stimulées avec l'OKT3 insolubilisé (46%) et est 6x plus intense qu'avec les B-EBV non pulsés (6,5%). A noter que les peptides sont numérotés par ordre décroissant de la fréquence allélique de la mutation qu'il porte. Le peptide 3 correspond à la mutation N158I dans le gène *ITGA4* dont la fréquence allélique est de 22%. Malheureusement, nous avons perdu ce signal positif lors d'une 3^{ème} expérience en triplicat.

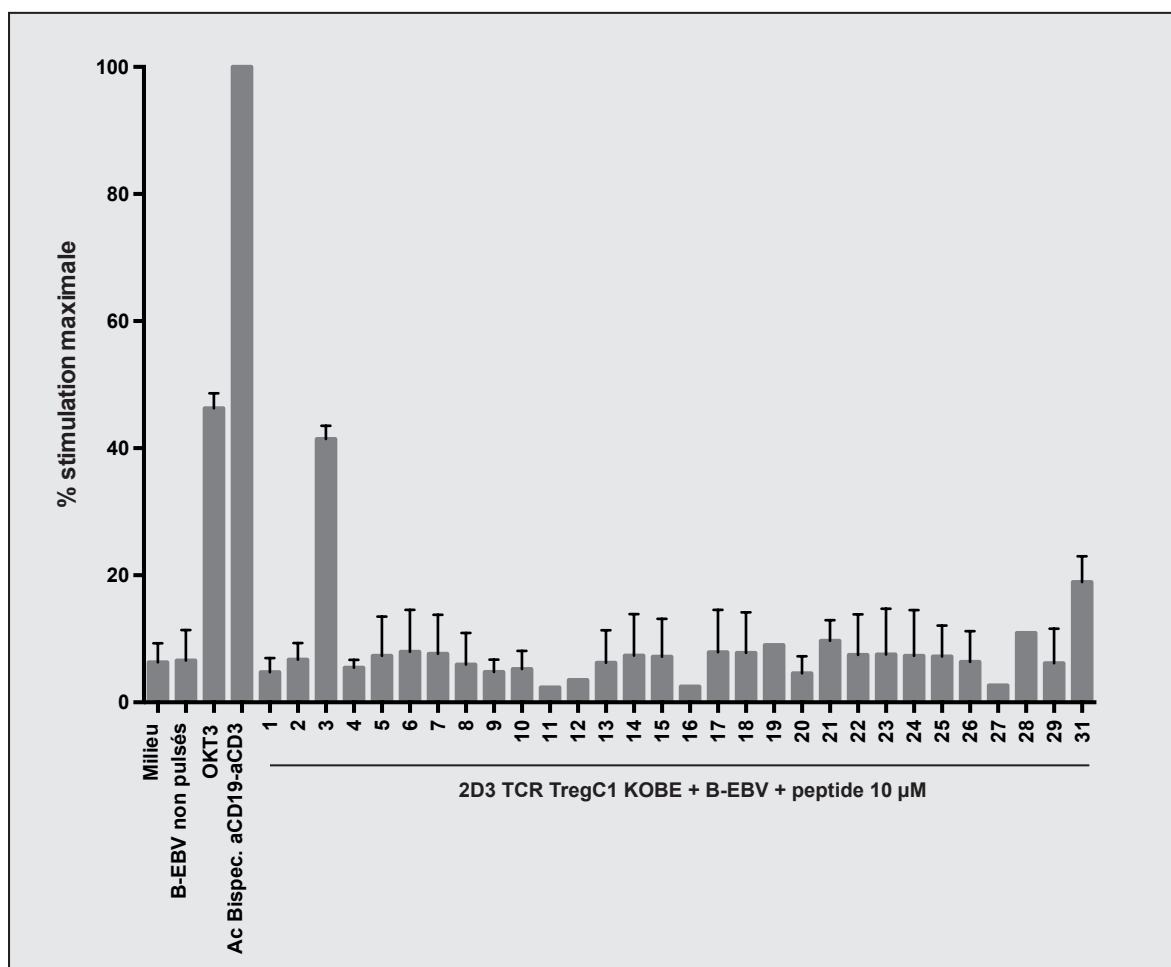


Figure 2.21. Test de reconnaissance des peptides mutés candidats par le TCR Treg activé prédominant de la patiente KOBE.

Moyennes et écarts-types des pourcentages de stimulation maximale des cellules 2D3 transduites avec le TCR du clonotype Treg activé dominant (TregC1) de la patiente KOBE (2 expériences indépendantes en monoplicat). Incubation 4h à 37°C des B-EBV autologues avec chaque peptide muté à 10 μ M. Ensuite ajout des cellules 2D3 pour une incubation d'une nuit à 37°C (ratio E:C de 1:2). Mesure de l'activation TCR par le pourcentage de cellules 2D3 GFP positives en cytométrie de flux. Contrôles positifs: 2D3 avec OKT3 insolubilisé (300 ng/mL) ou 2D3 avec B-EBV et anticorps bispécifique anti-CD19/anti-CD3 (10 ng/mL). Contrôles négatifs: 2D3 avec milieu seul ou 2D3 avec B-EBV sans peptide (non pulsés).

Devant cette discordance et pour tester la spécificité tumorale du peptide mutant, nous avons réalisé un test comparant les versions mutées et sauvages de 3 paires de peptides de 15 AAs se chevauchant sur 13 AAs inclus dans le précurseur de 25 AAs (Figure 2.22). Lors de cette expérience, nous avons testé à nouveau le peptide précurseur de 25 AAs pour lequel nous avons retrouvé un signal positif (22% de la stimulation maximale) mais inférieur à celui observé avec l'OKT3. A noter que cette fois-ci, le pourcentage de cellules 2D3 GFP positives (41%) obtenues avec l'OKT3 était plus important que lors du test précédent (16%). Concernant la comparaison de la stimulation par les versions mutées et sauvages des 3 peptides de 15 AAs, un des peptides mutés montre un signal 8x supérieur à celui obtenu avec la version sauvage ou avec les B-EBV non pulsés.

Ces résultats suggèrent une possible reconnaissance d'un antigène muté par un clonotype dominant de Treg dans une tumeur du sein à un stade très précoce alors que cela n'a été décrit qu'une seule fois chez un patient atteint d'un mélanome métastatique ¹⁷⁸.

Face à cette variabilité du signal, notre hypothèse est que l'épitope reconnu par ce TCR de Treg activé compris dans les séquences des différents peptides mutés testés, n'est pas correctement présenté lorsque nous pulsons les peptides sur les B-EBV autologues. Pour confirmer cette hypothèse, nous allons faire exprimer la protéine mutée entière par les B-EBV autologues afin de permettre un acheminement du peptide et une liaison à la molécule HLA de classe II plus physiologique.

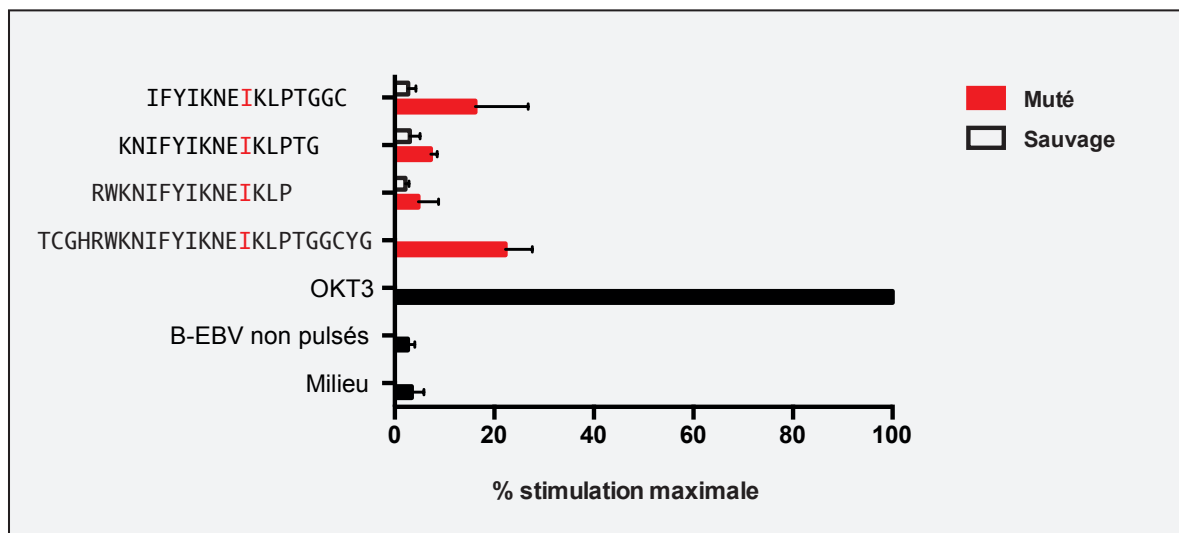


Figure 2.22. Comparaison de la stimulation par les peptides mutés et sauvages du TCR TregC1 de la patiente KOBE.

Moyennes et écarts-types des pourcentages de stimulation maximale des cellules 2D3 transduites avec le TCR du clonotype Treg activé dominant (TregC1) de la patiente KOBE (2 expériences indépendantes en triplicat). Incubation 4h à 37°C des B-EBV autologues avec chaque peptide à 10 μ M: versions mutées et sauvages pour les 15-mères, uniquement version mutée pour le précurseur de 25AAs. Ensuite ajout des cellules 2D3 pour une incubation d'une nuit à 37°C (ratio E:C de 1:2). Mesure de l'activation TCR par le pourcentage de cellules 2D3 GFP positives en cytométrie de flux. Contrôles positifs: 2D3 avec OKT3 insolubilisé (300 ng/mL). Contrôles négatifs: 2D3 avec milieu seul ou 2D3 avec B-EBV sans peptide (non pulsés). En rouge: acide aminé mutant pour la mutation N158I du gène *ITGA4*.

DISCUSSION

1. Résumé de nos résultats

Nous avons réalisé une analyse détaillée de la fonction et de la spécificité de lymphocytes T infiltrant des CCIS de haut-grade chez 17 patientes comprenant 7 CCIS purs et 10 lésions mixtes CCIS-CCI. Comme déjà décrit dans la littérature, ces CCIS, d'autant plus en présence d'un foyer invasif, contenaient plus de lymphocytes T CD4 et CD8 que les tissus mammaires normaux ou extra-tumoraux. Ces lymphocytes T formaient des agrégats répartis de manière hétérogène dans le stroma, essentiellement au pourtour des canaux tumoraux avec quelques-uns, surtout des CD8⁺, dans les canaux au contact des cellules épithéliales^{150,152}. Nous avons phénotypé ces lymphocytes T et mis en évidence des populations prédominantes dans le tissu tumoral comparé au tissu extra-tumoral. A notre connaissance, cela n'était pas décrit dans des cancers du sein précoces et luminaux. Dans la tumeur, en dehors de la tumeur ou dans du sein normal, la majorité des T CD8⁺ sont des T résidents des tissus (TRM) sur base de la co-expression CD103, CD69 et PD-1. Mais dans les tumeurs et pas en dehors, une petite partie de ces CD8 TRM expriment CD25. Il est possible que cette population contienne les T anti-tumoraux. Parmi les T CD4⁺, nous avons mis en évidence une population de Tregs activés (T CD4⁺CD25^{high}GARP⁺) présente uniquement dans les tissus tumoraux et de manière plus importante dans les lésions mixtes. Sur base d'analyses de répertoire TCR, nous avons montré qu'il y a peu de clonotypes CD8 amplifiés et enrichis dans la tumeur par rapport au tissu extra-tumoral et que cela s'accompagne dans certains cas de la présence de clonotypes Tregs activés amplifiés également.

Pour étudier la spécificité de ces clonotypes répétés, nous avons pu trier ces lymphocytes T une cellule par puits pour 14 patientes sur les 17. Pour l'instant, nous avons reconstruit et testé entre 1 et 5 TCR de CD8, et, entre 2 et 5 TCR de Tregs activés par patiente, incluant 6 patientes.

Les antigènes candidats ciblés étaient des mutations non synonymes faux-sens ou indels (entre 3 et 41 peptides mutés par patiente), le gène *NY-ESO-1* et la protéine HER2. Pour les TCR de CD8, les résultats sont tous négatifs. Par contre, nous avons détecté un signal positif contre un antigène muté pour le clonotype Treg activé prédominant de la patiente KOBE. Malgré un signal variable, il semblerait que cette reconnaissance soit spécifique de la mutation, qui plus est, elle est la 3^{ème} mutation la plus fréquente dans la tumeur.

2. Principales limites de notre travail

2.1. Taille et représentativité de la cohorte

Un petit nombre de patientes seulement ont été incluses dans notre étude, en partie à cause de la difficulté de repérer macroscopiquement les lésions *in situ* au sein du parenchyme mammaire. De ce fait, plus de la moitié des patientes ayant accepté de participer à l'étude ont été exclues suite à l'absence de tumeur dans les échantillons prélevés.

Nous n'avons pas de tumeurs triples négatives. Le sous-type moléculaire triple négatif est très rare au stade *in situ*, et au stade invasif celui-ci ne s'accompagne quasi pas d'une composante *in situ*^{118,189}. Or les tumeurs triples négatives, aussi bien au stade *in situ* qu'invasif sont parmi celles qui sont les plus infiltrées par des TILs¹⁵³. Les CCIS HER2⁺ sont plus fréquents au stade *in situ* qu'invasif et sont souvent de plus grande taille. Au stade invasif, les tumeurs HER2⁺ ont souvent une composante *in situ* plus importante¹⁸⁹. Au stade *in situ*, ce sont les tumeurs qui contiennent le plus de TILs¹⁵³. La majorité des CCIS sont de type luminal et contiennent souvent moins de TILs. Il est possible que les tumeurs *in situ* triples négatives, plus antigéniques, stimulent plus de réponses T CD8 anti-tumorales qui les éliminent. Si la réponse T est insuffisante, elle peut être amplifiée en bloquant PD-1. Ce serait la raison pour laquelle ces tumeurs répondent le mieux à l'immunothérapie par anticorps bloquant la voie PD-1.

Pour les tumeurs HER2⁺, qui peuvent en perdre l'expression quand elles passent au stade invasif, c'est peut-être suite à une réponse immunitaire anti-HER2.

Les tumeurs ER⁺, moins antigéniques et évoluant plus lentement, permettraient peut-être de faire basculer le micro-environnement immunitaire du côté immunosuppresseur.

2.2. Sélection des TCR d'intérêt

Même si nous devons encore analyser 4 patientes, pour l'instant nous n'avons pas mis en évidence de lymphocytes T CD8 spécifiques des cellules tumorales. De plus, seule une petite proportion de CD8 TRM exprime CD25, suggérant qu'il y a peu de T CD8 activés dans la zone tumorale. L'expression de CD39 par ces CD8 TRM CD25⁺ pourrait permettre de mieux distinguer les anti-tumoraux des TILs CD8 'bystander' décrits par Simoni et coll¹⁹⁰. En effet, ils ont observé dans d'autres cancers considérés comme plus immunogéniques que le cancer du sein, comme dans le poumon ou colon, que les T CD8 spécifiques d'antigènes mutés sont rares parmi les TILs, soit 0,18%, alors que la fréquence des anti-EBV, anti-CMV ou anti-influenza peut monter à 3,3%. Ces TILs bystanders expriment également CD103, CD69 et PD-1, et une faible proportion expriment CD25. Par contre, ils n'expriment pas CD39, contrairement au TILs

CD8⁺ anti-tumoraux qui l'expriment fortement. Mais une plus grande proportion de TILs CD8⁺ CD39⁺ expriment CD25 par rapport aux TILs CD8⁺ CD39⁻ ¹⁹⁰. Cela indique qu'il faut combiner plusieurs marqueurs de surface pour essayer de sélectionner les potentiels T CD8 anti-tumoraux.

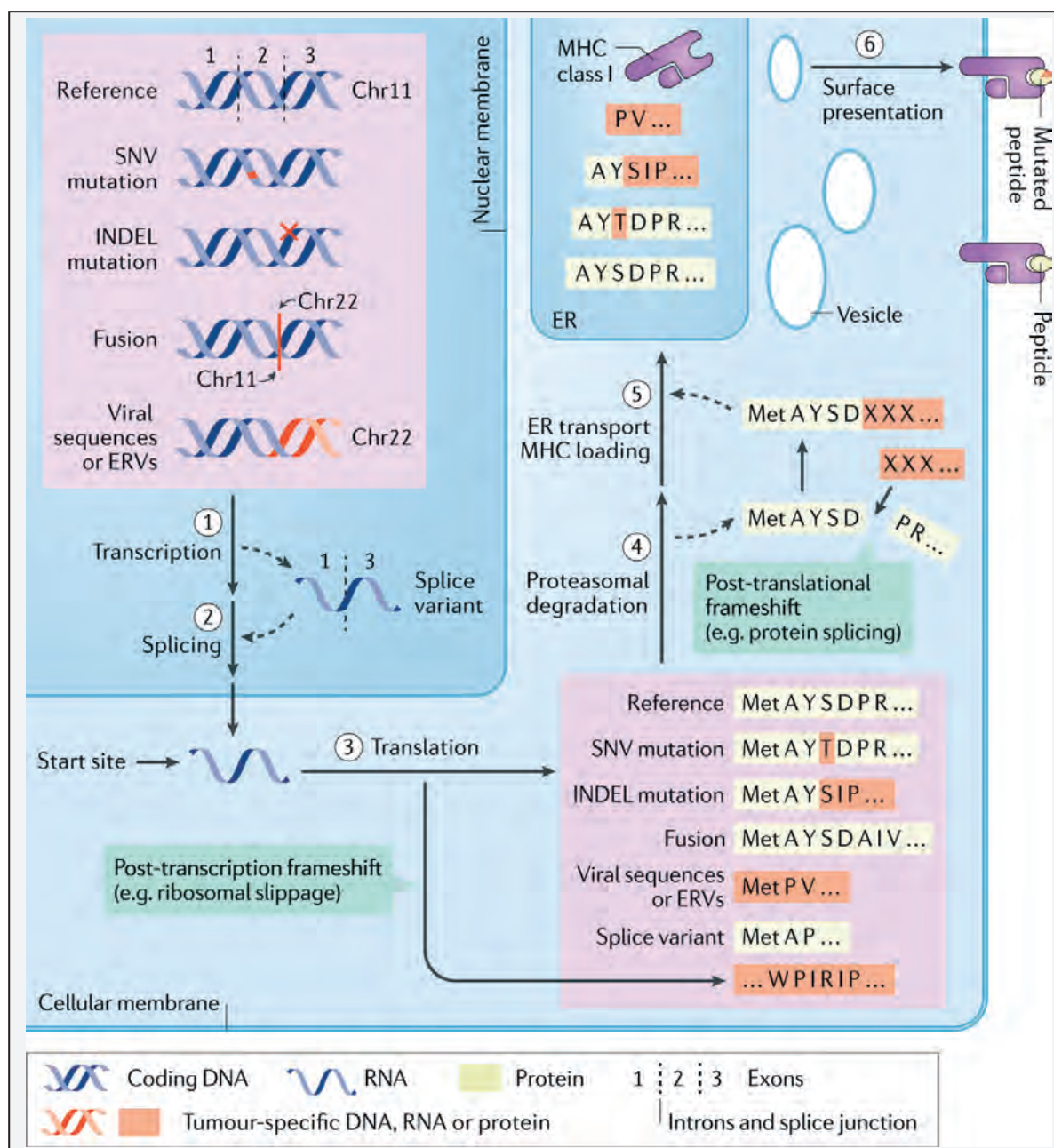
Sachant que dans nos échantillons moins de 1% des TILs CD8⁺ expriment CD25 et que nous avons trié environ 100 CD8 par tumeur, il est possible que nous n'ayons pas encore testé de TCR de CD8 TRM CD25⁺. Nous aurions dû trier plus de cellules, mais nous étions limités par le nombre de TILs extraits, ou être beaucoup plus sélectifs et ne prendre que des cellules CD25⁺. Mais le tri sur marqueurs d'activation dépend d'un processus dynamique qui nous échappe complètement, alors que les clones amplifiés persistent et peuvent peut-être être repérés plus longtemps après leur stimulation, même lorsque les marqueurs d'activation ne sont plus présents.

2.3. Sélection des antigènes candidats

Une autre limite évidente est la sélection d'antigènes candidats. Nous avons résolument opté pour des antigènes spécifiques de tumeurs, à l'exception de HER2. Mais nous n'avons testé que ce qui était prévisible.

Concernant les mutations somatiques non synonymes, nous avons fait synthétiser des peptides pour les mutations faux-sens et les indels qui sont les mutations les plus fréquentes ⁸⁴. Nous avons restreint la synthèse aux mutations dont le gène concerné était exprimé et dont l'algorithme NetMHCpan prédisait une liaison de forte affinité aux molécules HLA de classe I autologues. Le nombre de mutations détectées dépend de la couverture du séquençage d'exome, ici 50x. En majorant cette couverture, nous aurions sans doute détecté plus de mutations de faible fréquence mais peut-être intéressantes dans l'hypothèse où les cellules concernées ont été éliminées par des CTL. Cependant, dans le travail de David Schröder sur les CCI, les mutations reconnues avaient une fréquence allélique entre 11 et 17%, donc relativement fréquentes, avec une couverture moyenne du séquençage d'exome de 390x.

D'autres sources d'antigènes spécifiques des tumeurs, dont la provenance n'est pas restreinte aux parties codantes du génome, sont de plus en plus décrites et les outils bio-informatiques pour les détecter se développent. Il peut s'agir de variants d'épissage, de gènes de fusion, de rétrovirus endogènes, de molécules HLA elles-mêmes mutantes et de modifications post-traductionnelles ¹⁹¹. La Figure 3.1 issue de Smith et coll. 2019, illustre les mécanismes générant ces antigènes.



Les variants d'épissage sont des modifications post-transcriptionnelles provenant, par exemple, de mutations au niveau des sites d'épissage naturels, ou de rétention d'introns, ou de l'activation de promoteurs cryptiques dans des introns. Des antigènes de ce type reconnus par des CTL dans des mélanomes ont été décrits il y a plusieurs années ^{11,192}. Les antigènes issus de protéines de fusion ont surtout été étudiés dans les pathologies hématologiques. Les rétrovirus endogènes sont des séquences rétrovirales qui se sont insérées dans notre génome humain tout au long de l'évolution. L'expression de ces séquences survient suite à des dérégulations de la méthylation dans les cellules cancéreuses. Les variants d'épissage, les protéines de fusion et les rétrovirus endogènes peuvent générer des antigènes qui sont partagés par plusieurs tumeurs et donc intéressants dans le cadre d'immunisations. Des mutations HLA stimulant des réponses T spécifiques ont été décrites mais il n'a pas été démontré si c'est la mutation elle-même qui est reconnue ou si celle-ci favorise la présentation d'un antigène particulier ¹⁹¹. Dernièrement des techniques comme le Ribo-Seq (Ribosome profiling ou translatome, technique de séquençage d'ARNm protégés par les ribosomes) et de spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence plus de peptides antigéniques issus de modifications post-traductionnelles comme des traductions non canoniques de régions 5'UTR ou des épissages/fusion de peptides générant de nouveaux polypeptides ¹⁹³.

Nous avons testé la reconnaissance de HER2 seulement pour les tumeurs dont le score IHC était de 3+, signifiant une surexpression franche. Récemment, en clinique, parmi les CCI considéré comme HER2 négatifs, une nouvelle nomenclature a été proposée sur base d'une expression faible de HER2 (IHC1⁺ ou 2⁺ avec un test d'hybridation *in situ* négatif), ce sont les cancers 'HER2-low'. Des données de phases précoces d'études cliniques utilisant des thérapies ciblées anti-HER2 de nouvelle génération, principalement du trastuzumab couplé à des agents cytotoxiques, suggèrent un bénéfice pour ces patientes ¹⁹⁴. Les résultats de l'analyse translationnelle d'une étude de phase II sur un vaccin avec le peptide HER2 E75 (HER2₃₆₉₋₃₇₇ KIFGSLAFL sur HLA-A2) associé au GM-CSF, administré après les traitements adjuvants, ont montré que les patientes qui exprimaient peu la protéine HER2 (score IHC 1⁺ et 2⁺) présentaient les taux sanguins de T CD8⁺ anti-E75 les plus élevés, avec une diminution significative de la mortalité que chez les patientes IHC 1⁺ ¹⁹⁵. Par contre, l'étude de phase III comparant ce vaccin à un placebo+GM-CSF en traitement adjuvant chez des patientes HER2-low, n'a pas montré de différence significative de survie sans récidence ¹⁹⁶. Cependant une autre étude de phase II comparant {trastuzumab+vaccin E75 + GM-CSF} à {trastuzumab+GM-CSF} a montré un bénéfice chez les patientes avec un cancer du sein TN HER2-low ¹⁹⁴. Le groupe de

B. Czerniecki a publié plusieurs résultats intéressants d'études de phase I sur des vaccins à base de cellules dendritiques stimulées avec 6 peptides HER2 présentés sur des molécules HLA classe II et 2 peptides sur HLA-A2 et A3 (dont le peptide E75), injectés à des patientes avec des lésions de CCIS purs ou mixtes HER2⁺ (score IHC 2⁺ ou 3⁺) avant la chirurgie ¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Ils ont mis en évidence une majoration significative de T CD8⁺ spécifiques des peptides HER2 dans le sang des patientes, indépendamment du type de lésion ^{198,199}. Le taux de pCR était plus important chez les patientes avec un CCIS pur ¹⁹⁹. Dans un des articles, ils ont évalué l'effet de l'immunisation sur le niveau d'expression de HER2 en comparant les scores IHC avant et après vaccination : 5/27 patientes ont présenté une pCR (pas de tissu analysable), sur les 22 patientes restantes, 13 ont eu une diminution significative de l'expression HER2 dont 11 l'ont perdue complètement. Le plus intrigant est que les patientes avec les plus hauts niveaux d'expression avant immunisation ont moins bien répondu ¹⁹⁷.

A la lumière de ces éléments, il serait intéressant de tester contre HER2 des TCR reconstruits pour les tumeurs avec un score IHC 1⁺ ou 2⁺ afin de savoir si on n'observerait pas plus de réponses spontanées contre cet antigène quand l'expression est moins forte. Cela plaiderait pour une perte d'expression d'HER2 par immunosélection, pouvant favoriser la progression vers le stade invasif. Des expériences pour répondre à cette question sont en cours.

La condition idéale pour tester la spécificité des TCR reconstruits serait d'avoir les lignées tumorales autologues, ce qui reste impossible à partir de tumeurs du sein. Deux pistes méritent d'être évoquées. Scheper et coll. ont mis en place une stratégie d'analyse de la réactivité tumorale de TILs CD8⁺ similaire à la nôtre. A partir de 2 tumeurs primaires de l'ovaire et 2 du colon (non MSI⁺), ils ont trié en moyenne 94 cellules CD3⁺CD8⁺ par échantillon tumoral dont ils ont identifié le *TRA* et le *TRB* par single cell RNAseq. Ils ont reconstruit, de manière aléatoire, en moyenne 20 TCR par tumeur. Ils ont testé leur réactivité en mesurant la production d'IFN- γ par les cellules mTCR β ⁺ (les parties constantes α et β des TCR reconstruits sont murines) après 12-14h d'incubation avec des digestats tumoraux ou des organoïdes. Ils ont mis en évidence un signal positif pour un TCR dans une tumeur de l'ovaire et 5 TCR dans une tumeur du colon. Préalablement, ils avaient validé leur procédure à partir d'un mélanome et un signal positif pour 9 TCR sur 15 reconstruits. A nouveau, leurs résultats suggèrent qu'en dehors du mélanome, il y a probablement peu de TILs anti-tumoraux ²⁰⁰. Cependant, bien que leur stratégie ne permette pas de confirmer la spécificité tumorale, nous pourrions utiliser des digestats tumoraux comme test préliminaire de réactivité, et en cas de signal positif, confirmer par des analyses plus détaillées. Un autre point intéressant à relever dans leurs résultats est que

même en reconstruisant plus de TCR sans critère de sélection particulier, ils n'ont détecté un signal positif que dans 7,5% des cas concernant 2 patientes sur 4.

L'autre piste pour tester la spécificité de TCR reconstruits en limitant les biais de sélection des antigènes candidats est une technique développée dans notre laboratoire par deux doctorants, Orian Bricard et Walther Brochier. Brièvement, celle-ci consiste en l'élaboration d'une librairie d'ADNc à partir de l'ARNm tumoral en y insérant des séquences barre-codes (méthode Gibson Assembly) permettant d'amplifier les segments par PCR et de réaliser un séquençage à haut débit pour identifier la séquence potentiellement reconnue. Cette librairie d'ADNc est utilisée pour transduire des cellules 293T exprimant les HLA de la patiente qui sont ensuite incubées avec les cellules JURKAT-2D3 reportrices (NFAT-GFP). Le signal GFP positif est détecté en microscopie.

Cependant, aucune de ces deux pistes ne permettra de mettre en évidence des TILs CD8⁺ spécifiques des cellules tumorales dont l'antigène n'est plus présent dans la tumeur car les cellules tumorales l'exprimant ont été détruites.

3. Antigènes tumoraux reconnus par des Tregs

Nous avons détecté une population de Tregs activés (T CD4⁺CD25^{high}GARP⁺) chez 11 des 17 patientes de notre cohorte (64,7%) : 3/7 dans le groupe A (CCIS purs), 4/5 dans le groupe B (mixte à prédominance *in situ*) et 4/5 dans le groupe C (mixtes à prédominance invasive). Nous en avons trié pour des analyses scRNAseq à partir des 5 tumeurs avec les fréquences de Tregs activés les plus élevées. La Table 3.1 reprend pour chaque patiente la proportion de Tregs activés parmi les T CD4⁺ déterminée par cytométrie de flux, le nombre de ces cellules triées, la fréquence du clonotype prédominant sur base de l'analyse répertoire et le nombre de TCR reconstruits. Nous avons détecté cette population dans tous les types de lésions tumorales mais plus dans les lésions mixtes. Parmi les 5 patientes pour lesquelles nous avons assez de cellules pour le tri, 4 sont dans le groupe B et 1 dans le groupe C. Les 5 premiers clonotypes de 3 de ces patientes remplissaient les critères pour la reconstruction TCR : KOBE, KYLO et NOTT pour lesquelles le clonotype prédominant a une fréquence entre 12 et 13%.

Table 3.1. Populations de Tregs activés dans les tumeurs *in situ*

Type de lésion tumorale	Groupe A							Groupe B					Groupe C				
Code Patient	BIFI	LOKI	OJEC	ORBI	RAFI	RUBI	ULDA	DALA	FETU	JORD	KOBE	KYLO	ELID	NOTT	POCA	RIND	ROKY
Treg activés parmi les CD4 (%)	0,0	1,8	0,8	1,2	2,9	0,2	0,4	0,3	2,7	3,9	5,7	7,5	2,4	7,0	2,3	0,0	2,3
Nbre Tregs activés triés	0	0	0	0	0	0	0	0	96	72	96	192	0	48	0	0	0
Freq clonotype TOP1 (%)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3,2	2,9	12	13	NA	13	NA	NA	NA
Nbre de TCR reconstruits	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	5	5	NA	2	NA	NA	NA

NA: Non attribuable

Parmi les 12 TCR déjà reconstruits, nous avons testé la spécificité des 5 TCR de la patiente KOBE et 4 de la patiente KYLO. Nos résultats suggèrent fortement la présence d'une reconnaissance spécifique d'un antigène muté par le TCR du Treg prédominant de KOBE. Ce serait la première fois qu'un clone Treg contre un antigène muté dans une tumeur précoce du sein est décrit. De manière globale, la spécificité antigénique des Tregs présents dans les TILs humains est peu connue. Récemment, le groupe de Rosenberg a étudié la spécificité de TCR de Tregs extraits de mélanomes métastatiques de 3 patients. Ils ont reconstruit entre 6 et 11 TCR par tumeur parmi les plus fréquents. Ils ont testé leur spécificité contre des peptides mutés de 25 AAs en mesurant la production d'IFN γ en ELISA et l'expression d'un marqueur d'activation (CD137 ou 4-1BB) par cytométrie de flux. Ils ont détecté un signal positif pour 1 TCR pour 2 patients et confirmé la reconnaissance spécifique de la mutation en comparant au peptide sauvage pour un des deux TCR. Leurs résultats suggèrent que des Tregs infiltrant des tumeurs et amplifiés localement reconnaissent spécifiquement des antigènes tumoraux mutés ¹⁷⁸.

Avant eux et également dans le mélanome, deux groupes avaient mis en évidence des Tregs spécifiques d'antigènes de type MAGE (LAGE-1 et MAGEA3) ^{201,202}.

Dans le cancer du sein, le groupe de Rudensky a comparé le phénotype de Tregs extraits de CCI à ceux extraits du tissu mammaire normal et ceux du sang. Il semblerait que ceux extraits des tumeurs aient un profil activé contrairement à ceux des deux autres compartiments tissulaires ²⁸. D'autres auteurs ont montré à partir des données TCGA que les CCI ER⁺ avec une mutation *PIK3CA* présentaient un enrichissement dans une signature génique TGFβ comparé aux tumeurs non mutées ¹²⁸. Ceci pourrait être un signe indirect de l'activation de Tregs préférentiellement dans ces tumeurs. Parmi nos 5 patientes ayant les taux les plus élevés de Tregs activés, 3 ont une mutation *PIK3CA* (KOBÉ, KYLO, FETU). Par contre, jusqu'à présent, nos tests n'ont pas mis en évidence de reconnaissance de cette mutation par des TCR de Tregs activés.

L'ensemble de ces résultats et les nôtres suggèrent que les Tregs seraient capables de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales et s'activer, pouvant donc inhiber les CTL aux alentours. Est-ce que ces Tregs proviennent de Tregs circulants (thymiques ou naturels) ou bien sont-ils induits (iTregs) localement à partir de T conventionnels (Tconv) ? Le groupe de Rudensky dans le cancer du sein et le groupe de Rosenberg dans le mélanome ont comparé les répertoires TCR de Tregs et Tconv extraits de tumeurs: il semblerait qu'il y ait peu de partage entre ces deux populations allant contre l'hypothèse des iTregs ^{28,178}.

4. Immunosurveillance de la glande mammaire

Une de nos premières constatations en comparant le phénotype des T extraits des tumeurs par rapport à ceux extraits du tissu mammaire normal (provenant de réduction mammaire à visée esthétique ou prophylactique) fut que la majorité des T CD8⁺ du tissu normal portent également les marqueurs d'activation CD69 et PD-1 et de résidence tissulaire CD103. Mais ils sont présents en moins grande quantité, en accord avec Savas et coll. ¹⁷⁶. Contrairement aux T CD8⁺ des CCIS, ils sont localisés essentiellement dans les canaux galactophores, au contact des cellules épithéliales ¹⁵⁰. De plus, nos analyses de répertoire TCR β ont montré qu'il y avait également des clonotypes CD8 fortement répétés dans le tissu extra-tumoral, qu'on ne retrouve pas toujours parmi les clonotypes les plus fréquents de la tumeur ni dans le sang (contrairement au probable T anti-viraux).

Le rôle et la spécificité des T CD8⁺ dans le tissu mammaire normal ne sont pas connus. Certains auteurs ont décrit la présence d'un microbiote au sein du parenchyme mammaire normal et mis en évidence des différences de composition entre des patientes atteintes d'un cancer du sein et des patientes saines ^{203,204}.

Il a été constaté que les lobules mammaires normaux des patientes ayant eu une mastectomie prophylactique étaient plus infiltrés par des lymphocytes T que les lobules normaux d'échantillons de réduction mammaire ²⁰⁵.

Des anomalies génétiques telles que mutations ou délétions alléliques *TP53*, perte d'hétérozygotie, méthylation de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*, *BRCAl*, *CDKN2A*) et raccourcissements des télomères, ont été détectées dans des tissus mammaires normaux sans cellules tumorales détectées ²⁰⁶. Des mutations *TP53* et *PIK3CA* sont retrouvées dans le tissu normal adjacent à une lésion tumorale ¹²⁸.

Le rôle potentiel de ces lymphocytes T serait l'immunosurveillance de la glande mammaire contre des agents infectieux et la prolifération de cellules au génome altéré. Cependant, il reste à savoir quels antigènes sont reconnus et si ceux-ci sont spécifiques du tissu mammaire.

5. Conclusions et perspectives

Bien que nous n'ayons pas encore de résultats pour l'ensemble de notre cohorte, il semblerait que les carcinomes canalaire du sein ne soient pas plus immunogéniques au stade *in situ* qu'au stade invasif, en tout cas en ce qui concerne les sous-types luminaux. Pour ces sous-types d'évolution plutôt lente, il se peut que les réponses T CD8⁺ spécifiques de cellules tumorales soient présentes à un stade encore plus précoce. En effet, on constate déjà une majoration de l'infiltration des lobules par les T CD8⁺ dans des pathologies bénignes du sein ¹⁶⁴. Les CCIS seraient alors déjà le résultat d'une immunosélection. De plus en plus de données dans la littérature ainsi que la mise en évidence d'une population de Tregs activés dans la plupart de nos échantillons, même au stade *in situ* pur, suggèrent la présence d'un micro-environnement plutôt immunosuppresseur. Il semblerait que ces Tregs soient eux-mêmes capables de reconnaître les cellules tumorales. Le groupe de S. Lucas a combiné un anticorps anti-GARP:TGFβ1 à un anti-PD-1 dans un modèle murin de carcinome du colon. L'ajout de cet anticorps augmente l'activité anti-tumorale de l'anti-PD-1 en augmentant les capacités effectrices des T CD8⁺ anti-tumoraux sans majorer leur nombre ni éliminer les Tregs ²⁰⁷. Une étude clinique de phase I avec l'anti-GARP:TGFβ1 seul ou combiné à l'anti-PD-1 a été initiée dans des cancers avancés dont les cancers du sein triples négatifs (NCT03821935). Il serait intéressant de tester cette combinaison également dans des cancers du sein ER⁺ ne répondant pas aux anticorps bloquant la voie PD-1 seul, et ce en situation néo-adjuvante.

MATERIEL ET METHODES

1. Patientes et échantillons

Des patientes présentant un CCIS de haut grade pur ou associé à un CCI traitées par mastectomie et n'ayant pas reçu de traitement néo-adjuvant ont été sélectionnées pour cette étude. Les critères d'inclusion et d'exclusion sont détaillés dans la Figure 2.1. Sept patientes ayant bénéficié d'une réduction mammaire à visée esthétique ou prophylactique (mutations germinales *BRCA1/2*) ont été incluses dans cette étude afin d'avoir du tissu mammaire normal comme contrôle. Toutes les patientes ont été opérées aux Cliniques universitaires Saint-Luc de Bruxelles (CUSL) et ont signé un consentement éclairé pour la collecte des échantillons tissulaires et de sang. Cette étude académique a été approuvée par le Comité d'Ethique Hospitalo-Facultaire Saint-Luc – UCLouvain sous le nom Etude BreasTIL (numéro d'enregistrement Belge : B403201834745). Les échantillons tissulaires ont été obtenus à partir de matériel résiduel frais en post-opératoire immédiat et transportés au laboratoire dans une boîte de Petri sur glace. Une partie a été utilisée immédiatement pour l'extraction des lymphocytes vivants, une partie a été congelée en OCT pour extraction ADN ou ARN et une partie a été fixée et enrobée en paraffine (FFPE) pour les analyses histologiques et immunohistochimiques. Si la dissociation mécanique de la partie fraîche ne pouvait pas être réalisée directement, le tissu a été découpé en petits morceaux de ± 1 mm de côté et ceux-ci conservés à 4°C dans du milieu X-VIVO 10 (Lonza) pendant maximum 24h. Le sang a été prélevé le jour de l'opération avant l'anesthésie par ponction veineuse et collecté dans 5 tubes de 8 ml (BD Vacutainer CPT Ficoll et citrate de sodium) pour isoler les cellules mononucléées (PBMCs).

2. Extraction des PBMCs et des lymphocytes infiltrant les tissus

Les PBMCs autologues ont été extraits suivant le protocole du fournisseur et une partie (10^6 cellules) utilisée directement pour l'analyse par cytométrie de flux, l'autre partie étant congelée dans du Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco) + 10% de sérum humain (HS), L-Glutamine 1x (GlutaMAX 100x, Gibco), Peniciline-Streptomycine 1x (Sigma-Aldrich), GPS en abrégé, et 10% DMSO (Carl Roth). Le HS a été produit localement à partir de plasma de patients hémochromatosiques. Les PBMCs allogéniques servant de contrôles lors des analyses en cytométrie de flux ont été isolés à partir de sang de patients hémochromatosiques par un gradient de densité (Lymphoprep, Axis-Shield). Une partie a été congelée immédiatement en IMDM 10% HS 10% DMSO tandis que l'autre partie a d'abord été restimulée *in vitro* pendant 24h avec un anticorps anti-CD3 (300 ng/mL) insolubilisé (Clone OKT3, Bio X Cell). Les

lymphocytes infiltrant les tissus ont été extraits après dissociation mécanique sans enzymes des échantillons selon le protocole de Garaud et coll. ²⁰⁸. Brièvement, les échantillons tissulaires ont été pesés puis lavés 3x en PBS, découpés en morceaux de 1 mm de côté et mis dans 4 ml de X-VIVO 10. Ils ont été dissociés mécaniquement dans le GentleMACS Dissociator (Miltenyi) avec 2 séquences du programme A.01, transférés dans un tube de 50 ml à travers un filtre de 40 μ m. Le tube de dissociation a été lavé avec 3 ml de X-VIVO 10 ajoutés aux 4 ml précédents à travers le filtre. Le procédé a été répété en lavant le filtre retourné par-dessus le tube de dissociation pour récupérer les morceaux restants. La suspension cellulaire a été portée à 50 mL avec du PBS-EDTA 2 mM (EDTA Ultrapur 0,5 M, Invitrogen) +1%HS (tampon de marquage pour la cytométrie de flux) et centrifugée à 300 g à 4°C pendant 5 min. Le surnageant a été aspiré en laissant les 5 derniers mL qui sont ensuite resuspendu avec 10 ml de PBS-EDTA 2 mM +1%HS, transférés dans un tube de 15 mL et centrifugés à 300 g à 4°C. Le surnageant a été aspiré complètement, le culot cellulaire resuspendu dans 1 mL de PBS-EDTA 2 mM +1%HS et compté au bleu Trypan (Sigma-Aldrich) Toutes les cellules ont ensuite été marquées avec notre panel d'anticorps pour l'analyse en cytométrie de flux.

3. Cultures cellulaires

La lignée de lymphocytes B autologues transformés par EBV (lignée B-EBV) a été générée pour chaque patiente à partir de 5.10^6 PBMCs infectés avec le virus d'Ebstein-Barr (EBV, souche B95.8) en présence de la lignée cellulaire de souris 3T6 transfectée de manière stable avec CD40L. Les B-EBV sont cultivées en IMDM +10% de sérum bovin fœtal (FBS, Sigma-Aldrich) + GPS et congelées en ajoutant 10% de DMSO.

Les cellules JURKAT 2D3 (NFAT-GFP) nous ont été aimablement fournies par le Pr K. Thielemans de la Vrije Universiteit Brussel. Ces cellules sont issues d'un clone Jurkat E6.1 ayant perdu l'expression des deux chaînes de TCR et transduites avec une construction hCD8a-E2A-hCD8 β . Elles ont ensuite été transduites avec une construction NFAT-GFP ²⁰⁹. Elles sont cultivées en RPMI 1640 (Gibco) +10% FBS +GPS.

Le clone CTL VEMI JVE672 6.10/8 reconnaissant le peptide HER2₃₆₉₋₃₇₇ E75 (KIFGSLAFL) présenté sur HLA-A2 a été obtenu au laboratoire en 2002 par stimulation de PBMC avec le peptide antigénique, clonage puis validation par un marquage tétramère. Deux semaines avant le contrôle des tests de stimulation avec les pools de peptides HER2, le clone a été décongelé et stimulé avec des B-EBV HLA-A2 irradiés et incubés avec le peptide E75, en présence de

PBMCs allogéniques ‘feeder’ irradiés, rhIL-2 (Novartis) et rhIL-7 (Miltenyi) dans du milieu IMDM +10% HS +GPS.

Les cellules JURKAT exprimant un TCR reconnaissant le peptide NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ SLLMWITQC sur HLA-A2 nous ont été données par P. van der Bruggen et proviennent de l'Institut Ludwig de Lausanne. Elles expriment une construction NFAT-RFP (red fluorescent protein) et sont cultivées en RPMI 1640 +10% FBS + GPS.

4. Immunohistochimie

A partir des prélèvements FFPE en miroir des zones tumorale et extra-tumorale d'un même sein ainsi qu'à partir des prélèvements de tissus mammaires normaux provenant des deux seins des patientes contrôles, des coupes sériées de 4 µm ont été marquées avec les anticorps dont les caractéristiques sont reprises dans la Table 4.1. En plus de la lame en miroir colorée en hématoxyline et éosine (HE) réalisée immédiatement pour confirmer la présence de cellules tumorales dans l'échantillon tumoral et l'absence dans l'échantillon extra-tumoral, deux autres lames HE ont été réalisées avec la première et la dernière coupe de la série pour vérifier la présence de canaux galactophores. Les marquages ont été effectués par le laboratoire d'anatomo-pathologie des CUSL. Les marquages contrôles positifs et négatifs ont été faits sur des coupes d'amygdale. L'évaluation des proportions des différentes populations de cellules immunitaires, détaillée dans les résultats, a été réalisée avec l'aide du Dr Mieke Van Bockstal, anatomo-pathologiste responsable de la pathologie mammaire des CUSL. L'expression des récepteur hormonaux ER et PR a été déterminée sur base du score d'Allred ²¹⁰. L'indice de prolifération Ki67 a été déterminé en calculant le pourcentage de noyaux tumoraux positifs pour ce marqueur et un cutt-off à 14% a été choisi pour distinguer les tumeurs Luminal B ($\geq 14\%$) des Luminal A ($< 14\%$) ¹⁵³. Le score HER2 a été réalisé en appliquant les dernières recommandations ASCO 2018 ¹⁸³.

A partir des fragments tumoraux congelés en OCT, des coupes de 7 µm ont été réalisées au début, au milieu et à la fin des 30 coupes de 25 µm qui ont servi à l'extraction du matériel génétique. Après coloration HE, une estimation du pourcentage de cellules tumorales a été effectuée avec l'aide du Dr Sophie Pirenne, assistante en anatomo-pathologie du sein.

Table 4.1: Liste des anticorps monoclonaux utilisés pour les analyses immunohistochimiques

Antigène	Firme	Référence	Clone	Espèce	Dilution	Protocole 'HIER '	Incub. Ac. Prim. (min)	Ac. secondaire
CD3	Thermo Scientific	RM-9107-S	SP7	Lapin	1/100	CC1 - 36 min	52	UltraView DAB detection kit
CD8	Dako	M7103	C8/144B	Souris	1/24	CC1 - 64 min	32	UltraView DAB detection kit
CD20	Biocare Medical	CM004C	L26	Souris	1/200	CC1 - 36 min	72	UltraView DAB detection kit
FOXP3	Cell Signaling Technology	983775	D2W8E	Lapin	1/50	CC1 - 64 min	60	OptiView
CD68	Dako	M0876	PGM1	Souris	1/40	CC1 - 36 min	32	UltraView DAB detection kit
ER	Ventana Roche	790-4324	SP1	Lapin	RTU	CC1 - 36 min	32	UltraView DAB detection kit
PR	Ventana Roche	790-2223	1E2	Lapin	RTU	CC1 - 64 min	32	UltraView DAB detection kit
HER2	Ventana Roche	790-2991	4B5	Lapin	RTU	CC1 - 36 min	32	UltraView DAB detection kit
Ki67	Dako	M7240	MIB-1	Souris	1/90	CC1 - 64 min	32	UltraView DAB detection kit

RTU: ready-to-use, HIER : Heat-Induced Epitope Retrieval, CCI: carcinome canalaire infiltrant, Ac: Anticorps, Incub: Incubation

5. Cytométrie de flux et tri cellulaire

La Table 4.2 reprend la liste des anticorps utilisés en cytométrie de flux. Les marquages ont été réalisés dans 50 à 500 μ L de PBS-EDTA 2 mM +1% HS pendant 30 min à 4°C. Les tris de lymphocytes extraits des tissus et de JURKAT-2D3 transduites avec les TCR reconstruits ont été réalisées sur un FACS Aria III (BD Bioscience). L'option Index Sort a été ajoutée lors du tri des lymphocytes T infiltrant les tissus.

L'acquisition des données pour la vérification de l'expression des TCR reconstruits et les tests de reconnaissance antigénique par les JURKAT-2D3 ont été réalisés sur un LSR Fortessa (BD Bioscience). Toutes les analyses ont été effectuées avec FlowJo.10.6.1 (BD Bioscience).

Table 4.2: Liste des réactifs utilisés en cytométrie de flux

a) Tri des lymphocytes infiltrant les tissus

Antigène	Fluorochrome	Firme	Reference	Clone	Isotype	Conc. (µg/mL)	Dilution
CD3	FITC	BioLegend	300406	UCHT1	mIgG1,k	300	1/200
CD4	BV510	BioLegend	300546	RPA-T4	mIgG1,k	50	1/30
CD8	PEdazzle594	BioLegend	301057	RPA-T8	mIgG1,k	50	1/300
CD14	APC-Cy7	BioLegend	325620	HCD14	mIgG1,k	400	1/300
CD56	PE/Cy7	BioLegend	362510	5.1H11	mIgG1,k	100	1/200
CD16	PerCP/Cy5.5	BioLegend	302028	3G8	mIgG1,k	200	1/200
CD19	BV650	BioLegend	302238	HIB19	mIgG1,k	50	1/200
CD25	BV785	BioLegend	302638	BC96	mIgG1,k	70	1/50
CD69	AF647	BioLegend	310918	FN50	mIgG1,k	200	1/100
GARP	PE	BioLegend	352504	7B11	mIgG2b,k	50	1/50
PD-1	BV421	BioLegend	329920	EH12.2H7	mIgG1,k	50	1/50
CD103	BV711	BioLegend	350222	BerACT8	mIgG1,k	50	1/100
Live-Dead	FVD780	Invitrogen	65-0865-14	-	-	-	1/1000

b) Vérification de l'expression TCR post-infection et tri des 2D3-Jurkat transduites

TCRab	APC	BioLegend	306718	IP26	mIgG1,k	100	1/100
-------	-----	-----------	--------	------	---------	-----	-------

c) Test de reconnaissance antigénique

CD3	BV421	BioLegend	300434	UCHT1	mIgG1,k	50	1/100
CD19	APC	BioLegend	302212	HIB19	mIgG1,k	50	1/100

Conc.: Concentration, FVD: Fixable viability dye, FITC: Fluorescein isothiocyanate, BV: Brillant violet, PE: phycoerythrin, APC: Allophycocyanin, PerCP: Peridinin-Chlorophyll-protein, AF: Alexa-Fluor, m: mouse, k: kappa

6. Extraction ARN et ADN

Les fragments tumoraux congelés et enrobés en OCT ont été coupés avec un CryoStar NX70 (Thermo-Fischer) avec en moyenne 30 coupes de 25 μm . ADN et ARN ont été isolés par gradient de césium. Brièvement, les coupes ont été lysées dans 1,5 mL d'isothiocyanate de guanidine 4 M puis centrifugées 10 min à 4°C à 10 000 g. Le surnageant a été déposé sur 1 mL de CsCl 5,7 M et centrifugé 16h à 41 000 g à 20°C. Le GITC de la partie supérieure du gradient a été éliminé et la partie intermédiaire contenant l'ADN dans le CsCl transférée dans un tube de 2 mL. Le culot d'ARN a été resuspendu dans 350 μL du tampon de lyse LBP du kit NucleoSpin RNAPlus (Machery-Nagel) et purifié en suivant le protocole du fournisseur. Pour l'ADN, 500 μL d'éthanol ont été ajoutés à la fraction ADN/CsCl avant transfert sur une colonne de silice du kit NucleoSpin gDNA Tissue (Machery-Nagel). L'ADN a ensuite été lavé et resolubilisé en suivant les recommandations du fournisseur.

L'ADN non tumoral a été extrait à partir d'environ 5.10^6 PBMCs ou B-EBV en suivant le protocole du kit NucleoSpin gDNA Tissue (Machery-Nagel).

L'ARN a été conservé à -80°C et l'ADN à -20°C.

7. Séquençage de l'exome (WES : whole-exome sequencing)

Pour chaque patiente, environ 1,5 μg d'ADN tumoral et normal ont été utilisés pour la capture d'exons avec le kit SureSelect XT V7 (Agilent). Après fragmentations et amplifications, des adaptateurs ont été ajoutés pour un séquençage Illumina 'paired-end' (2x150 pb) et une couverture moyenne de 50X (Macrogen, Seoul, Corée du Sud). Les analyses bio-informatiques ont été réalisées par Orian Bricard et Nicolas Van Baren en suivant les recommandations du Broad Institute. Brièvement, les données FASTQ des échantillons tumoraux et normaux ont été alignées sur le génome de référence GRCh38 avec BWA-MEM v07.17, générant des fichiers BAM après tri, conversion, compression et indexations par SAMtools v1.9. Ces séquences alignées ont ensuite subi plusieurs corrections comme la suppression des duplicats (GATK v4.1.8.1, MarkDuplicates) et la réattribution d'un score de qualité de séquençage pour chaque base (GATK v4.1.8.1, BaseRecalibrator). Ensuite les séquences normales et tumorales ont été comparées pour identifier les mutations somatiques de la tumeur avec Mutect2, VarScan2 et Strelka2 comme expliqué dans les résultats. Celles-ci ont été annotées par Funcotator avec la fonction 'BestEffect' pour prédire l'effet fonctionnel sur la protéine.

8. RNAseq

Un RNAseq tumoral a été effectué pour 12 patientes. L'ARNm tumoral a été purifié à partir de l'ARN avec le kit TruSeq Stranded mRNA en utilisant le protocole 'low-input' (≤ 700 ng ARN total). Les ADNc ont été fragmentés, amplifiés et ligués aux adaptateurs pour séquençage Illumina en 'paired-end' (2x150 pb) et 30 millions de reads par échantillon (Macrogen, Séoul, Corée du Sud). L'analyse bio-informatique a été réalisée par Nicolas Van Baren. Les reads ont été alignés sur GRCh38 avec Rsubread v2.4.2 et la fonction subjunc qui identifie et quantifie les sites d'épissage. Le nombre de reads pour chaque gène a été quantifié par featureCounts dans Rsubread. Ces valeurs ont été normalisées en TPM (Transcript per Kilobase Million): le nombre de reads pour un gène est divisé par la longueur du gène en kb et par la somme de toutes ces valeurs de l'échantillon divisée par 1 million. Les gènes ont été annotés en utilisant les références de Ensembl.

9. Répertoires TCR

Les répertoires TCR des tissus tumoraux et extra-tumoraux ont été obtenus à partir des données de 'single cell RNAseq' (sc-RNAseq). Le protocole de séquençage du transcriptome de T triés à une cellule par puit a été adapté du protocole SmartSeq2²¹¹ par Orian Bricard et décrit en détails dans son travail de thèse disponible publiquement. Brièvement, l'ARNm de chaque cellule a été retro-transcrit en ADNc avec un oligo-dT présent dans le tampon de lyse dans lequel les cellules ont été triées. Durant la réaction de rétro-transcription, un second oligonucléotide (template switch oligonucleotide TSO) comprenant 2 bases riboG et 1 base ARN 'bloquée' G, est ajouté à l'extrémité 3' de l'ADNc. Ce dernier est ensuite amplifié puis fragmenté par la Tn5 transposase qui ajoute des adaptateurs pour une amplification par PCR. Cette dernière amplification ajoute les index de séquençage Illumina. Les librairies individuelles sont regroupées et séquencées avec une couverture de 1 million de reads par cellule (Macrogen). Pour déterminer les séquences CDR3 des *TRA* et *TRB* à partir des données brutes, les fichiers FASTQ ont été analysés avec Mixer v2.1.8. Ensuite un script R développé localement par Orian Bricard associe chaque CDR3 à un identifiant de clonotype et d'autres annotations expérimentales de séquençage et de cytométrie puis génère une table avec l'ensemble de ces informations pour chaque cellule de chaque patiente. L'analyse des répertoires TCR à partir de cette table est expliquée dans les résultats et dans la Table 2.1.

Les répertoires TCR du sang ont été obtenus à partir de librairies d'ADNc de PBMCs autologues selon un protocole développé dans notre laboratoire utilisant le même principe de

rétro-transcription incluant un oligonucléotide TSO. Contrairement aux bibliothèques réalisées avec le protocole sc-RNAseq, un barcode a été inséré dans l'oligo-dT pour déterminer la fréquence des clonotypes identifiés en faisant le rapport du nombre d'UMI différents sur le nombre de reads totaux couvrant une séquence unique CDR3. Le séquençage Illumina a été réalisé en 'paired-end' (2x250 pb) avec 300 000 reads par échantillon (IREC, UCL).

10. Typage HLA classe I et II

Pour les patientes pour lesquelles des TCR ont été reconstruits, un typage HLA de classe I et II a été réalisé par le laboratoire de biologie moléculaire des CUSL à partir de B-EBV. Les allèles sont identifiés par séquençage Illumina avec le kit NGSgo (GenDX) qui comprend un ensemble d'oligonucléotides spécifiques des différents gènes HLA. L'interprétation des résultats a été réalisée par le Prof. Latineavec NGSengin (GenDx) IMGT v3.37 (International ImMunoGeneTics).

11. Peptides

Les peptides utilisés seuls dans les tests de stimulation ont été synthétisés sans purification ('crude') par GeneCust (Boynes, France) ou GenScript (Leiden, Pays-Bas) ou localement par V. Stroobant (Institut Ludwig, Bruxelles). Ils ont été resuspendus à 10 mM dans du DMSO puis aliquotés et conservés à -20°C.

Les pools de peptides commerciaux NY-ESO-1 et HER2 purifiés à plus de 70% ont été achetés chez JPT Innovative Peptide Solution (Berlin, Allemagne), resuspendus en DMSO, dilués à 1,5 µM dans du RPMI 1640, aliquotés puis conservés à -80°C.

12. Reconstruction de séquences *TRA* et *TRB*

Le protocole de reconstruction des TCR a été développé dans le laboratoire par Orian Bricard et décrit en détails dans son manuscrit de thèse. Il dérive de celui du groupe de R.A. Morgan^{212,213}, basé sur la co-expression par un vecteur lentiviral des séquences *TRA* et *TRB* dans un même cadre de lecture, séparées par un peptide auto-clivant P2A. Brièvement, à partir de l'ADNc amplifié lors de la réalisation de la bibliothèque sc-RNAseq d'un lymphocyte du clonotype d'intérêt, les séquences allant des régions variables *TRAV* et *TRBV* jusqu'au début des régions constantes *TRAC* et *TRBC* sont amplifiées par PCR avec des oligonucléotides contenant des sites de restriction de type IIS (qui coupent x nucléotides après la séquence reconnue). Les amplicons *TRB*, *TRA*, et un amplicon avec le reste de la séquence *TRBC* sont digérés puis ligués

dans pcDNA3.1 contenant le reste de la séquence *TRAC*. Le transgène complet *TRB-P2A-TRA* est ensuite coupé et transféré dans un vecteur lentiviral en aval d'un promoteur EF-1 (pLenti-EF1). Les plasmides sont amplifiés dans *E. Coli* TOP10 (Thermo-Fischer) puis purifiés avec le kit Miniprep (Promega).

13. Expression des TCR d'intérêt par les JURKAT-2D3 (NFAT-GFP)

Les particules lentivirales ont été produites en transfectant des cellules HEK293T avec les plasmides pLenti-EF1-TRB-P2A-TRA, psPAX2 (Addgene, #12260) et pCMV-VSV-G (Addgene, #8454). Les plasmides ont été transfectés dans $1,5 \cdot 10^6$ HEK293T par puits dans des plaques M6 à fond plat avec le réactif TransIT-LT1 (Mirus, MIR-2304) dans 2,5 mL de IMDM 10% FBS + GPS selon les recommandations du fournisseur. Le surnageant viral a été collecté après 72h, filtré sur PVDF de 0,45 μm et concentré 20x en Vivaspin 6 (Sigma-Aldrich). Des JURKAT-2D3 préalablement traitées au polybrène (EMD Millipore) ont été ensemencées à 100 000 cellules par puits dans des plaques M96 à fond plat dans du RPMI 1640 10% FBS +GPS, infectées avec plusieurs dilutions du surnageant viral concentré et centrifugées à 800 g pendant 30 min à 30°C. Les cellules ont été incubées pendant 24h puis lavées 3x en RPMI 1640 10% FBS +GPS. L'expression du TCR en surface a été validée en cytométrie de flux 3 à 5 jours après l'infection et une population exprimant fortement le TCR a été triée 10 à 14 jours après l'infection.

14. Test de reconnaissance antigénique

Le protocole des tests de reconnaissance antigénique est détaillé dans les résultats et illustré dans la Figure 2.17. Brièvement, dans des plaques M96 à fond rond, les B-EBV autologues ont été incubés dans du RPMI 1640 1% FBS +GPS pendant 4h à 37°C avec chaque peptide seul à 10 μM ou en pool à 750 nM (concentration recommandée par la firme). Les cellules effectrices JURKAT-2D3 ont été rajoutées à un ratio T:B de 1:2 et incubées pendant une nuit à 37°C. Comme contrôles positifs, les JURKAT-2D3 ont été stimulées avec un anticorps anti-CD3 insolubilisé à 300 ng/mL (Clone OKT3, Bio X Cell) ou un anticorps bispécifique anti-CD19/anti-CD3 soluble à 10 ng/mL (Blinatumomab, Invivogen). Comme contrôles négatifs, nous les avons incubées avec du milieu seul (RPMI 1640 5% FBS +GPS) ou avec les B-EBV sans peptide. L'activation TCR a été mesurée le lendemain par cytométrie de flux et exprimée en pourcentage de cellules effectrices devenues GFP positives.

15. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism v6.0.

Les comparaisons entre les groupes CCIS purs et CCIS mixtes ont été faites avec un test t de Student non apparié bilatéral et celle entre les groupes tumoral, extra-tumoral et normal avec un test de comparaisons multiples Anova à un ou deux critères selon la situation. Les différences ont été considérées comme significatives à partir d'une valeur $p < 0,05$ et indiquées comme suit :
* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$.

REFERENCES

1. Wei, S. C., Duffy, C. R. & Allison, J. P. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 2018; **8**, 1069.
2. Flajnik, M. F. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2018; **18**, 438.
3. Lythe, G., Callard, R. E., Hoare, R. L. & Molina-Paris, C. How many TCR clonotypes does a body maintain? *J. Theor. Biol.* 2016; **389**, 214.
4. Soto, C., Bombardi, R. G., Kozhevnikov, M., Sinkovits, R. S., Chen, E. C., Branchizio, A., Kose, N., Day, S. B., Pilkinton, M., Gujral, M., Mallal, S. & Crowe, J. E., Jr. High Frequency of Shared Clonotypes in Human T Cell Receptor Repertoires. *Cell Rep.* 2020; **32**, 107882.
5. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. & Wiley, D. C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987; **329**, 512.
6. Brownlie, R. J. & Zamoyska, R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; **13**, 257.
7. Rouse, B. T., Röllinghoff, M. & Warner, N. L. Anti-J serum-induced suppression of the cellular transfer of tumour-specific immunity to a syngeneic plasma cell tumour. *Nat. New Biol.* 1972; **238**, 116.
8. De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariamé, B., Szikora, J.-P., Wölfel, T., Sibille, C., Chomez, P. & Boon, T. Immunogenic (tum⁻) variants of mouse tumor P815 : Cloning of the gene of tum⁻ antigen P91A and identification of the tum⁻ mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; **85**, 2274.
9. Lurquin, C., Van Pel, A., Mariamé, B., De Plaen, E., Szikora, J.-P., Janssens, C., Reddehase, M., Lejeune, J. & Boon, T. Structure of the gene of tum⁻ transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells. *Cell* 1989; **58**, 293.
10. Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2014; **14**, 135.
11. Coulie, P. G., Lehmann, F., Lethé, B., Herman, J., Lurquin, C., Andrawiss, M. & Boon, T. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; **92**, 7976.
12. Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K.-H. & Beach, D. A p16^{INK4a}-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995; **269**, 1281.
13. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. & Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; **254**, 1643.
14. van der Bruggen, P., Zhang, Y., Chaux, P., Stroobant, V., Panichelli, C., Schultz, E. S., Chapiro, J., Van den Eynde, B. J., Brasseur, F. & Boon, T. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol. Rev.* 2002; **188**, 51.
15. Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. & van der Bruggen, P. Human T cell responses against melanoma. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; **24**, 175.
16. Grigoriadis, A., Caballero, O. L., Hoek, K. S., da Silva, L., Chen, Y. T., Shin, S. J., Jungbluth, A. A., Miller, L. D., Clouston, D., Cebon, J., Old, L. J., Lakhani, S. R.,

- Simpson, A. J. & Neville, A. M. CT-X antigen expression in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; **106**, 13493.
17. Gannon, O. M., Antonsson, A., Bennett, I. C. & Saunders, N. A. Viral infections and breast cancer - A current perspective. *Cancer Lett.* 2018; **420**, 182.
 18. van der Bruggen, P., Stroobant, V., Vigneron, N. & Van den Eynde, B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immun.* 2013; **URL:** <http://www.cancerimmunity.org/peptide/>
 19. Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M. & Rosenberg, S. A. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol. Ther.* 2010; **18**, 843.
 20. Topalian, S. L., Taube, J. M., Anders, R. A. & Pardoll, D. M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2016; **16**, 275.
 21. Pardoll, D. Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Semin. Oncol.* 2015; **42**, 523.
 22. Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T. & Van den Eynde, B. J. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 2003; **9**, 1269.
 23. van Baren, N. & Van den Eynde, B. J. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front. Immunol.* 2015; **6**, 34.
 24. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; **299**, 1057.
 25. Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J. L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli, F. D., Byrne, G., McEuen, M., Prohl, S., Appleby, M. & Brunkow, M. E. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 2001; **27**, 18.
 26. Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F. & Ochs, H. D. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* 2001; **27**, 20.
 27. Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepers, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F. & Ramsdell, F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 2001; **27**, 68.
 28. Plitas, G., Konopacki, C., Wu, K., Bos, P. D., Morrow, M., Putintseva, E. V., Chudakov, D. M. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. *Immunity* 2016; **45**, 1122.
 29. Nishikawa, H. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer* 2010; **127**, 759.
 30. Facciabene, A., Motz, G. T. & Coukos, G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res.* 2012; **72**, 2162.
 31. Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A. C., Durand, I., Olive, D., Perez, S., Pasqual, N., Faure, C., Ray-Coquard, I., Puisieux, A., Caux, C., Blay, J. Y. & Menetrier-Caux, C. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 2009; **69**, 2000.

32. Schmid, P., Adams, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Dieras, V., Hegg, R., Im, S. A., Shaw Wright, G., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Funke, R., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S., Emens, L. A. & Investigators, I. M. T. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2018; **379**, 2108.
33. Rotte, A., Jin, J. Y. & Lemaire, V. Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy. *Ann. Oncol.* 2018; **29**, 71.
34. Topalian, S. L., Sznol, M., McDermott, D. F., Kluger, H. M., Carvajal, R. D., Sharfman, W. H., Brahmer, J. R., Lawrence, D. P., Atkins, M. B., Powderly, J. D., Leming, P. D., Lipson, E. J., Puzanov, I., Smith, D. C., Taube, J. M., Wigginton, J. M., Kollia, G. D., Gupta, A., Pardoll, D. M., Sosman, J. A. & Hodi, F. S. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J. Clin. Oncol.* 2014; **32**, 1020.
35. Gibney, G. T., Weiner, L. M. & Atkins, M. B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2016; **17**, e542.
36. Sunshine, J. & Taube, J. M. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2015; **23**, 32.
37. Cardoso, F., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rubio, I. T., Zackrisson, S., Senkus, E. & clinicalguidelines@esmo.org, E. G. C. E. a. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-updaggr. *Ann. Oncol.* 2019; **30**, 1194.
38. Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. & Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; **406**, 747.
39. Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J. & Cardoso, F. Breast cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2019; **5**, 66.
40. Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Muller, B. M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., von Torne, C., Weichert, W., Engels, K., Solbach, C., Schrader, I., Dietel, M. & von Minckwitz, G. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010; **28**, 105.
41. Ruffell, B., Au, A., Rugo, H. S., Esserman, L. J., Hwang, E. S. & Coussens, L. M. Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2012; **109**, 2796.
42. Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., Veys, I., Haibe-Kains, B., Singhal, S. K., Michiels, S., Rothe, F., Salgado, R., Duvillier, H., Ignatiadis, M., Desmedt, C., Bron, D., Larsimont, D., Piccart, M., Sotiriou, C. & Willard-Gallo, K. CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* 2013; **123**, 2873.
43. Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J. P., Hitre, E., de Azambuja, E., Quinaux, E., Di Leo, A., Michiels, S., Piccart, M. J. & Sotiriou, C. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J. Clin. Oncol.* 2013; **31**, 860.

44. Sistrunk, W. E. & Maccarty, W. C. Life Expectancy Following Radical Amputation for Carcinoma of the Breast: A Clinical and Pathologic Study of 218 Cases. *Ann. Surg.* 1922; **75**, 61.
45. Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A. & von Minckwitz, G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. *Lancet* 2017; **389**, 2430.
46. Savas, P., Salgado, R., Denkert, C., Sotiriou, C., Darcy, P. K., Smyth, M. J. & Loi, S. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016; **13**, 228.
47. Mahmoud, S. M., Paish, E. C., Powe, D. G., Macmillan, R. D., Grainge, M. J., Lee, A. H., Ellis, I. O. & Green, A. R. Tumor-infiltrating CD8⁺ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2011; **29**, 1949.
48. Ali, H. R., Provenzano, E., Dawson, S. J., Blows, F. M., Liu, B., Shah, M., Earl, H. M., Poole, C. J., Hiller, L., Dunn, J. A., Bowden, S. J., Twelves, C., Bartlett, J. M., Mahmoud, S. M., Rakha, E., Ellis, I. O., Liu, S., Gao, D., Nielsen, T. O., Pharoah, P. D. & Caldas, C. Association between CD8⁺ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann. Oncol.* 2014; **25**, 1536.
49. Sautes-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J. & Fridman, W. H. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2019; **19**, 307.
50. Figenschau, S. L., Fismen, S., Fenton, K. A., Fenton, C. & Mortensen, E. S. Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. *BMC Cancer* 2015; **15**, 101.
51. Song, I. H., Heo, S. H., Bang, W. S., Park, H. S., Park, I. A., Kim, Y. A., Park, S. Y., Roh, J., Gong, G. & Lee, H. J. Predictive Value of Tertiary Lymphoid Structures Assessed by High Endothelial Venule Counts in the Neoadjuvant Setting of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res. Treat.* 2017; **49**, 399.
52. Liu, X., Tsang, J. Y. S., Hlaing, T., Hu, J., Ni, Y. B., Chan, S. K., Cheung, S. Y. & Tse, G. M. Distinct Tertiary Lymphoid Structure Associations and Their Prognostic Relevance in HER2 Positive and Negative Breast Cancers. *Oncologist* 2017; **22**, 1316.
53. Sofopoulos, M., Fortis, S. P., Vaxevanis, C. K., Sotiriadou, N. N., Arnoigiannaki, N., Ardavanis, A., Vlachodimitropoulos, D., Perez, S. A. & Baxevanis, C. N. The prognostic significance of peritumoral tertiary lymphoid structures in breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2019; **68**, 1733.
54. Lee, H. J., Kim, J. Y., Park, I. A., Song, I. H., Yu, J. H., Ahn, J. H. & Gong, G. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and the Tertiary Lymphoid Structures in HER2-Positive Breast Cancer Treated With Adjuvant Trastuzumab. *Am J Clin Pathol* 2015; **144**, 278.
55. Lee, M., Heo, S. H., Song, I. H., Rajayi, H., Park, H. S., Park, I. A., Kim, Y. A., Lee, H., Gong, G. & Lee, H. J. Presence of tertiary lymphoid structures determines the level of tumor-infiltrating lymphocytes in primary breast cancer and metastasis. *Mod. Pathol.* 2019; **32**, 70.
56. Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S. & Linehan, D. C. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J. Immunol.* 2002; **169**, 2756.
57. Perez, S. A., Karamouzis, M. V., Skarlos, D. V., Ardavanis, A., Sotiriadou, N. N., Iliopoulou, E. G., Salagianni, M. L., Orphanos, G., Baxevanis, C. N., Rigatos, G. & Papamichail, M. CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell frequency in HER-2/neu (HER)-

- positive and HER-negative advanced-stage breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2007; **13**, 2714.
58. Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L. & Banham, A. H. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* 2006; **24**, 5373.
 59. Ladoire, S., Arnould, L., Apetoh, L., Coudert, B., Martin, F., Chauffert, B., Fumoleau, P. & Ghiringhelli, F. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin. Cancer Res.* 2008; **14**, 2413.
 60. Oda, N., Shimazu, K., Naoi, Y., Morimoto, K., Shimomura, A., Shimoda, M., Kagara, N., Maruyama, N., Kim, S. J. & Noguchi, S. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; **136**, 107.
 61. 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* 2016; **16**, 687.
 62. Bohling, S. D. & Allison, K. H. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Mod. Pathol.* 2008; **21**, 1527.
 63. Liu, F., Lang, R., Zhao, J., Zhang, X., Pringle, G. A., Fan, Y., Yin, D., Gu, F., Yao, Z. & Fu, L. CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011; **130**, 645.
 64. Ohara, M., Yamaguchi, Y., Matsuura, K., Murakami, S., Arihiro, K. & Okada, M. Possible involvement of regulatory T cells in tumor onset and progression in primary breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009; **58**, 441.
 65. Shang, B., Liu, Y., Jiang, S. J. & Liu, Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 2015; **5**, 15179.
 66. West, N. R., Kost, S. E., Martin, S. D., Milne, K., Deleeuw, R. J., Nelson, B. H. & Watson, P. H. Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br. J. Cancer* 2013; **108**, 155.
 67. Demir, L., Yigit, S., Ellidokuz, H., Erten, C., Somali, I., Kucukzeybek, Y., Alacacioglu, A., Cokmert, S., Can, A., Akyol, M., Dirican, A., Bayoglu, V., Sari, A. A. & Tarhan, M. O. Predictive and prognostic factors in locally advanced breast cancer: effect of intratumoral FOXP3+ Tregs. *Clin. Exp. Metastasis* 2013; **30**, 1047.
 68. Abdelrahman, A. E., Rashed, H. E., MostafaToam, Omar, A., Abdelhamid, M. I. & Matar, I. Clinicopathological significance of the immunologic signature (PDL1, FOXP3+ Tregs, TILs) in early stage triple-negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann. Diagn. Pathol.* 2020; **51**, 151676.
 69. Liu, F., Li, Y., Ren, M., Zhang, X., Guo, X., Lang, R., Gu, F. & Fu, L. Peritumoral FOXP3(+) regulatory T cell is sensitive to chemotherapy while intratumoral FOXP3(+) regulatory T cell is prognostic predictor of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; **135**, 459.
 70. Ladoire, S., Mignot, G., Dabakuyo, S., Arnould, L., Apetoh, L., Rebe, C., Coudert, B., Martin, F., Bizollon, M. H., Vanoli, A., Coutant, C., Fumoleau, P., Bonnetain, F. &

- Ghiringhelli, F. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J. Pathol.* 2011; **224**, 389.
71. Schmid, P., Rugo, H. S., Adams, S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Dieras, V., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Maiya, V., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S., Emens, L. A. & Investigators, I. M. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020; **21**, 44.
 72. Miles, D. W., Gligorov J., André F., Cameron D., Schneeweiss A., Barrios C.H., Xu B, Wardley A.M., Kaen D., Andrade L., Semiglazov V., Reinisch M., Patre M., Morales L., Russell K., Donica M., O'Shaughnessy J. Primary results from IMpassion131, a double-blind placebo-controlled randomised phase III trial of first-line paclitaxel (PAC) ± atezolizumab (atezo) for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC). *Ann. Oncol.* 2020; **31**, S1147.
 73. Cortes, J., Cescon, D. W., Rugo, H. S., Nowecki, Z., Im, S. A., Yusof, M. M., Gallardo, C., Lipatov, O., Barrios, C. H., Holgado, E., Iwata, H., Masuda, N., Otero, M. T., Gokmen, E., Loi, S., Guo, Z., Zhao, J., Aktan, G., Karantza, V., Schmid, P. & Investigators, K.-. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet* 2020; **396**, 1817.
 74. Cortes J., L. O., Im S.-A., Goncalves A., Lee K. S., Schmid P, Tamura K., Testa L., Witzel I., Ohtani S., Zambelli S., Harbeck N., Andre F., Dent R., Zhou X., Karantza V., Mejia J., Winer E.P. in *ESMO Congress* (Barcelona, 2019).
 75. Hutchinson, K. E., Yost, S. E., Chang, C. W., Johnson, R. M., Carr, A. R., McAdam, P. R., Halligan, D. L., Chang, C. C., Schmolze, D., Liang, J. & Yuan, Y. Comprehensive Profiling of Poor-Risk Paired Primary and Recurrent Triple-Negative Breast Cancers Reveals Immune Phenotype Shifts. *Clin. Cancer Res.* 2020; **26**, 657.
 76. Schmid, P., Dent, R. & O'Shaughnessy, J. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. Reply. *N. Engl. J. Med.* 2020; **382**, e108.
 77. Mittendorf, E. A., Zhang, H., Barrios, C. H., Saji, S., Jung, K. H., Hegg, R., Koehler, A., Sohn, J., Iwata, H., Telli, M. L., Ferrario, C., Punie, K., Penault-Llorca, F., Patel, S., Duc, A. N., Liste-Hermoso, M., Maiya, V., Molinero, L., Chui, S. Y. & Harbeck, N. 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. *Lancet* 2020; **396**, 1090.
 78. Nanda, R., Liu, M. C., Yau, C., Shatsky, R., Pusztai, L., Wallace, A., Chien, A. J., Forero-Torres, A., Ellis, E., Han, H., Clark, A., Albain, K., Boughey, J. C., Jaskowiak, N. T., Elias, A., Isaacs, C., Kemmer, K., Helsten, T., Majure, M., Stringer-Reasor, E., Parker, C., Lee, M. C., Haddad, T., Cohen, R. N., Asare, S., Wilson, A., Hirst, G. L., Singhrao, R., Steeg, K., Asare, A., Matthews, J. B., Berry, S., Sanil, A., Schwab, R., Symmans, W. F., van 't Veer, L., Yee, D., DeMichele, A., Hylton, N. M., Melisko, M., Perlmutter, J., Rugo, H. S., Berry, D. A. & Esserman, L. J. Effect of Pembrolizumab Plus Neoadjuvant Chemotherapy on Pathologic Complete Response in Women With Early-Stage Breast Cancer: An Analysis of the Ongoing Phase 2 Adaptively Randomized I-SPY2 Trial. *JAMA Oncol.* 2020; **6**, 676.
 79. Krasniqi, E., Barchiesi, G., Pizzuti, L., Mazzotta, M., Venuti, A., Maugeri-Sacca, M., Sanguineti, G., Massimiani, G., Sergi, D., Carpano, S., Marchetti, P., Tomao, S., Gamucci, T., De Maria, R., Tomao, F., Natoli, C., Tinari, N., Ciliberto, G., Barba, M.

- & Vici, P. Immunotherapy in HER2-positive breast cancer: state of the art and future perspectives. *J. Hematol. Oncol.* 2019; **12**, 111.
80. Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Mancini, M. & Rosenberg, S. A. Specific release of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor- α , and IFN- γ by human tumor-infiltrating lymphocytes after autologous tumor stimulation. *J. Immunol.* 1991; **146**, 3674.
 81. Topalian, S. L., Hom, S. S., Kawakami, Y., Mancini, M., Schwartzentruber, D. J., Zakut, R. & Rosenberg, S. A. Recognition of shared melanoma antigens by human tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunother (1991)*. 1992; **12**, 203.
 82. Dadmarz, R., Sgagias, M. K., Rosenberg, S. A. & Schwartzentruber, D. J. CD4⁺ T lymphocytes infiltrating human breast cancer recognise autologous tumor in an MHC-class-II restricted fashion. *Cancer Immunol. Immunother.* 1995; **40**, 1.
 83. Baxevas, C. N., Dedoussis, G. V., Papadopoulos, N. G., Missitzis, I., Stathopoulos, G. P. & Papamichail, M. Tumor specific cytolysis by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Cancer* 1994; **74**, 1275.
 84. Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Martin, S., Wedge, D. C., Van Loo, P., Ju, Y. S., Smid, M., Brinkman, A. B., Morganella, S., Aure, M. R., Lingjaerde, O. C., Langerod, A., Ringner, M., Ahn, S. M., Boyault, S., Brock, J. E., Broeks, A., Butler, A., Desmedt, C., Dirix, L., Dronov, S., Fatima, A., Foekens, J. A., Gerstung, M., Hooijer, G. K., Jang, S. J., Jones, D. R., Kim, H. Y., King, T. A., Krishnamurthy, S., Lee, H. J., Lee, J. Y., Li, Y., McLaren, S., Menzies, A., Mustonen, V., O'Meara, S., Pauporte, I., Pivot, X., Purdie, C. A., Raine, K., Ramakrishnan, K., Rodriguez-Gonzalez, F. G., Romieu, G., Sieuwerts, A. M., Simpson, P. T., Shepherd, R., Stebbings, L., Stefansson, O. A., Teague, J., Tommasi, S., Treilleux, I., Van den Eynden, G. G., Vermeulen, P., Vincent-Salomon, A., Yates, L., Caldas, C., van't Veer, L., Tutt, A., Knappskog, S., Tan, B. K., Jonkers, J., Borg, A., Ueno, N. T., Sotiriou, C., Viari, A., Futreal, P. A., Campbell, P. J., Span, P. N., Van Laere, S., Lakhani, S. R., Eyfjord, J. E., Thompson, A. M., Birney, E., Stunnenberg, H. G., van de Vijver, M. J., Martens, J. W., Borresen-Dale, A. L., Richardson, A. L., Kong, G., Thomas, G. & Stratton, M. R. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* 2016; **534**, 47.
 85. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr. & Kinzler, K. W. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; **339**, 1546.
 86. Pang, J. M., Gorringe, K. L. & Fox, S. B. Ductal carcinoma in situ - update on risk assessment and management. *Histopathology* 2016; **68**, 96.
 87. Ernster, V. L., Ballard-Barbash, R., Barlow, W. E., Zheng, Y., Weaver, D. L., Cutter, G., Yankaskas, B. C., Rosenberg, R., Carney, P. A., Kerlikowske, K., Taplin, S. H., Urban, N. & Geller, B. M. Detection of ductal carcinoma in situ in women undergoing screening mammography. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002; **94**, 1546.
 88. Ward, E. M., DeSantis, C. E., Lin, C. C., Kramer, J. L., Jemal, A., Kohler, B., Brawley, O. W. & Gansler, T. Cancer statistics: Breast cancer in situ. *CA Cancer J. Clin.* 2015; **65**, 481.
 89. Narod, S. A., Iqbal, J., Giannakeas, V., Sopik, V. & Sun, P. Breast Cancer Mortality After a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ. *JAMA Oncol* 2015; **1**, 888.
 90. Maxwell, A. J., Clements, K., Hilton, B., Dodwell, D. J., Evans, A., Kearins, O., Pinder, S. E., Thomas, J., Wallis, M. G., Thompson, A. M. & Sloane Project Steering, G. Risk factors for the development of invasive cancer in unresected ductal carcinoma in situ. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2018; **44**, 429.
 91. Morita, M., Yamaguchi, R., Tanaka, M., Tse, G. M., Yamaguchi, M., Kanomata, N., Naito, Y., Akiba, J., Hattori, S., Minami, S., Eguchi, S. & Yano, H. CD8(+) tumor-

- infiltrating lymphocytes contribute to spontaneous "healing" in HER2-positive ductal carcinoma in situ. *Cancer Med.* 2016; **5**, 1607.
92. Horii, R., Akiyama, F., Kasumi, F., Koike, M. & Sakamoto, G. Spontaneous "healing" of breast cancer. *Breast Cancer* 2005; **12**, 140.
 93. Wasserman, J. K. & Parra-Herran, C. Regressive change in high-grade ductal carcinoma in situ of the breast: histopathologic spectrum and biologic importance. *Am. J. Clin. Pathol.* 2015; **144**, 503.
 94. Welch, H. G. & Black, W. C. Using autopsy series to estimate the disease "reservoir" for ductal carcinoma in situ of the breast: how much more breast cancer can we find? *Ann. Intern. Med.* 1997; **127**, 1023.
 95. Thomas, E. T., Del Mar, C., Glasziou, P., Wright, G., Barratt, A. & Bell, K. J. L. Prevalence of incidental breast cancer and precursor lesions in autopsy studies: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2017; **17**, 808.
 96. Betsill, W. L., Jr., Rosen, P. P., Lieberman, P. H. & Robbins, G. F. Intraductal carcinoma. Long-term follow-up after treatment by biopsy alone. *JAMA* 1978; **239**, 1863.
 97. Rosen, P. P., Braun, D. W., Jr. & Kinne, D. E. The clinical significance of pre-invasive breast carcinoma. *Cancer* 1980; **46**, 919.
 98. Eusebi, V., Feudale, E., Foschini, M. P., Micheli, A., Conti, A., Riva, C., Di Palma, S. & Rilke, F. Long-term follow-up of in situ carcinoma of the breast. *Semin. Diagn. Pathol.* 1994; **11**, 223.
 99. Sanders, M. E., Schuyler, P. A., Dupont, W. D. & Page, D. L. The natural history of low-grade ductal carcinoma in situ of the breast in women treated by biopsy only revealed over 30 years of long-term follow-up. *Cancer* 2005; **103**, 2481.
 100. Collins, L. C., Tamimi, R. M., Baer, H. J., Connolly, J. L., Colditz, G. A. & Schnitt, S. J. Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy: results from the Nurses' Health Study. *Cancer* 2005; **103**, 1778.
 101. Sagara, Y., Mallory, M. A., Wong, S., Aydogan, F., DeSantis, S., Barry, W. T. & Golshan, M. Survival Benefit of Breast Surgery for Low-Grade Ductal Carcinoma In Situ: A Population-Based Cohort Study. *JAMA Surg.* 2015; **150**, 739.
 102. Barrio, A. V. & Van Zee, K. J. Controversies in the Treatment of Ductal Carcinoma in Situ. *Annu. Rev. Med.* 2017; **68**, 197.
 103. Van Bockstal, M. R., Agahozo, M. C., Koppert, L. B. & van Deurzen, C. H. M. A retrospective alternative for active surveillance trials for ductal carcinoma in situ of the breast. *Int. J. Cancer* 2020; **146**, 1189.
 104. Segnan, N., Minozzi, S., Armaroli, P., Cinquini, M., Bellisario, C., Gonzalez-Lorenzo, M., Gianola, S. & Ponti, A. Epidemiologic evidence of slow growing, nonprogressive or regressive breast cancer: A systematic review. *Int. J. Cancer* 2016; **139**, 554.
 105. Francis, A., Thomas, J., Fallowfield, L., Wallis, M., Bartlett, J. M., Brookes, C., Roberts, T., Pirrie, S., Gaunt, C., Young, J., Billingham, L., Dodwell, D., Hanby, A., Pinder, S. E., Evans, A., Reed, M., Jenkins, V., Matthews, L., Wilcox, M., Fairbrother, P., Bowden, S. & Rea, D. Addressing overtreatment of screen detected DCIS; the LORIS trial. *Eur. J. Cancer* 2015; **51**, 2296.
 106. Elshof, L. E., Tryfonidis, K., Slaets, L., van Leeuwen-Stok, A. E., Skinner, V. P., Dif, N., Pijnappel, R. M., Bijker, N., Rutgers, E. J. & Wesseling, J. Feasibility of a prospective, randomised, open-label, international multicentre, phase III, non-inferiority trial to assess the safety of active surveillance for low risk ductal carcinoma in situ - The LORD study. *Eur. J. Cancer* 2015; **51**, 1497.

107. Hwang, E. S., Hyslop, T., Lynch, T., Frank, E., Pinto, D., Basila, D., Collyar, D., Bennett, A., Kaplan, C., Rosenberg, S., Thompson, A., Weiss, A. & Partridge, A. The COMET (Comparison of Operative versus Monitoring and Endocrine Therapy) trial: a phase III randomised controlled clinical trial for low-risk ductal carcinoma in situ (DCIS). *BMJ Open* 2019; **9**, e026797.
108. Lippey, J., Spillane, A. & Saunders, C. Not all ductal carcinoma in situ is created equal: can we avoid surgery for low-risk ductal carcinoma in situ? *ANZ J. Surg.* 2016; **86**, 859.
109. Gorringer, K. L. & Fox, S. B. Ductal Carcinoma In Situ Biology, Biomarkers, and Diagnosis. *Front. Oncol.* 2017; **7**, 248.
110. Schnitt, S. J. Diagnosis of ductal carcinoma in situ in an era of de-escalation of therapy. *Mod. Pathol.* 2021; **34**, 1.
111. Wapnir, I. L., Dignam, J. J., Fisher, B., Mamounas, E. P., Anderson, S. J., Julian, T. B., Land, S. R., Margolese, R. G., Swain, S. M., Costantino, J. P. & Wolmark, N. Long-term outcomes of invasive ipsilateral breast tumor recurrences after lumpectomy in NSABP B-17 and B-24 randomized clinical trials for DCIS. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011; **103**, 478.
112. Wong, J. S., Chen, Y. H., Gadd, M. A., Gelman, R., Lester, S. C., Schnitt, S. J., Sgroi, D. C., Silver, B. J., Smith, B. L., Troyan, S. L. & Harris, J. R. Eight-year update of a prospective study of wide excision alone for small low- or intermediate-grade ductal carcinoma in situ (DCIS). *Breast Cancer Res. Treat.* 2014; **143**, 343.
113. Toss, M., Miligy, I., Thompson, A. M., Khout, H., Green, A. R., Ellis, I. O. & Rakha, E. A. Current trials to reduce surgical intervention in ductal carcinoma in situ of the breast: Critical review. *Breast* 2017; **35**, 151.
114. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., Correa, C., McGale, P., Taylor, C., Wang, Y., Clarke, M., Davies, C., Peto, R., Bijker, N., Solin, L. & Darby, S. Overview of the randomized trials of radiotherapy in ductal carcinoma in situ of the breast. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2010; **2010**, 162.
115. Silverstein, M. J. The University of Southern California/Van Nuys prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Am. J. Surg.* 2003; **186**, 337.
116. Hannemann, J., Velds, A., Halfwerk, J. B., Kreike, B., Peterse, J. L. & van de Vijver, M. J. Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. *Breast Cancer Res.* 2006; **8**, R61.
117. Muggenrud, A. A., Hallett, M., Johnsen, H., Kleivi, K., Zhou, W., Tahmasebpour, S., Amini, R. M., Botling, J., Borresen-Dale, A. L., Sorlie, T. & Warnberg, F. Molecular diversity in ductal carcinoma in situ (DCIS) and early invasive breast cancer. *Mol. Oncol.* 2010; **4**, 357.
118. Zhou, W., Jirstrom, K., Amini, R. M., Fjallskog, M. L., Sollie, T., Lindman, H., Sorlie, T., Blomqvist, C. & Warnberg, F. Molecular subtypes in ductal carcinoma in situ of the breast and their relation to prognosis: a population-based cohort study. *BMC Cancer* 2013; **13**, 512.
119. Clark, S. E., Warwick, J., Carpenter, R., Bowen, R. L., Duffy, S. W. & Jones, J. L. Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease. *Br. J. Cancer* 2011; **104**, 120.
120. Porter, D., Lahti-Domenici, J., Keshaviah, A., Bae, Y. K., Argani, P., Marks, J., Richardson, A., Cooper, A., Strausberg, R., Riggins, G. J., Schnitt, S., Gabrielson, E., Gelman, R. & Polyak, K. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol. Cancer Res.* 2003; **1**, 362.

121. Ma, X. J., Salunga, R., Tuggle, J. T., Gaudet, J., Enright, E., McQuary, P., Payette, T., Pistone, M., Stecker, K., Zhang, B. M., Zhou, Y. X., Varnholt, H., Smith, B., Gadd, M., Chatfield, E., Kessler, J., Baer, T. M., Erlander, M. G. & Sgroi, D. C. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2003; **100**, 5974.
122. Lesurf, R., Aure, M. R., Mork, H. H., Vitelli, V., Oslo Breast Cancer Research, C., Lundgren, S., Borresen-Dale, A. L., Kristensen, V., Warnberg, F., Hallett, M. & Sorlie, T. Molecular Features of Subtype-Specific Progression from Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Breast Cancer. *Cell Rep.* 2016; **16**, 1166.
123. Vincent-Salomon, A., Lucchesi, C., Gruel, N., Raynal, V., Pierron, G., Goudefroye, R., Rey, F., Radvanyi, F., Salmon, R., Thierry, J. P., Sastre-Garau, X., Sigal-Zafrani, B., Fourquet, A., Delattre, O. & breast cancer study group of the Institut, C. Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin. Cancer Res.* 2008; **14**, 1956.
124. Abba, M. C., Gong, T., Lu, Y., Lee, J., Zhong, Y., Lacunza, E., Butti, M., Takata, Y., Gaddis, S., Shen, J., Estecio, M. R., Sahin, A. A. & Aldaz, C. M. A Molecular Portrait of High-Grade Ductal Carcinoma In Situ. *Cancer Res.* 2015; **75**, 3980.
125. Pareja, F., Brown, D. N., Lee, J. Y., Da Cruz Paula, A., Selenica, P., Bi, R., Geyer, F. C., Gazzo, A., da Silva, E. M., Vahdatinia, M., Stylianou, A. A., Ferrando, L., Wen, H. Y., Hicks, J. B., Weigelt, B. & Reis-Filho, J. S. Whole-Exome Sequencing Analysis of the Progression from Non-Low-Grade Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Ductal Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2020; **26**, 3682.
126. Kim, S. Y., Jung, S. H., Kim, M. S., Baek, I. P., Lee, S. H., Kim, T. M., Chung, Y. J. & Lee, S. H. Genomic differences between pure ductal carcinoma in situ and synchronous ductal carcinoma in situ with invasive breast cancer. *Oncotarget* 2015; **6**, 7597.
127. Hernandez, L., Wilkerson, P. M., Lambros, M. B., Campion-Flora, A., Rodrigues, D. N., Gauthier, A., Cabral, C., Pawar, V., Mackay, A., A'Hern, R., Marchio, C., Palacios, J., Natrajan, R., Weigelt, B. & Reis-Filho, J. S. Genomic and mutational profiling of ductal carcinomas in situ and matched adjacent invasive breast cancers reveals intra-tumour genetic heterogeneity and clonal selection. *J. Pathol.* 2012; **227**, 42.
128. Trinh, A., Gil Del Alcazar, C. R., Shukla, S. A., Chin, K., Chang, Y. H., Thibault, G., Eng, J., Jovanovic, B., Aldaz, C. M., Park, S. Y., Jeong, J., Wu, C., Gray, J. & Polyak, K. Genomic Alterations during the In Situ to Invasive Ductal Breast Carcinoma Transition Shaped by the Immune System. *Mol. Cancer Res.* 2020.
129. Casasent, A. K., Schalck, A., Gao, R., Sei, E., Long, A., Pangburn, W., Casasent, T., Meric-Bernstam, F., Edgerton, M. E. & Navin, N. E. Multiclonal Invasion in Breast Tumors Identified by Topographic Single Cell Sequencing. *Cell* 2018; **172**, 205.
130. Nelson, A. C., Machado, H. L. & Schwertfeger, K. L. Breaking through to the Other Side: Microenvironment Contributions to DCIS Initiation and Progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2018; **23**, 207.
131. Rakha, E. A., Miligy, I. M., Gorringer, K. L., Toss, M. S., Green, A. R., Fox, S. B., Schmitt, F. C., Tan, P. H., Tse, G. M., Badve, S., Decker, T., Vincent-Salomon, A., Dabbs, D. J., Foschini, M. P., Moreno, F., Wentao, Y., Geyer, F. C., Reis-Filho, J. S., Pinder, S. E., Lakhani, S. R. & Ellis, I. O. Invasion in breast lesions: the role of the epithelial-stroma barrier. *Histopathology* 2018; **72**, 1075.
132. Russell, T. D., Jindal, S., Agunbiade, S., Gao, D., Troxell, M., Borges, V. F. & Schedin, P. Myoepithelial cell differentiation markers in ductal carcinoma in situ progression. *Am. J. Pathol.* 2015; **185**, 3076.

133. Mitchell, E., Jindal, S., Chan, T., Narasimhan, J., Sivagnanam, S., Gray, E., Chang, Y. H., Weinmann, S. & Schedin, P. Loss of myoepithelial calponin-1 characterizes high-risk ductal carcinoma in situ cases, which are further stratified by T cell composition. *Mol. Carcinog.* 2020; **59**, 701.
134. Duivenvoorden, H. M., Rautela, J., Edgington-Mitchell, L. E., Spurling, A., Greening, D. W., Nowell, C. J., Molloy, T. J., Robbins, E., Brockwell, N. K., Lee, C. S., Chen, M., Holliday, A., Selinger, C. I., Hu, M., Britt, K. L., Stroud, D. A., Bogyo, M., Moller, A., Polyak, K., Sloane, B. F., O'Toole, S. A. & Parker, B. S. Myoepithelial cell-specific expression of stefin A as a suppressor of early breast cancer invasion. *J. Pathol.* 2017; **243**, 496.
135. Sarper, M., Allen, M. D., Gomm, J., Haywood, L., Decock, J., Thirkettle, S., Ustaoglu, A., Sarker, S. J., Marshall, J., Edwards, D. R. & Jones, J. L. Loss of MMP-8 in ductal carcinoma in situ (DCIS)-associated myoepithelial cells contributes to tumour promotion through altered adhesive and proteolytic function. *Breast Cancer Res.* 2017; **19**, 33.
136. Rohilla, M., Bal, A., Singh, G. & Joshi, K. Phenotypic and Functional Characterization of Ductal Carcinoma In Situ-Associated Myoepithelial Cells. *Clin. Breast Cancer* 2015; **15**, 335.
137. Guo, F., Wang, Y., Liu, J., Mok, S. C., Xue, F. & Zhang, W. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene* 2016; **35**, 816.
138. Lo, P. K., Zhang, Y., Yao, Y., Wolfson, B., Yu, J., Han, S. Y., Duru, N. & Zhou, Q. Tumor-associated myoepithelial cells promote the invasive progression of ductal carcinoma in situ through activation of TGFbeta signaling. *J. Biol. Chem.* 2017; **292**, 11466.
139. Szynglarewicz, B., Kasprzak, P., Donizy, P., Biecek, P., Halon, A. & Matkowski, R. Epithelial-mesenchymal transition inducer Snail1 and invasive potential of intraductal breast cancer. *J. Surg. Oncol.* 2017; **116**, 696.
140. Allen, M. D., Thomas, G. J., Clark, S., Dawoud, M. M., Vallath, S., Payne, S. J., Gomm, J. J., Dreger, S. A., Dickinson, S., Edwards, D. R., Pennington, C. J., Sestak, I., Cuzick, J., Marshall, J. F., Hart, I. R. & Jones, J. L. Altered microenvironment promotes progression of preinvasive breast cancer: myoepithelial expression of alphavbeta6 integrin in DCIS identifies high-risk patients and predicts recurrence. *Clin. Cancer Res.* 2014; **20**, 344.
141. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2016; **16**, 582.
142. Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V., Andre, S., Piccart, M., Campone, M., Brain, E., Macgrogan, G., Petit, T., Jassem, J., Bibeau, F., Blot, E., Bogaerts, J., Aguet, M., Bergh, J., Iggo, R. & Delorenzi, M. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat. Med.* 2009; **15**, 68.
143. Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., Bonneau, C., Kondratova, M., Kuperstein, I., Zinovyev, A., Givel, A. M., Parrini, M. C., Soumelis, V., Vincent-Salomon, A. & Mechta-Grigoriou, F. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* 2018; **33**, 463.
144. Lee, J. H., Kim, H. M. & Koo, J. S. Differential Expression of Cancer-Associated Fibroblast-Related Proteins in Ductal Carcinoma in situ According to Molecular Subtype and Stromal Histology. *Pathobiology* 2018; **85**, 311.

145. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**, 646.
146. Engels, K., Fox, S. B., Whitehouse, R. M., Gatter, K. C. & Harris, A. L. Distinct angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast. *J. Pathol.* 1997; **181**, 207.
147. Carpenter, P. M., Chen, W. P., Mendez, A., McLaren, C. E. & Su, M. Y. Angiogenesis in the progression of breast ductal proliferations. *Int. J. Surg. Pathol.* 2011; **19**, 335.
148. Teo, N. B., Shoker, B. S., Jarvis, C., Martin, L., Sloane, J. P. & Holcombe, C. Vascular density and phenotype around ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *Br. J. Cancer* 2002; **86**, 905.
149. Wulfig, P., Kersting, C., Buerger, H., Mattsson, B., Mesters, R., Gustmann, C., Hinrichs, B., Tio, J., Bocker, W. & Kiesel, L. Expression patterns of angiogenic and lymphangiogenic factors in ductal breast carcinoma in situ. *Br. J. Cancer* 2005; **92**, 1720.
150. Degnim, A. C., Brahmbhatt, R. D., Radisky, D. C., Hoskin, T. L., Stallings-Mann, M., Laudenschlager, M., Mansfield, A., Frost, M. H., Murphy, L., Knutson, K. & Visscher, D. W. Immune cell quantitation in normal breast tissue lobules with and without lobulitis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2014; **144**, 539.
151. Campbell, M. R., Zhang, H., Ziaee, S., Ruiz-Saenz, A., Gulizia, N., Oeffinger, J., Amin, D. N., Ahuja, D., Moasser, M. M. & Park, C. C. Effective treatment of HER2-amplified breast cancer by targeting HER3 and beta1 integrin. *Breast Cancer Res. Treat.* 2016; **155**, 431.
152. Gil Del Alcazar, C. R., Huh, S. J., Ekram, M. B., Trinh, A., Liu, L. L., Beca, F., Zi, X., Kwak, M., Bergholtz, H., Su, Y., Ding, L., Russnes, H. G., Richardson, A. L., Babski, K., Min Hui Kim, E., McDonnell, C. H., 3rd, Wagner, J., Rowberry, R., Freeman, G. J., Dillon, D., Sorlie, T., Coussens, L. M., Garber, J. E., Fan, R., Bobolis, K., Allred, D. C., Jeong, J., Park, S. Y., Michor, F. & Polyak, K. Immune Escape in Breast Cancer During In Situ to Invasive Carcinoma Transition. *Cancer Discov.* 2017; **7**, 1098.
153. Pruneri, G., Lazzeroni, M., Bagnardi, V., Tiburzio, G. B., Rotmensz, N., DeCensi, A., Guerrieri-Gonzaga, A., Vingiani, A., Curigliano, G., Zurrida, S., Bassi, F., Salgado, R., Van den Eynden, G., Loi, S., Denkert, C., Bonanni, B. & Viale, G. The prevalence and clinical relevance of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ductal carcinoma in situ of the breast. *Ann. Oncol.* 2017; **28**, 321.
154. Hendry, S., Pang, J. B., Byrne, D. J., Lakhani, S. R., Cummings, M. C., Campbell, I. G., Mann, G. B., Gorringer, K. L. & Fox, S. B. Relationship of the Breast Ductal Carcinoma In Situ Immune Microenvironment with Clinicopathological and Genetic Features. *Clin. Cancer Res.* 2017; **23**, 5210.
155. Beguinot, M., Dauplat, M. M., Kwiatkowski, F., Lebouedec, G., Tixier, L., Pomel, C., Penault-Llorca, F. & Radosevich-Robin, N. Analysis of tumour-infiltrating lymphocytes reveals two new biologically different subgroups of breast ductal carcinoma in situ. *BMC Cancer* 2018; **18**, 129.
156. Agahozo, M. C., van Bockstal, M. R., Groenendijk, F. H., van den Bosch, T. P. P., Westenend, P. J. & van Deurzen, C. H. M. Ductal carcinoma in situ of the breast: immune cell composition according to subtype. *Mod. Pathol.* 2020; **33**, 196.
157. Thike, A. A., Chen, X., Koh, V. C. Y., Binte Md Nasir, N. D., Yeong, J. P. S., Bay, B. H. & Tan, P. H. Higher densities of tumour-infiltrating lymphocytes and CD4(+) T cells predict recurrence and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Histopathology* 2020; **76**, 852.

158. Toss, M. S., Abidi, A., Lesche, D., Joseph, C., Mahale, S., Saunders, H., Kader, T., Miligy, I. M., Green, A. R., Gorringer, K. L. & Rakha, E. A. The prognostic significance of immune microenvironment in breast ductal carcinoma in situ. *Br. J. Cancer* 2020; **122**, 1496.
159. Farolfi, A., Petracci, E., Serra, L., Ravaioli, A., Bravaccini, S., Ravaioli, S., Tumedei, M. M., Ulivi, P., Canale, M., Puccetti, M., Falcini, F., Folli, S., Curcio, A. & Rocca, A. Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) and Risk of a Second Breast Event After a Ductal Carcinoma in situ. *Front. Oncol.* 2020; **10**, 1486.
160. Dieci, M. V., Radošević-Robin, N., Fineberg, S., van den Eynden, G., Ternes, N., Penault-Llorca, F., Pruneri, G., D'Alfonso, T. M., Demaria, S., Castaneda, C., Sanchez, J., Badve, S., Michiels, S., Bossuyt, V., Rojo, F., Singh, B., Nielsen, T., Viale, G., Kim, S. R., Hewitt, S., Wienert, S., Loibl, S., Rimm, D., Symmans, F., Denkert, C., Adams, S., Loi, S., Salgado, R. & International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast, C. 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; **52**, 16.
161. Semeraro, M., Adam, J., Stoll, G., Louvet, E., Chaba, K., Poirier-Colame, V., Sauvat, A., Senovilla, L., Vacchelli, E., Bloy, N., Humeau, J., Buque, A., Kepp, O., Zitvogel, L., Andre, F., Mathieu, M. C., Delaloge, S. & Kroemer, G. The ratio of CD8(+)/FOXP3 T lymphocytes infiltrating breast tissues predicts the relapse of ductal carcinoma in situ. *Oncoimmunology* 2016; **5**, e1218106.
162. Kim, M., Chung, Y. R., Kim, H. J., Woo, J. W., Ahn, S. & Park, S. Y. Immune microenvironment in ductal carcinoma in situ: a comparison with invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2020; **22**, 32.
163. Thompson, E., Taube, J. M., Elwood, H., Sharma, R., Meeker, A., Warzecha, H. N., Argani, P., Cimino-Mathews, A. & Emens, L. A. The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. *Mod. Pathol.* 2016; **29**, 249.
164. Degnim, A. C., Hoskin, T. L., Arshad, M., Frost, M. H., Winham, S. J., Brahmabhatt, R. A., Pena, A., Carter, J. M., Stallings-Mann, M. L., Murphy, L. M., Miller, E. E., Denison, L. A., Vachon, C. M., Knutson, K. L., Radisky, D. C. & Visscher, D. W. Alterations in the Immune Cell Composition in Premalignant Breast Tissue that Precede Breast Cancer Development. *Clin. Cancer Res.* 2017; **23**, 3945.
165. Lal, A., Chan, L., Devries, S., Chin, K., Scott, G. K., Benz, C. C., Chen, Y. Y., Waldman, F. M. & Hwang, E. S. FOXP3-positive regulatory T lymphocytes and epithelial FOXP3 expression in synchronous normal, ductal carcinoma in situ, and invasive cancer of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013; **139**, 381.
166. Kristensen, V. N., Vaske, C. J., Ursini-Siegel, J., Van Loo, P., Nordgard, S. H., Sachidanandam, R., Sorlie, T., Warnberg, F., Haakensen, V. D., Helland, A., Naume, B., Perou, C. M., Haussler, D., Troyanskaya, O. G. & Borresen-Dale, A. L. Integrated molecular profiles of invasive breast tumors and ductal carcinoma in situ (DCIS) reveal differential vascular and interleukin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; **109**, 2802.
167. Buisseret, L., Garaud, S., de Wind, A., Van den Eynden, G., Boisson, A., Solinas, C., Gu-Trantien, C., Naveaux, C., Lodewyckx, J. N., Duvillier, H., Craciun, L., Veys, I., Larsimont, D., Piccart-Gebhart, M., Stagg, J., Sotiriou, C. & Willard-Gallo, K. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. *Oncoimmunology* 2017; **6**, e1257452.
168. Cibrian, D. & Sanchez-Madrid, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.* 2017; **47**, 946.

169. Topham, D. J. & Reilly, E. C. Tissue-Resident Memory CD8(+) T Cells: From Phenotype to Function. *Front. Immunol.* 2018; **9**, 515.
170. Spolski, R., Li, P. & Leonard, W. J. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2018; **18**, 648.
171. Santegoets, S. J., Dijkgraaf, E. M., Battaglia, A., Beckhove, P., Britten, C. M., Gallimore, A., Godkin, A., Gouttefangeas, C., de Gruijl, T. D., Koenen, H. J., Scheffold, A., Shevach, E. M., Staats, J., Tasken, K., Whiteside, T. L., Kroep, J. R., Welters, M. J. & van der Burg, S. H. Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. *Cancer Immunol. Immunother.* 2015; **64**, 1271.
172. Vigano, S., Banga, R., Bellanger, F., Pellaton, C., Farina, A., Comte, D., Harari, A. & Perreau, M. CD160-associated CD8 T-cell functional impairment is independent of PD-1 expression. *PLoS Pathog.* 2014; **10**, e1004380.
173. Simon, S. & Labarriere, N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncoimmunology* 2017; **7**, e1364828.
174. Byrne, A., Savas, P., Sant, S., Li, R., Virassamy, B., Luen, S. J., Beavis, P. A., Mackay, L. K., Neeson, P. J. & Loi, S. Tissue-resident memory T cells in breast cancer control and immunotherapy responses. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2020; **17**, 341.
175. Hardenberg, J. B., Braun, A. & Schon, M. P. A Yin and Yang in Epithelial Immunology: The Roles of the alphaE(CD103)beta7 Integrin in T Cells. *J. Invest. Dermatol.* 2018; **138**, 23.
176. Savas, P., Virassamy, B., Ye, C., Salim, A., Mintoff, C. P., Caramia, F., Salgado, R., Byrne, D. J., Teo, Z. L., Dushyanthen, S., Byrne, A., Wein, L., Luen, S. J., Poliness, C., Nightingale, S. S., Skandarajah, A. S., Gyorki, D. E., Thornton, C. M., Beavis, P. A., Fox, S. B., Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast, C., Darcy, P. K., Speed, T. P., Mackay, L. K., Neeson, P. J. & Loi, S. Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nat. Med.* 2018; **24**, 986.
177. Stockis, J., Colau, D., Coulie, P. G. & Lucas, S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur. J. Immunol.* 2009; **39**, 3315.
178. Ahmadzadeh, M., Pasetto, A., Jia, L., Deniger, D. C., Stevanovic, S., Robbins, P. F. & Rosenberg, S. A. Tumor-infiltrating human CD4(+) regulatory T cells display a distinct TCR repertoire and exhibit tumor and neoantigen reactivity. *Sci. Immunol.* 2019; **4**.
179. Page, D. B., Yuan, J., Redmond, D., Wen, Y. H., Durack, J. C., Emerson, R., Solomon, S., Dong, Z., Wong, P., Comstock, C., Diab, A., Sung, J., Maybody, M., Morris, E., Brogi, E., Morrow, M., Sacchini, V., Elemento, O., Robins, H., Patil, S., Allison, J. P., Wolchok, J. D., Hudis, C., Norton, L. & McArthur, H. L. Deep Sequencing of T-cell Receptor DNA as a Biomarker of Clonally Expanded TILs in Breast Cancer after Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* 2016; **4**, 835.
180. Beausang, J. F., Wheeler, A. J., Chan, N. H., Hanft, V. R., Dirbas, F. M., Jeffrey, S. S. & Quake, S. R. T cell receptor sequencing of early-stage breast cancer tumors identifies altered clonal structure of the T cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017; **114**, E10409.
181. Yao, J., Caballero, O. L., Yung, W. K., Weinstein, J. N., Riggins, G. J., Strausberg, R. L. & Zhao, Q. Tumor subtype-specific cancer-testis antigens as potential biomarkers and immunotherapeutic targets for cancers. *Cancer Immunol. Res.* 2014; **2**, 371.
182. Wang, C., Gu, Y., Zhang, K., Xie, K., Zhu, M., Dai, N., Jiang, Y., Guo, X., Liu, M., Dai, J., Wu, L., Jin, G., Ma, H., Jiang, T., Yin, R., Xia, Y., Liu, L., Wang, S., Shen, B.,

- Huo, R., Wang, Q., Xu, L., Yang, L., Huang, X., Shen, H., Sha, J. & Hu, Z. Systematic identification of genes with a cancer-testis expression pattern in 19 cancer types. *Nat. Commun.* 2016; **7**, 10499.
183. Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mangu, P. B., Bartlett, J. M. S., Bilous, M., Ellis, I. O., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., McShane, L. M. & Dowsett, M. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2018; **142**, 1364.
 184. Fisk, B., Blevins, T. L., Wharton, J. T. & Ioannides, C. G. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.* 1995; **181**, 2109.
 185. Mishra, R., Alanazi, S., Yuan, L., Solomon, T., Thaker, T. M., Jura, N. & Garrett, J. T. Activating HER3 mutations in breast cancer. *Oncotarget* 2018; **9**, 27773.
 186. Jaiswal, B. S., Kljavin, N. M., Stawiski, E. W., Chan, E., Parikh, C., Durinck, S., Chaudhuri, S., Pujara, K., Guillory, J., Edgar, K. A., Janakiraman, V., Scholz, R. P., Bowman, K. K., Lorenzo, M., Li, H., Wu, J., Yuan, W., Peters, B. A., Kan, Z., Stinson, J., Mak, M., Modrusan, Z., Eigenbrot, C., Firestein, R., Stern, H. M., Rajalingam, K., Schaefer, G., Merchant, M. A., Sliwkowski, M. X., de Sauvage, F. J. & Seshagiri, S. Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. *Cancer Cell* 2013; **23**, 603.
 187. Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C. G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway, C., Jupe, S. C., Kok, C. Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C. C., Rye, C. E., Speedy, H. E., Stefancsik, R., Thompson, S. L., Wang, S., Ward, S., Campbell, P. J. & Forbes, S. A. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019; **47**, D941.
 188. Baurain, J.-F., Colau, D., van Baren, N., Landry, C., Martelange, V., Vikkula, M., Boon, T. & Coulie, P. G. High frequency of autologous anti-melanoma CTLs directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *J. Immunol.* 2000; **164**, 6057.
 189. Doebar, S. C., van den Broek, E. C., Koppert, L. B., Jager, A., Baaijens, M. H. A., Obdeijn, I. A. M. & van Deurzen, C. H. M. Extent of ductal carcinoma in situ according to breast cancer subtypes: a population-based cohort study. *Breast Cancer Res. Treat.* 2016; **158**, 179.
 190. Simoni, Y., Becht, E., Fehlings, M., Loh, C. Y., Koo, S. L., Teng, K. W. W., Yeong, J. P. S., Nahar, R., Zhang, T., Kared, H., Duan, K., Ang, N., Poidinger, M., Lee, Y. Y., Larbi, A., Khng, A. J., Tan, E., Fu, C., Mathew, R., Teo, M., Lim, W. T., Toh, C. K., Ong, B. H., Koh, T., Hillmer, A. M., Takano, A., Lim, T. K. H., Tan, E. H., Zhai, W., Tan, D. S. W., Tan, I. B. & Newell, E. W. Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature* 2018; **557**, 575.
 191. Smith, C. C., Selitsky, S. R., Chai, S., Armistead, P. M., Vincent, B. G. & Serody, J. S. Alternative tumour-specific antigens. *Nat. Rev. Cancer* 2019; **19**, 465.
 192. Guilloux, Y., Lucas, S., Brichard, V. G., Van Pel, A., Viret, C., De Plaen, E., Brasseur, F., Lethé, B., Jotereau, F. & Boon, T. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J. Exp. Med.* 1996; **183**, 1173.
 193. Dersh, D., Holly, J. & Yewdell, J. W. A few good peptides: MHC class I-based cancer immunosurveillance and immuno-evasion. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; **21**, 116.
 194. Tarantino, P., Hamilton, E., Tolane, S. M., Cortes, J., Morganti, S., Ferraro, E., Marra, A., Viale, G., Trapani, D., Cardoso, F., Penault-Llorca, F., Viale, G., Andre, F. &

- Curigliano, G. HER2-Low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. *J. Clin. Oncol.* 2020; **38**, 1951.
195. Benavides, L. C., Gates, J. D., Carmichael, M. G., Patil, R., Holmes, J. P., Hueman, M. T., Mittendorf, E. A., Craig, D., Stojadinovic, A., Ponniah, S. & Peoples, G. E. The impact of HER2/neu expression level on response to the E75 vaccine: from U.S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Clin. Cancer Res.* 2009; **15**, 2895.
 196. Mittendorf, E. A., Lu, B., Melisko, M., Price Hiller, J., Bondarenko, I., Brunt, A. M., Sergii, G., Petrakova, K. & Peoples, G. E. Efficacy and Safety Analysis of Nelipepimut-S Vaccine to Prevent Breast Cancer Recurrence: A Randomized, Multicenter, Phase III Clinical Trial. *Clin. Cancer Res.* 2019; **25**, 4248.
 197. Sharma, A., Koldovsky, U., Xu, S., Mick, R., Roses, R., Fitzpatrick, E., Weinstein, S., Nisenbaum, H., Levine, B. L., Fox, K., Zhang, P., Koski, G. & Czerniecki, B. J. HER-2 pulsed dendritic cell vaccine can eliminate HER-2 expression and impact ductal carcinoma in situ. *Cancer* 2012; **118**, 4354.
 198. Koski, G. K., Koldovsky, U., Xu, S., Mick, R., Sharma, A., Fitzpatrick, E., Weinstein, S., Nisenbaum, H., Levine, B. L., Fox, K., Zhang, P. & Czerniecki, B. J. A novel dendritic cell-based immunization approach for the induction of durable Th1-polarized anti-HER-2/neu responses in women with early breast cancer. *J. Immunother.* 2012; **35**, 54.
 199. Lowenfeld, L., Mick, R., Datta, J., Xu, S., Fitzpatrick, E., Fisher, C. S., Fox, K. R., DeMichele, A., Zhang, P. J., Weinstein, S. P., Roses, R. E. & Czerniecki, B. J. Dendritic Cell Vaccination Enhances Immune Responses and Induces Regression of HER2(pos) DCIS Independent of Route: Results of Randomized Selection Design Trial. *Clin. Cancer Res.* 2017; **23**, 2961.
 200. Scheper, W., Kelderman, S., Fanchi, L. F., Linnemann, C., Bendle, G., de Rooij, M. A. J., Hirt, C., Mezzadra, R., Slagter, M., Dijkstra, K., Kluin, R. J. C., Snaebjornsson, P., Milne, K., Nelson, B. H., Zijlmans, H., Kenter, G., Voest, E. E., Haanen, J. & Schumacher, T. N. Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nat. Med.* 2019; **25**, 89.
 201. Wang, H. Y., Lee, D. A., Peng, G., Guo, Z., Li, Y., Kiniwa, Y., Shevach, E. M. & Wang, R.-F. Tumor-specific human CD4⁺ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity* 2004; **20**, 107.
 202. François, V., Ottaviani, S., Renkvist, N., Stockis, J., Schuler, G., Thielemans, K., Colau, D., Marchand, M., Boon, T., Lucas, S. & van der Bruggen, P. The CD4⁺ T-cell response of melanoma patients to a MAGE-A3 peptide vaccine involves potential regulatory T cells. *Cancer Res.* 2009; **69**, 4335.
 203. Urbaniak, C., Cummins, J., Brackstone, M., Macklaim, J. M., Gloor, G. B., Baban, C. K., Scott, L., O'Hanlon, D. M., Burton, J. P., Francis, K. P., Tangney, M. & Reid, G. Microbiota of human breast tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; **80**, 3007.
 204. Hieken, T. J., Chen, J., Hoskin, T. L., Walther-Antonio, M., Johnson, S., Ramaker, S., Xiao, J., Radisky, D. C., Knutson, K. L., Kalari, K. R., Yao, J. Z., Baddour, L. M., Chia, N. & Degnim, A. C. The Microbiome of Aseptically Collected Human Breast Tissue in Benign and Malignant Disease. *Sci. Rep.* 2016; **6**, 30751.
 205. Hermesen, B. B., von Mensdorff-Pouilly, S., Fabry, H. F., Winters, H. A., Kenemans, P., Verheijen, R. H. & van Diest, P. J. Lobulitis is a frequent finding in prophylactically removed breast tissue from women at hereditary high risk of breast cancer. *J. Pathol.* 2005; **206**, 220.
 206. Danforth, D. N., Jr. Genomic Changes in Normal Breast Tissue in Women at Normal Risk or at High Risk for Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)* 2016; **10**, 109.

207. de Streel, G., Bertrand, C., Chalon, N., Lienart, S., Bricard, O., Lecomte, S., Devreux, J., Gaignage, M., De Boeck, G., Marien, L., Van De Walle, I., van der Woning, B., Saunders, M., de Haard, H., Vermeersch, E., Maes, W., Deckmyn, H., Coulie, P. G., van Baren, N. & Lucas, S. Selective inhibition of TGF-beta1 produced by GARP-expressing Tregs overcomes resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer. *Nat. Commun.* 2020; **11**, 4545.
208. Garaud, S., Gu-Trantien, C., Lodewyckx, J. N., Boisson, A., De Silva, P., Buisseret, L., Migliori, E., Libin, M., Naveaux, C., Duvillier, H. & Willard-Gallo, K. A simple and rapid protocol to non-enzymatically dissociate fresh human tissues for the analysis of infiltrating lymphocytes. *J. Vis. Exp.* 2014.
209. Morimoto, S., Fujiki, F., Kondo, K., Nakajima, H., Kobayashi, Y., Inatome, M., Aoyama, N., Nishida, Y., Tsuboi, A., Oka, Y., Nishida, S., Nakata, J., Hosen, N., Oji, Y. & Sugiyama, H. Establishment of a novel platform cell line for efficient and precise evaluation of T cell receptor functional avidity. *Oncotarget* 2018; **9**, 34132.
210. Harvey, J. M., Clark, G. M., Osborne, C. K. & Allred, D. C. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1999; **17**, 1474.
211. Picelli, S., Faridani, O. R., Bjorklund, A. K., Winberg, G., Sagasser, S. & Sandberg, R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat. Protoc.* 2014; **9**, 171.
212. Yang, S., Cohen, C. J., Peng, P. D., Zhao, Y., Cassard, L., Yu, Z., Zheng, Z., Jones, S., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. *Gene Ther.* 2008; **15**, 1411.
213. Jones, S., Peng, P. D., Yang, S., Hsu, C., Cohen, C. J., Zhao, Y., Abad, J., Zheng, Z., Rosenberg, S. A. & Morgan, R. A. Lentiviral vector design for optimal T cell receptor gene expression in the transduction of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Hum. Gene Ther.* 2009; **20**, 630.