



UNIVERSITÉ  
DE REIMS  
CHAMPAGNE-ARDENNE

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
ECOLE DOCTORALE SCIENDES TECHNOLOGIE SANTE (547)

## THESE

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
Discipline : Recherche clinique, innovation technologique, santé publique

présentée et soutenue publiquement par

**Sarah MOMBELLI**

Le 22 décembre 2014

Titre:

## **Cancers du sein et Immunologie anti-tumorale**

### JURY

Pr Franck Antonicelli,  
Pr Hervé Curé,  
Dr Armand Bensussan,  
Pr Philippe Chollet,  
Mr Christian Schmitt,  
Dr Christian Garbar,  
Mme Laurence Michel,  
Dr Yacine Merrouche,

Président  
Directeur de thèse  
Directeur de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur

"Là où se trouve une volonté il existe un chemin"

**W. Churchill**

"La seule façon d'échouer est d'arrêter avant d'avoir réussi"

**Dominique M.**

## ***REMERCIEMENTS***

Je remercie chaleureusement les membres du jury qui me font l'honneur de juger mon travail de thèse malgré leurs obligations professionnelles, la distance et leurs emplois du temps chargés. Merci aux rapporteurs, Professeur Philippe Chollet et Monsieur Schmitt, d'avoir pris le temps de corriger le manuscrit. Merci à Madame Laurence Michel et aux Docteurs Christian Garbar et Yacine Merrouche d'avoir accepté d'être examinateurs de la soutenance. Enfin merci au Professeur Franck Antonicelli d'avoir accepté la présidence de ce jury.

Je tiens à remercier de façon plus personnelle mes deux directeurs de Thèse, Professeur Hervé Curé et Docteur Armand Bensussan, envers qui j'ai une grande estime et qui m'ont offert la possibilité d'effectuer une thèse sur un sujet qui me tenait à cœur. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, merci de m'avoir conseillée et dirigée tout au long de ce projet et d'avoir su me remotiver dans les moments difficiles.

Merci également au Professeur Jacky Bernard sans qui je n'aurais pas eu connaissance de cette opportunité.

Merci à tous mes collaborateurs de Reims, Paris et Clermont-Ferrand d'avoir rendu ce travail possible. Jérôme, Fabrice, Catherine et Qian, mais aussi Béatrice et Pauline, merci pour votre temps, votre compréhension et votre aide, ainsi que votre sympathie !

Merci également à toute l'équipe du BRC de l'institut Jean Godinot avec qui j'ai aimé travaillé, merci à Véronique pour m'avoir aidé à faire mes premiers pas dans la recherche clinique mais aussi à Reims. Je n'oublie pas les filles du DIM avec qui l'on peut discuter et beaucoup rire ! Un grand merci les filles, votre présence quotidienne a été un réel soutien !

Un énorme merci aussi à tous mes proches, qui ont eux aussi contribué à la réussite de ma thèse de par mon bien être ;

Merci infiniment à tous mes amis : Pauline, Sophie, Agathe, Zoé, Amélie, Alexandra, Cécile, Charlène, Ana, Laura et Anna mais aussi Julien, Sébastien, Fred et Antonin. Je suis heureuse

de vous compter dans ma vie, notre amitié m'est très importante et je vous remercie de tous les bons moments passés ensemble, qui illuminent ma vie et me donnent de l'espoir.

Je pense bien à toi Laure-Anne, nous avons commencé la recherche ensemble et je t'adresse tous mes encouragements pour terminer ta thèse en beauté.

Merci infiniment à Anne-Sophie, ta compréhension et ta gentillesse, tes encouragements et tes conseils en or. Tu as toujours été là pour moi quand il le fallait, les mots ne peuvent pas exprimer la force de ma gratitude envers toi. 🌸

Une pensée spéciale pour Anne-Laure, tu as été mon soutien sans faille, tout particulièrement dans l'exercice de cette thèse, je me demande sincèrement comment j'aurais fait sans toi ! Je te serai toujours reconnaissante de cette réussite. Merci !!!

Pour finir je remercie tendrement ma famille à qui je tiens énormément et qui m'a encouragé pendant toutes ces années d'études, même s'il était parfois compliqué de tout comprendre. Mes sistas, neveux et nièce, et mes parents, merci pour tout cet amour. Je me bats pour le valoir chaque jour et c'est cela qui me tire vers le haut.

Merci à mes parents de m'avoir élevé comme ils l'ont fait, tout le bonheur que vous m'avez offert me donne cette force de persévérer et de croire en l'avenir. Merci de tout mon cœur ! ❤️

## *RESUME*

# **Cancers du sein et Immunologie anti-tumorale**

Avec environ 49 000 nouvelles femmes touchées chaque année, le cancer du sein est le plus répandu des cancers féminins. Le dépistage du cancer du sein, ainsi que l'amélioration des traitements ont fait diminuer la mortalité mais il reste encore le plus meurtrier des cancers féminins en France.

Le cancer du sein étant une maladie hétérogène, individualiser les traitements des patientes est désormais l'un des objectifs premiers des praticiens. C'est autour de cet objectif commun que se sont articulés les 2 projets de ce travail de thèse.

D'une part, pour l'étude clinique, j'ai établi une base de données sur la stratégie néoadjuvante des cancers du sein opérables, regroupant 318 patientes traitées à l'institut Jean Godinot. Cette base nous permet de comparer nos résultats à ceux de la littérature, de mettre en avant l'intérêt de la chimiothérapie néoadjuvante pour déterminer de nouveaux facteurs pronostics, et de valider l'évaluation des résidus tumoraux dans le sein et les ganglions par l'index RDBN.

D'autre part, l'étude expérimentale nous a permis d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes moléculaires d'échappement tumoral. Nous avons ainsi démontré le rôle pro-tumoral de l'IL-17A mais aussi de l'IL-17E, ces deux cytokines pouvant être présentes dans le microenvironnement tumoral, et mis en évidence leur implication dans la dérégulation du cycle cellulaire à travers la génération des LMW-E et l'acquisition d'un mécanisme de chimiorésistance.

**Mots clés:** cancers du sein, chimiothérapie néoadjuvante, facteurs pronostics, index RDBN, interleukine-17A, interleukine-17E

# Breast cancers and anti-tumor immunology

With around 49 000 new affected women each year, breast cancer is the most common of feminine cancers. Breast cancer screening, and treatments improvements make mortality decreased but it stays the most murderous of feminine cancers in France.

Breast cancer being a heterogeneous disease, individualizing patients' treatments is now one of first goals of practitioner. It is around of this common aim that my 2 thesis projects are turned on.

On the one side, for clinical study, I designed a database on the neoadjuvant strategy of operable breast cancers, assembling 318 patients treated at Jean Godinot institute. This database allow us to compare our results with literature ones, to highlight the interest of neoadjuvant chemotherapy to determine new prognostic factors, and to validate evaluation of residual disease in breast and nodes by RDBN index.

On the other side experimental study allowed us to improve our knowledge on molecular mechanisms of tumor escape. We demonstrated pro-tumoral role of IL-17A but also of IL-17E, these two cytokines can be presents in tumoral microenvironment, and evidenced their implication in cell cycle dysregulation through generation of LMW-E and acquisition of chemoristance mechanisms.

**Key words:** breast cancers, neoadjuvant chemotherapy, prognostic factors, RDBN index, interleukin-17A, interleukin-17E

## *Unités de rattachement*

Institut Jean-Godinot  
1, rue du général Koenig  
CS 80014  
51726 REIMS Cedex



EA-7319 Derm-I-C  
UFR Médecine Reims  
51 095 Reims Cedex

INSERM UMR-S 976  
Hôpital Saint Louis  
Pavillon Bazin  
1 Avenue Claude Vellefaux  
75475 Paris Cedex 10



# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	3
RESUME .....	5
SOMMAIRE .....	8
LISTE DES ABBREVIATIONS .....	13
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	15
<b><u>Chapitre 1 : les cancers du sein</u></b> .....	<b>15</b>
<b><u>1-Epidémiologie du cancer du sein</u></b> .....	<b>15</b>
a) Incidence, mortalité et évolution .....	15
b) Les facteurs de risque .....	15
<b><u>2-Développement du cancer du sein</u></b> .....	<b>18</b>
a) Architecture et développement du sein .....	18
<b>Figure 1 : Représentation schématique d'un sein en coupe</b> .....	<b>19</b>
<b>Figure 2 : Evolution de l'architecture de la glande mammaire</b> .....	<b>20</b>
b) <u>Processus de cancérogénèse</u> .....	20
<b>Figure 3 : Les différentes phases de la cancérogénèse</b> .....	<b>21</b>
c) <u>Processus métastatique</u> .....	24
<b>Figure 4 : Principales étapes de la formation d'une métastase</b> .....	<b>25</b>
<b>Figure 5 : Principaux sites métastatiques du cancer du sein</b> .....	<b>26</b>
<b><u>3-Diagnostic du cancer du sein</u></b> .....	<b>27</b>
a) <u>L'examen clinique</u> .....	27
<b>Tableau 1 : Classification TNM du cancer du sein, 7° édition 2010</b> .....	<b>28</b>
<b>Tableau 2 : Stades UICC du cancer du sein, 7° édition 2010</b> .....	<b>29</b>
b) <u>Les examens mammographiques et échographiques</u> .....	30
<b>Tableau 3 : Classification ACR</b> .....	<b>32</b>
c) <u>L'examen d'anatomopathologie</u> .....	32
<b>Tableau 4 : Classification histologique de l'OMS</b> .....	<b>35</b>
<b>Figure 6 : Possibles localisations de cancer du sein</b> .....	<b>36</b>
<b><u>Chapitre 2 : Les facteurs prédictifs et pronostiques des cancers du sein</u></b> ..	<b>38</b>
<b><u>1-Les facteurs cliniques</u></b> .....	<b>38</b>
a) Age et statut ménopausique .....	38

b) Taille et stade clinique .....	39
<b><u>2-Les facteurs histopathologiques</u></b> .....	<b>39</b>
a) Envahissement ganglionnaire .....	39
b) Taille histologique .....	40
c) La réponse pathologique complète .....	40
d) Grade histologique .....	41
Tableau 5. Grade SBR selon Elston et Ellis (1991) .....	42
Tableau 6. Grade MSBR selon Le Doussal et al (1989) .....	43
e) Index mitotique .....	43
f) Type histologique .....	43
g) Présence d'emboles .....	44
<b><u>3-Les biomarqueurs d'intérêt thérapeutique</u></b> .....	<b>45</b>
a) Les récepteurs hormonaux .....	45
b) L'oncogène HER2 .....	46
c) L'antigène Ki-67 .....	48
d) Principaux biomarqueurs en cours de validation .....	49
e) Vers une thérapie personnalisée .....	51
<b><u>4-Principaux index pronostiques</u></b> .....	<b>52</b>
a) L'index pronostique de Nottingham .....	52
b) L'index RDBN .....	53
c) Le score IHC4 .....	54

## **Chapitre 3 : les traitements néoadjuvants dans les cancers du sein opérables**

.....	<b>54</b>
<b><u>1-Justificatifs de la chimiothérapie néoadjuvante</u></b> .....	<b>54</b>
a) Justificatifs historiques .....	54
b) Justificatifs expérimentaux .....	55
c) Justificatifs cliniques .....	55
d) Chimiothérapie néoadjuvante versus adjuvante .....	56
<b><u>2- La chimiothérapie néoadjuvante des cancers du sein opérables</u></b> .....	<b>56</b>
a) Chimiothérapie à base d'anthracyclines .....	56
b) Chimiothérapie comportant un taxane .....	57
<b><u>3- Les cancers du sein HER2-positifs</u></b> .....	<b>58</b>

a) <u>Trastuzumab</u> .....	58
b) <u>Pertuzumab</u> .....	60
c) <u>Lapatinib</u> .....	60
<b><u>4- Les cancers du sein hormonodépendants</u></b> .....	<b>60</b>
a) <u>Le tamoxifène</u> .....	60
b) <u>Les inhibiteurs de l'aromatase</u> .....	60
<b><u>5- Evaluation de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante</u></b> .....	<b>61</b>
a) <u>La réponse clinique</u> .....	61
b) <u>La réponse anatomo-pathologique</u> .....	62
<b><u>Chapitre 4 : immunité anti-tumorale</u></b> .....	<b>63</b>
<b><u>1-L'immunosurveillance</u></b> .....	<b>64</b>
a) <u>Elimination</u> .....	64
b) <u>Equilibre (ou Immunosélection)</u> .....	65
c) <u>Echappement tumoral (ou Immunosubversion)</u> .....	65
<b><u>2-La réponse immunitaire anti-tumorale</u></b> .....	<b>65</b>
<b>Figure 7 : Contrôle des cellules tumorales par le système immunitaire</b> .....	<b>66</b>
a) <u>L'immunité innée</u> .....	66
<b>Figure 8: Les marqueurs CD16 et CD56</b> .....	<b>68</b>
b) <u>L'immunité adaptative</u> .....	72
<b>Figure 9. La structure des corécepteurs CD4 et CD8 et leur interaction avec le CMH ..</b>	<b>73</b>
<b>Figure 10 : Représentation schématique des voies de différenciation des cellules T</b>	
<b>CD4<sup>+</sup> naïves</b> .....	<b>74</b>
<b><u>3-Les mécanismes d'échappement tumoral</u></b> .....	<b>78</b>
a) <u>Microenvironnement pro-tumoral</u> .....	78
b) <u>Faible immunogénicité des cellules tumorales</u> .....	79
c) <u>Recrutement de populations immunitaires régulatrices</u> .....	79
d) <u>Facteurs solubles immunosuppresseurs</u> .....	80
e) <u>Dérégulation des signaux d'apoptose</u> .....	81
f) <u>Barrière physique</u> .....	81
<b><u>4-L'immunothérapie des cancers</u></b> .....	<b>82</b>
a) <u>L'administration d'anticorps monoclonaux ciblant la tumeur</u> .....	82
<b>Figure 11 : Mode d'action des anticorps</b> .....	<b>83</b>
b) <u>L'inhibition des voies immunosuppressives</u> .....	85

c) <u>La vaccination anti-tumorale</u> .....	87
d) <u>Molécules visant à stimuler le système immunitaire</u> .....	89
e) <u>Les thérapies visant à renforcer les réponses T par transfert de lymphocytes anti-tumoraux</u> .....	90
f) <u>Thérapies combinées</u> .....	90
<b><u>Chapitre 5 : L'interleukine-17</u></b> .....	<b>91</b>
<b><u>1- Caractérisation</u></b> .....	<b>91</b>
a) <u>Récepteurs d'IL-17 et signalisation</u> .....	91
<b>Tableau 7: Récepteurs et ligands de la famille des IL-17</b> .....	<b>92</b>
b) <u>Cellules productrices d'IL-17</u> .....	92
<b><u>2- Fonctions immunologiques de l'IL-17</u></b> .....	<b>93</b>
a) <u>Granulopoïèse/Inflammation</u> .....	93
b) <u>Défense immunitaire contre des pathogènes infectieux</u> .....	94
c) <u>Implication de l'IL-17 dans certaines maladies auto-immunes</u> .....	94
d) <u>IL-17 et cancer</u> .....	95
<b><u>3- IL-17 : cible thérapeutique?</u></b> .....	<b>97</b>
a) <u>Contre les maladies auto-immunes</u> .....	97
b) <u>Contre le cancer</u> .....	98
<b>RESULTATS</b> .....	<b>99</b>
<b><u>A) Recherche clinique : Stratégie néoadjuvante des cancers du sein opérables, étude des facteurs pronostiques</u></b> .....	<b>99</b>
<b><u>1- Synthèse</u></b> .....	<b>99</b>
<b><u>2- Article 1 (soumis): Prognostic factors in Operable Breast Cancer treated by Neoadjuvant Chemotherapy (NACT): towards a quantification of the residual disease</u></b> .....	<b>101</b>
<b><u>B) Recherche expérimentale : Etude moléculaire d'un mécanisme d'échappement tumoral. Rôles des IL-17A et E dans la progression tumorale et l'invasion des cancers du sein</u></b> .....	<b>126</b>
<b><u>1- Synthèse</u></b> .....	<b>126</b>

*2- Article 2 (en preparation): IL-17A and its homologs IL-25/IL-17E recruit the c-RAF/S6 kinase pathway and the generation of pro-oncogenic low molecular forms of cyclin E (LMW-E) in breast cancer cells ..... 129*

**DISCUSSION & PERSPECTIVES ..... 151**

**A) Stratégie néoadjuvante des cancers du sein opérables, étude des facteurs pronostiques ..... 151**

Tableau 8 : Comparaison des tests multigéniques selon leurs caractéristiques ..... 161

**B) Etude moléculaire d'un mécanisme d'échappement tumoral. Rôles des IL-17A et E dans la progression tumorale et l'invasion des cancers du sein ..... 164**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 168**

## ABBREVIATIONS

### A

AC : adriamycine - cyclophosphamide  
ACR : American College of Radiologists  
AC-DOC : adriamycine-cyclophosphamide puis docétaxel  
Act-1: *nuclear factor Activating-1*  
ADC : *antibody-drug conjugates* / anticorps couplés à des drogues  
ADCC : *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* / cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADOC : docétaxel - doxorubicine  
AJCC : *American Joint Committee on Cancer*  
AMM : autorisation de mise sur le marché  
AP-1 : *activator protein-1*  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
ASCO : *American Society of Clinical Oncology*

### B

BCR : *B-cell receptor* / récepteur des Ig

### C

CAIX : *carbonic anhydrase IX*  
CCI : carcinome canalaire infiltrant  
CCIS : carcinomes canalaire *in situ*  
CDK : kinases cycline-dépendantes  
CLI : carcinome lobulaire infiltrant  
CLIS : carcinomes lobulaires *in situ*  
CMH : molécule du complexe majeur d'histocompatibilité  
CTL : lymphocytes T cytotoxiques  
CTLA-4 : *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*  
CTNA : chimiothérapie néoadjuvante  
CVAP : cyclophosphamide, vincristine, doxorubicine, prednisolone  
C/EBP : *CCAAT/enhancer binding protein*

### D

DAMP : *damaged associated molecular pattern* / signaux de danger moléculaires

### E

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale  
EGF : *epidermal growth factor* / facteur de croissance épidermique  
EGFR : récepteur de l'EGF  
EORTC : Organisation Européenne de Recherche et de Traitement du Cancer  
EpCAM : *epithelial cell adhesion molecule*  
ERK : *extracellular-related kinase*  
ETBF : enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*

### F

Fab : fragment variable des anticorps  
FAC : fluorouracile, doxorubicine, cyclophosphamide  
Fas : *apoptosis stimulating fragment* / fragment inducteur d'apoptose  
Fas-L : ligand de Fas  
Fc : fragment constant des anticorps  
FDA : *Food and Drug Administration*  
FEC : fluorouracile, épirubicine, cyclophosphamide  
Foxp3 : *forkhead box P3*

### G

G-CSF : *granulocyte colony stimulating factor* / facteur de stimulation de colonies de granulocytes  
GGI : *genomic grade index*  
GM-CSF : *granulocyte-mmonocyte colony-stimulating factor* / facteur de stimulation de colonies de granulo- et monocytes

### H

HAI-2 : *hepatocyte growth factor inhibitor type 2*  
HER2 : *human epidermal growth factor receptor 2*  
HIF-1 : *hypoxia inducible factor-1*

### I

IC : cancers du sein inflammatoires  
IFN : interféron  
Ig : immunoglobuline

IHC : immunohistochimie  
I $\kappa$ B : inhibiteur de NF- $\kappa$ B  
IL : interleukine  
IRM : imagerie par résonance magnétique

## K

KIR : *killer Ig-like receptors*

## L

LABC : cancers du sein localement avancés  
LMW-E : low molecular weight-E

## M

MAI : *mitotic activity index*  
MAPK : *mitogen-activated protein kinases*  
MCP1 : *monocyte chemoattractant protein-1*  
MIC : *MHC-class I Related protein*  
MMP : métalloprotéinase  
MSBR : SBR modifié

## N

NCCN : *National Comprehensive Cancer Network*  
NCI : Institut National du Cancer  
NCR : *natural cytotoxicity receptor* / récepteur de cytotoxicité naturelle  
NF- $\kappa$ B : *nuclear factor-kappa B*  
NK : *natural killer*  
NKT : *natural killer T*  
NPI : *Nottingham prognostic index*

## O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

## P

pCR : réponse pathologique complète  
PAI-1 : inhibiteur de type I d'uPA  
PeV : poussée évolutive  
PD-1 : *programmed cell death protein-1*  
PD-L : ligand de PD-1  
PI3K : phosphoinositide 3-kinase  
PPH3 : phosphohistone H3  
PRR : *pattern recognition receptor* / récepteur cellulaire de l'immunité innée

## R

RANTES : *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

RDBN : *residual disease in breast and nodes*  
RE : récepteur aux oestrogènes  
RECIST : *response criteria in solid tumors*  
RH : récepteur aux hormones  
ROR $\gamma$ t : *RAR-related orphan receptor- $\gamma$ t*  
RP : récepteur à la progestérone  
RT-PCR : *reverse transcription polymerase chain reaction* / réactions en chaîne par polymérase après transcription inverse

## S

SBR : Scarff-Bloom et Richardson  
SG : survie globale  
SEFIR : *similar expression to fibroblast growth factor gene and Il-17R*  
SSR : survie sans rechute  
STAT : *signal transducers and activators of transcription*

## T

TAM : *tumor-associated macrophage*  
T-DM1 : anticorps trastuzumab conjugué avec le DM1 (dérivé d'emtansine)  
TCR : *T-cell receptor* / récepteur des antigènes  
TGF : *transforming growth factor*  
Th : *T helper* / T auxiliaire  
TLR : *toll-like receptor* / récepteur toll-like  
TNF : *tumor necrosis factor* / facteur de nécrose tumorale  
TNM : T - taille tumorale,  
N - atteinte ganglionnaire,  
M - existence éventuelle de métastases  
TRAF : *TNF receptor associated factor*  
Treg : T régulateurs  
TIMP : inhibiteur tissulaire des MMP  
TN : triple-négatif

## U

UICC : Union Internationale Contre le Cancer  
uPA : *urokinase plasminogen activator* / activateur du plasminogène de type urokinase  
uPAR : récepteur d'uPA

## V

VEGF : *vascular endothelial growth factor*  
VEGFR : récepteur de VEGF

# ***INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE***

## **Chapitre I : Les cancers du sein**

### **1-Epidémiologie du cancer du sein**

#### **a) Incidence, mortalité et évolution**

Les cancers demeurent, depuis 2004, la première cause de mortalité en France, suivis des maladies cardiovasculaires <sup>1</sup>. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, devant le cancer colorectal, celui du poumon et les hémopathies malignes, avec un nombre de nouveaux cas qui a doublé entre 1980 et 2000, et estimé à 48 763 nouveaux cas en 2012. Parallèlement, les taux d'incidence standardisés ont fortement augmenté jusqu'en 2000 avant de se stabiliser puis de diminuer à partir de 2005, le cancer du sein se situe néanmoins au 2<sup>ème</sup> rang, tous cancers confondus, concernant l'incidence.

Il est également le 3<sup>ème</sup> cancer le plus meurtrier chez la femme avec environ 11 000 décès chaque année. En revanche, depuis 1990 la mortalité diminue constamment et significativement, avec un taux de -1,5% par an entre 2005 et 2012.

#### **b) Les facteurs de risque**

Le cancer est une maladie multi-étape et multi-factorielle, il n'y a donc jamais de cause unique du développement d'un cancer. On connaît un certain nombre de facteurs de risque du cancer du sein même s'il existe encore aujourd'hui des incertitudes quant à l'implication et au poids de plusieurs de ces facteurs. Le fait que le cancer n'apparaisse que plusieurs années après l'exposition augmente les difficultés à établir la relation causale entre l'agent et le cancer. Malgré une connaissance accrue des facteurs de risque il reste impossible de prédire individuellement qui développera un cancer, selon les risques auxquels il est exposé.

Néanmoins, la connaissance de ces facteurs de risque permet la mise en œuvre de mesures adaptées de prévention des cancers et de dépistages ciblés.

- **L'âge** est le facteur de risque le plus important vis-à-vis du cancer du sein. L'incidence de ce cancer augmente avec l'âge, la maladie est rare en dessous de 30 ans et augmente entre 45 et 70 ans, puis diminue progressivement.

- **Les antécédents de pathologie mammaire**, comme la présence de kystes palpables, de fibroadénomes complexes ou encore d'hyperplasie canalaire modérée ou floride, augmentent de 1,5 à 3 fois le risque de développer un cancer du sein.

La présence de foyers d'hyperplasie canalaire et lobulaire atypique multiplie par 4 à 20 le risque de survenue d'un cancer du sein selon l'âge des patientes et leurs antécédents <sup>2</sup>.

Les carcinomes canalaire *in situ* (CCIS) ou les carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS) dont l'exérèse est incomplète multiplient par 8 à 10 le risque de cancer du sein <sup>3</sup>.

Les femmes, qui ont eu un cancer du sein, ont 5 fois plus de risque de développer un nouveau cancer dans le même sein lorsque la chirurgie a été conservatrice, ou dans le sein controlatéral que la population générale.

Enfin, les antécédents personnels d'un autre cancer majorent le risque de cancer du sein : il est multiplié par 2 à 4 après un cancer du côlon et par 1 à 2 après un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre.

- **Les facteurs familiaux et génétiques** : Dans 5 à 10% des cas environ, il existe une prédisposition génétique au cancer du sein. On la rencontre dans des familles à risque de cancer du sein où cette affection se transmet sur le mode autosomal dominant avec une pénétrance (expression génétique) limitée. Ceci implique que des membres d'une même famille peuvent posséder et transmettre ce gène sans développer un cancer. Les facteurs pouvant alerter le clinicien sont les suivants :

- 3 cancers du sein ou plus dans une même branche familiale au premier ou au deuxième degré

- 1 cancer d'emblée multifocal ou bilatéral chez une femme jeune

- d'autres cancers associés dans la famille, en particulier le cancer des ovaires

L'examen de l'arbre généalogique permet de déterminer à quel syndrome génétique appartient la famille. On distingue :

- des familles avec cancer du sein spécifique de site, qui ne développent que des cancers du sein

- des familles avec cancer du sein et cancer des ovaires

- enfin, des familles où s'associent différents types de cancer dont les cancers du sein, il s'agit du syndrome de Li-Fraumeni et du syndrome de Cowden de fréquence rare, associés à des mutations des gènes p53 et PTEN, respectivement.

Trois gènes de prédisposition au cancer du sein ont été caractérisés : BRCA1 et BRCA2 localisés sur les chromosomes 17 et 13 respectivement, et BRCA3 qui serait localisé sur le chromosome 8 et dont le rôle reste à définir. Il s'agit de gènes onco-suppresseurs, exprimés dans de nombreux tissus (sein, ovaire, rate, thymus, testicule), qui interviendraient dans le contrôle de la prolifération des cellules mammaires sous l'influence de stimulations hormonales. Les mutations de BRCA1 et BRCA2 peuvent se produire n'importe où sur le gène, mais le type de mutation et leur position dans le gène pourrait conditionner l'expression de la maladie et la prolifération tumorale. C'est ainsi que les mutations siégeant dans la partie proximale de BRCA1 seraient associées à une plus grande incidence des cancers de l'ovaire. Lorsqu'une mutation de l'un de ces gènes est mise en évidence, le risque de survenue d'un cancer du sein chez les femmes de ces familles au cours de leur vie est élevé : ces femmes ont entre 40 et 85% de risque de développer un cancer du sein si elles vivent jusqu'à 70 ans, alors que ce risque est de l'ordre de 10 % dans la population générale <sup>4</sup>.

Il existe également des facteurs de risque externes, liés à l'environnement et aux modes et conditions de vie.

**- L'exposition aux œstrogènes** peut être endogène ou exogène.

\* Endogène : Une imprégnation hormonale prolongée (puberté précoce: <11 ans, ménopause tardive: >55 ans, première grossesse tardive: >30 ans) augmente le risque de développer un cancer du sein.

\* Exogène : La prise de contraceptifs oraux et de traitements hormonaux substitutifs augmente le risque de développer un cancer du sein <sup>5</sup>.

**- Le surpoids et les habitudes de vie**

\* L'obésité est associée à un risque de cancer du sein multiplié par 2 chez les femmes ménopausées, il en est de même pour les femmes ayant un surpoids de plus de 20 kg à partir de l'âge de 18 ans. L'excès de tissus adipeux entraîne l'augmentation de la production et du temps d'exposition aux hormones stéroïdiennes, de plus, après la ménopause, l'aromatation des androgènes dans le tissu adipeux est l'une des plus considérables sources d'œstrogènes circulants <sup>6</sup>.

\* Le diabète de type 2 est un grave problème de santé publique qui touche plus de 7% des adultes dans les pays développés. D'après la revue de la littérature de Wolf et al. <sup>7</sup>, le diabète de type 2 pourrait augmenter de 10 à 20% le risque relatif de développer un cancer du sein. Ceci serait dû notamment à une surproduction du récepteur à l'insuline causée par une plus grande concentration d'insuline. Le complexe insuline/récepteur induit, par des réactions en cascades, une diminution de l'apoptose et entraîne une plus forte prolifération cellulaire.

\* La sédentarité : l'absence d'activité physique régulière, de l'ordre de 30 à 60 minutes au moins 4 fois par semaine, pourtant recommandée par tous les experts, représente un facteur de risque, en particulier chez les femmes ménopausées.

\* L'alcool est le seul facteur nutritionnel établi de risque du cancer du sein. Ce risque augmente d'environ 7% pour une consommation moyenne d'une boisson alcoolique par jour <sup>8</sup>.

\* Le tabac est une importante source de substances carcinogènes, il est associé à la survenue de diverses maladies incluant de nombreux cancers, pourtant la cigarette n'est pas considérée comme un facteur de risque établi du cancer du sein car les résultats d'études sont discordants jusqu'ici <sup>9</sup>.

\* L'alimentation : L'association entre le risque de cancer du sein et les principales composantes de l'alimentation humaine incluant les fruits et les légumes, les produits laitiers, la viande, les vitamines, les fibres et les phyto-œstrogènes a fait l'objet de nombreuses études. D'une manière générale, les résultats restent discordants <sup>10,11</sup>.

## **2-Développement du cancer du sein**

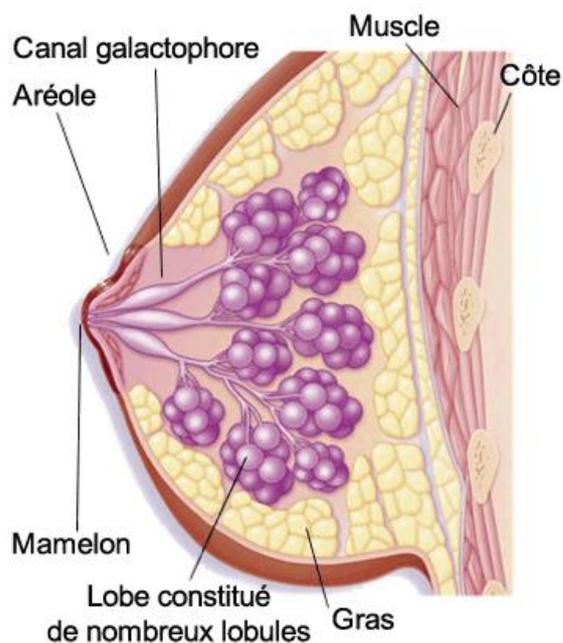
### **a) Architecture et développement du sein**

Le sein est une glande exocrine qui se compose d'une masse, d'une aréole et d'un mamelon (Figure 1). La glande mammaire est constituée de 2 compartiments cellulaires : le compartiment mésenchymateux, perfusé par les vaisseaux sanguins et les nerfs, et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de canaux galactophores et de lobules renfermant les alvéoles. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane basale de

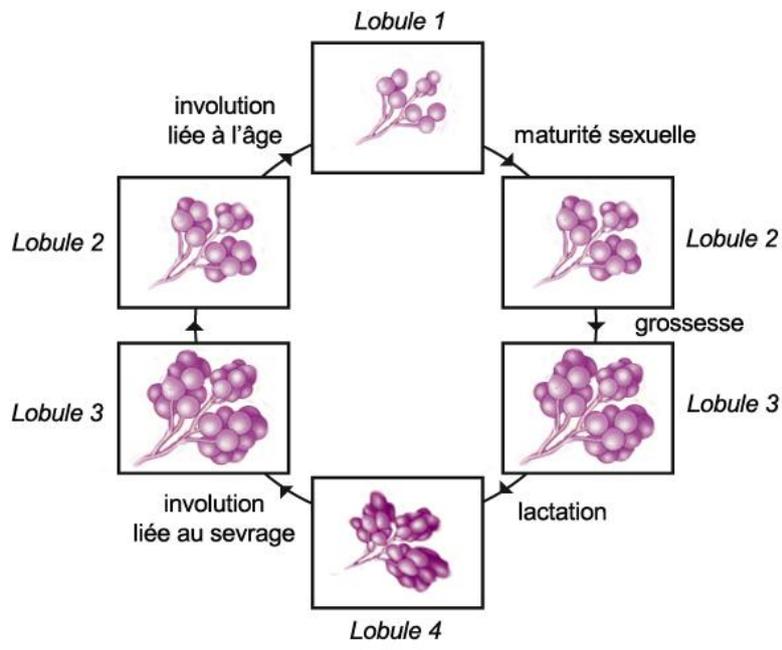
collagène de type IV, de laminine et de glycosaminoglycanes mais une coopération permanente existe entre eux au cours du développement de la glande mammaire.

Les vaisseaux sanguins et lymphatiques circulent dans les tissus conjonctifs et adipeux. Le drainage par les vaisseaux lymphatiques s'effectue vers la chaîne mammaire interne, les ganglions axillaires et sus-claviculaires.

L'architecture de la glande mammaire évolue tout au long de la vie, en fonction de l'âge et du stade de la vie reproductive <sup>12</sup> (Figure 2) et se construit sous l'influence des hormones sexuelles d'origine ovarienne (œstrogènes et progestérone) et d'un certain nombre de facteurs de croissance.



**Figure 1 : Représentation schématique d'un sein en coupe**



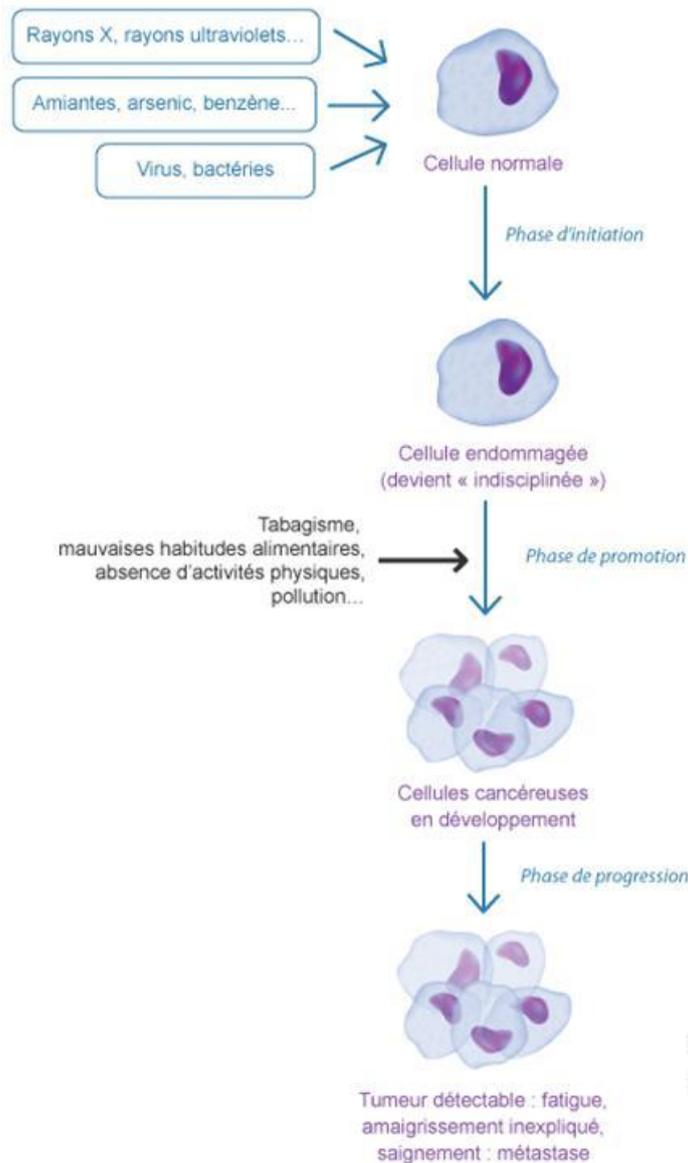
**Figure 2 : Evolution de l'architecture de la glande mammaire**

**b) Processus de cancérogénèse**

Comme décrit précédemment, la glande mammaire est un organe en évolution permanente sous l'influence d'hormones et de facteurs de croissance. Ceci en fait un organe à part du point de vue du nombre de cellules en croissance et en différenciation, et donc le rend plus susceptible aux transformations cancéreuses.

Un cancer est cliniquement décelable lorsqu'il est constitué de  $10^9$  cellules. Toutes les cellules cancéreuses (cellule-filles) sont issues d'une seule cellule devenue cancéreuse ou transformée (cellule-mère), c'est-à-dire qui a échappé aux mécanismes de contrôle de la division cellulaire et par conséquent, se multiplie de façon anarchique par expansion clonale <sup>13</sup>.

Le processus de cancérogénèse est long et comporte quatre phases : l'initiation, la promotion, la progression et l'invasion (Figure 3).



**Figure 3 : Les différentes phases de la cancérogénèse**

- **L'initiation** est la première phase de la cancérogénèse, elle ne concerne qu'une seule cellule, ainsi "initiée" sur la voie de la cancérisation. Cette phase correspond à l'introduction dans l'ADN d'une ou plusieurs lésions, transmissibles au génome des cellules filles. Ces modifications sont dues soit à une erreur au cours de la multiplication de la cellule, soit à d'autres facteurs qui lui sont toxiques, ils sont dits génotoxiques et peuvent être d'origine chimique, physique ou biologique. Il existe des systèmes capables d'effectuer des réparations de l'ADN qui sont fidèles dans la majorité des cas, cependant ils peuvent se révéler infidèles ou fautifs, et dans ce cas réparer des lésions en insérant d'autres erreurs. L'accumulation des anomalies génétiques aboutit alors à des mutations de gènes importants dans le maintien de l'intégrité et des caractéristiques de chaque type cellulaire.

L'initiation, ou transformation cellulaire, comporte deux éléments majeurs : l'immortalisation et la perte d'homéostasie. L'homéostasie est normalement caractérisée par un équilibre divisions/morts qui assure le maintien de la taille et de la fonctionnalité d'un organe. Les cellules cancéreuses perdent la sensibilité aux signaux qui régulent la prolifération. Les mutations peuvent toucher des zones non-codantes de l'ADN ou des gènes. Parmi ces derniers, on peut trouver les gènes responsables de la métabolisation des cancérigènes chimiques, du contrôle de réparation ou des réactions biochimiques du cycle cellulaire. Deux classes de gènes ont un rôle fondamental en cancérogénèse : les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur.

Les proto-oncogènes codent pour des protéines de régulation des signaux de transduction, des facteurs de croissance, des protéines kinases et stimulent la croissance cellulaire. Les proto-oncogènes mutés (*ras* et *fos*) deviennent parfois des oncogènes actifs. La mutation peut entraîner un gain de fonction, il y a alors stimulation de la prolifération et/ou dérégulation de la différenciation cellulaire<sup>14</sup>. Certains oncogènes déclenchent une surproduction de facteurs de croissance comme le TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor- $\alpha$ ) qui peut provoquer la prolifération des cellules qui les ont produits. D'autres oncogènes perturbent la cascade des signaux cytoplasmiques, par exemple, le gène *Ras* muté code pour des protéines constitutivement actives, ou les oncogènes *myc* perturbent l'activité des facteurs de transcription<sup>13</sup>.

Quant aux gènes suppresseurs de tumeur, ils font l'objet d'événements génétiques qui entraînent une perte de fonction, ces gènes codent pour des protéines régulant négativement la prolifération cellulaire. Par exemple, le gène p53, dont le rôle est d'arrêter le cycle cellulaire afin d'effectuer les réparations de l'ADN, code pour une protéine dont les mutations sont fréquentes dans les cancers humains et favorisent la croissance cellulaire tumorale<sup>15</sup>. Par ailleurs, certaines cellules cancéreuses deviennent insensibles au facteur TGF $\beta$  qui bloque habituellement la croissance codant pour un des récepteurs de ce facteur<sup>13</sup>.

Les cellules initiées peuvent alors rester dans cet état quiescent durant plusieurs années ou peuvent passer à l'état de prolifération cellulaire sous l'effet d'un agent promoteur.

- **La promotion** est appelée "transformation cellulaire", cette phase recouvre la réception par la cellule initiée de facteurs de prolifération qui vont entraîner les divisions. Ces signaux vont donc pérenniser les anomalies au cours des divisions et ainsi assurer la descendance de la cellule anormale par prolifération clonale, qui va de surcroît accumuler de nouvelles anomalies génétiques. A un stade précoce, ce phénomène peut être réversible.

Les promoteurs tumoraux ont un rôle spécifique au niveau d'un tissu donné. Par exemple, les œstrogènes jouent un rôle de promoteur au niveau du sein, mais pas au niveau du côlon <sup>16</sup>.

Les mécanismes de la promotion tumorale sont de nature épigénétiques et participent à la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. La surexpression des oncogènes et/ou la répression des gènes suppresseurs de tumeur provoquent une stimulation de la croissance des cellules initiées. La perturbation des systèmes de signalisation cellulaire (facteurs de croissance, hormones, récepteurs, protéines cytoplasmiques) joue un rôle prépondérant dans la phase de promotion, de même que l'inhibition de la communication intercellulaire. Le résultat de l'altération de l'expression de ces gènes consiste généralement en une cellule qui continue de se diviser indépendamment des signaux physiologiques qui contrôlent la croissance normale <sup>17</sup>.

- **La progression** correspond à la période au cours de laquelle les phénomènes amorcés vont évoluer vers un état d'irréversibilité. A ce stade, il y a émergence et croissance d'une tumeur maligne. Cette phase correspond à l'acquisition de l'indépendance de la croissance tumorale et de l'expression phénotypique de la malignité. La cellule a totalement échappé aux mécanismes de régulation gérés par l'organisme, des événements génétiques comme les translocations, les recombinaisons, les remaniements génétiques et un nombre important de mitoses instaurent une grande instabilité génomique qui s'accroît avec le temps et aboutit à une sélection de clones de plus en plus diversifiés <sup>18</sup>.

- **L'invasion** se traduit par une infiltration de cellules tumorales dans les tissus avoisinants. Pour cela, les cellules tumorales doivent d'abord détruire l'adhésion existante entre les cellules et entre les cellules et la matrice extracellulaire. La famille des cadhérines a été documentée pour son rôle important dans l'adhésion cellulaire et il est désormais démontré qu'elle joue un rôle prédominant dans l'établissement de métastases de cancer du sein <sup>19</sup>. L'E-cadhérine, qui maintient les jonctions intercellulaires, est inhibée lors de l'invasion tumorale du cancer du sein <sup>20</sup> ce qui résulte en la perte d'adhésion entre les cellules tumorales épithéliales et les cellules épithéliales environnantes. En revanche, la N-cadhérine, qui est étroitement associée à la transition de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, est surexprimée dans les cellules tumorales <sup>21</sup> et permet ainsi l'adhésion des cellules tumorales aux cellules du stroma et donc petit à petit de l'invasion des cellules tumorales dans le stroma. L'adhérence des cellules tumorales à la matrice extra-cellulaire se fait ensuite grâce aux intégrines <sup>21</sup> qui sont des récepteurs membranaires trouvés à la surface des différents composants de la matrice, tels que les fibronectines, laminines, collagènes <sup>19</sup>. L'invasion se

poursuit par la dégradation de cette matrice réalisée principalement par les métalloprotéinases (MMPs) et le système uPA (urokinase plasminogen activator) qui est une sérine-protéase <sup>22</sup>.

- **L'angiogénèse et la lymphangiogénèse** sont d'autres phénomènes vitaux pour la progression de la tumeur et intrinsèquement reliés à l'invasion, il s'agit du développement de nouveaux capillaires sanguins et lymphatiques.

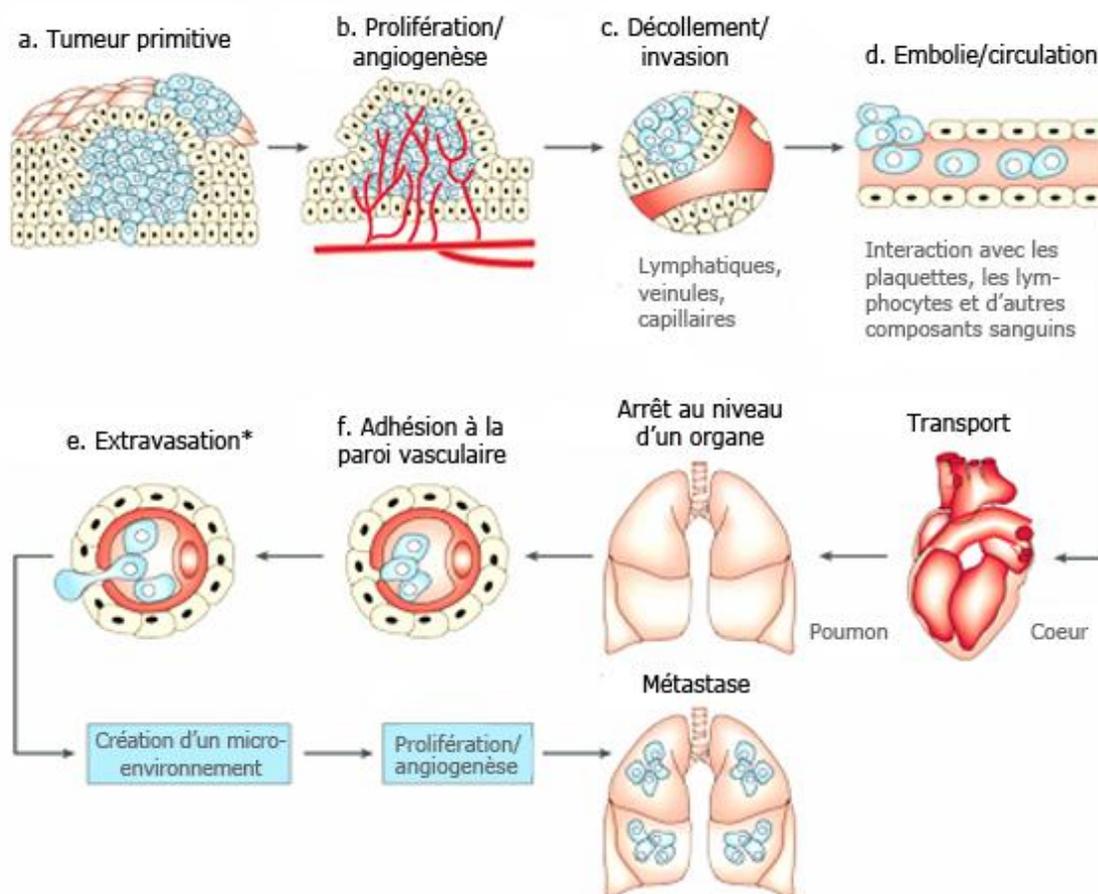
L'environnement tumoral est critique à ce moment, mutations génétiques, stress mécaniques, processus inflammatoires, expression tumorale de protéines angiogéniques et par-dessus tout l'hypoxie seraient à la base de l'angiogénèse<sup>23</sup>. Les néo-vaisseaux sont insuffisants à l'apport nécessaire en oxygène ce qui cause l'hypoxie tumorale et encouragent les programmes d'invasion et de métastase. De plus, les conditions d'hypoxie permettent à des facteurs, tel que l'HIF-1 (Hypoxia inductible factor-1) de déclencher la production de protéines angiogéniques. Parmi elles VEGF (vascular endothelial growth factor) et son récepteur VEGFR ont été largement étudiés. Via leurs récepteurs les différents VEGF stimulent généralement l'angiogénèse et la lymphangiogénèse, mais VEGF stimule également la prolifération, l'invasion et la migration des cellules endothéliales et augmente la perméabilité microvasculaire <sup>24</sup>.

### c) Processus métastatique

Les métastases sont des foyers tumoraux secondaires, issus de la tumeur primitive, et dont le développement autonome se réalise à distance du foyer initial. La disposition d'une tumeur primitive à disséminer ses cellules malignes dépend principalement, d'une part de l'instabilité génotypique et donc phénotypique de ses cellules, et d'autre part de l'incapacité du système immunitaire à réaliser la destruction des cellules tumorales.

- **La cascade métastatique** comprend une série d'étapes successives (Figure 4 – adapté de Fidler et al., 2003 <sup>25</sup>) et limitantes. Le phénomène de dissémination métastatique commence par l'invasion locale des tissus environnants le foyer initial, les cellules tumorales continuent alors leur invasion jusqu'à la rencontre d'un vaisseau sanguin ou lymphatique. Le passage des membranes basales vasculaires fait intervenir les processus déjà décrits pour l'invasion locale de la tumeur primitive, on parle alors d'intravasation <sup>26</sup>. Les cellules tumorales sont ainsi disséminées vers des tissus cibles distants, où elles adhèrent aux cellules endothéliales afin de retraverser la paroi des vaisseaux par extravasation. Durant toutes ces étapes les cellules tumorales doivent également échapper au système immunitaire de l'hôte et aux signaux apoptotiques. Si les cellules tumorales parviennent à franchir toutes ces étapes

elles pourront alors proliférer dans l'organe et ainsi développer une tumeur secondaire, ou métastase et ce phénomène pourra être répété, produisant plusieurs métastases <sup>26</sup>.



**Figure 4 : Principales étapes de la formation d'une métastase**

- **L'invasion**, comme décrite plus haut, met en jeu des molécules d'adhésion telles que les cadhérines et les intégrines, et des protéases capables de dégrader la matrice extracellulaire.

- **La migration** des cellules tumorales du site primaire tumoral est nécessaire à l'établissement de leur phénotype invasif. Une étape critique est la transition des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses <sup>21</sup>. Cette transition débute par la désintégration de l'adhésion cellulaire suite à l'altération des protéines d'adhérence comme les cadhérines et les intégrines, et l'expression de marqueurs mésenchymateux. La polarité cellulaire est également altérée à travers des changements morphologiques reposant sur le cytosquelette d'actine. Et enfin, des enzymes protéolytiques sont activées et l'adhésion à la matrice cellulaire est modifiée <sup>27</sup>.

## - Métastases du cancer du sein

Le microenvironnement des cellules tumorales métastatiques est critique pour leur prolifération. De nombreuses cellules spécialisées différentes, incluant les fibroblastes, les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les cellules murales des vaisseaux sanguins et lymphatiques, avec la matrice extracellulaire doivent former un microenvironnement approprié, nécessaire à la croissance tumorale ainsi qu'à la progression métastatique. Les cellules malignes sont en interaction constante avec ces cellules et semblent pouvoir influencer l'établissement de cet environnement favorable.

Ainsi l'on retrouve des sites préférentiels de métastases du cancer du sein (Figure 5). La dissémination métastatique du cancer du sein se fait principalement via les néovaisseaux lymphatiques, dans ce cas les chaînes ganglionnaires sont rapidement envahies avec des localisations au niveau des ganglions axillaires, mammaires internes, sus-claviculaires et ceux de la région du cou, et un envahissement régional peut aboutir à l'atteinte de la paroi thoracique. La dissémination métastatique se fait également via le nouveau réseau de vaisseaux sanguins et provoque généralement l'apparition des foyers secondaires au niveau des os, des poumons, du foie, du sein controlatéral, ou encore du cerveau.

Le "homing" des cellules tumorales dans certains tissus cibles implique en partie les chimiokines<sup>28</sup>. Par exemple, les tissus tumoraux du sein expriment fortement le récepteur à chimiokine 4 (CXCR4), tandis que son ligand CXCL12 est majoritairement exprimé dans les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et la moelle osseuse, et est faiblement exprimé dans le petit intestin, les reins, le cerveau, la peau et les muscles<sup>28</sup>.

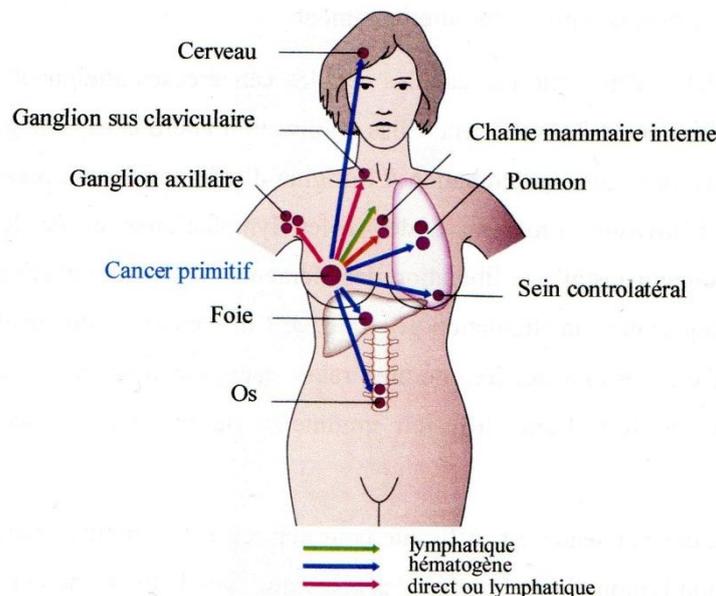


Figure 5 : Principaux sites métastatiques du cancer du sein

### 3-Diagnostic du cancer du sein

Le diagnostic du cancer du sein est établi à partir d'un examen clinique, de clichés mammographiques et échographiques et enfin d'un examen cyto-anatomopathologique.

#### a) L'examen clinique

L'examen clinique reste l'étape première de toute exploration de la glande mammaire. Il permet de localiser les lésions et de diriger les prélèvements histologiques si besoin.

- **La classification TNM** <sup>29</sup> (Tableau 1) est la classification clinique des cancers du sein de l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer). Elle a pour but de stadifier les carcinomes selon leur extension clinique et histopathologique, ce qui contribue à déterminer le traitement et à évaluer le pronostic de la maladie tumorale.

La classification TNM prend en compte la taille tumorale (T), l'atteinte ganglionnaire (N) et l'existence éventuelle de métastases (M). Cette classification distingue le stade clinique pré-thérapeutique noté "cTNM" et le stade anatomopathologique postchirurgical noté "pTNM".

A partir de la classification TNM, l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) a élaboré, en 1959, une classification simplifiée par stades, notée stades UICC (Tableau 2). Ces stades correspondent à un regroupement des TNM de l'UICC de pronostic identique. Cette classification permet de différencier d'une part, les stades précoces (stades I et II) des stades avancés (stades III et IV) et d'autre part, les cancers du sein opérables (stades I, II et IIIA) des cancers du sein inopérables (IIIB, IIIC et IV).

- **Les cancers du sein opérables** : les critères de non-opérabilité des cancers du sein ne sont pas des critères techniques rendant impossible l'exérèse chirurgicale mais des critères évolutifs qui rendent le geste thérapeutique local provisoirement secondaire devant la gravité du risque général. Ils sont présents dans les tumeurs dont le pronostic à court terme est le plus péjoratif. Ainsi les cancers du sein opérables correspondent aux cancers présentant un stade clinique ne dépassant pas le stade IIIA et excluent donc les cancers du sein localement avancés et/ou inflammatoires, décrits ci-dessous.

- **Les cancers du sein localement avancés (LABC)** regroupent des cancers du sein opérables d'une taille supérieure à 5 cm avec soit extension de la tumeur à la paroi thoracique ou envahissant directement la peau (causant ulcération, œdème en peau d'orange ou nodules satellites), soit des ganglions axillaires fixés, soit envahissement des ganglions de la chaîne

mammaire interne ipsilatérale ou des ganglions sus-claviculaires. Ils sont côtés T3 et T4 a, b et c dans la classification TNM de 2010.

<p><b>Tumeur primaire T</b></p> <p>Tx : La tumeur primitive ne peut pas être évaluée  T0 : La tumeur primitive n'est pas palpable</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tis : Carcinome in situ</li> <li>• Tis (DCIS) : Cancer intra-canalariare in situ</li> <li>• Tis (LCIS) : Cancer lobulaire in situ</li> <li>• Tis (Paget) : Maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente</li> </ul> <p>T1 : Tumeur <math>\leq 2</math> cm dans sa plus grande dimension  T1mic : Micro-invasion <math>\leq 1</math> mm dans son plus grand diamètre</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• T1a : 1 mm &lt; tumeur <math>\leq 5</math> mm dans sa plus grande dimension</li> <li>• T1b : 5 mm &lt; tumeur <math>\leq 1</math> cm dans sa plus grande dimension</li> <li>• T1c : 1 cm &lt; tumeur <math>\leq 2</math> cm dans sa plus grande dimension</li> </ul> <p>T2 : 2 cm &lt; Tumeur <math>\leq 5</math> cm dans sa plus grande dimension  T3 : Tumeur &gt; 5 cm dans sa plus grande dimension  T4 : Tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe à la paroi thoracique (a) ou à la peau (b)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• T4a : Extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral</li> <li>• T4b : Œdème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau du même sein</li> <li>• T4c : T4a + T4b</li> <li>• T4d : carcinome inflammatoire</li> </ul>
<p><b>Ganglions lymphatiques régionaux pN</b></p> <p>Nx : l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué (par exemple déjà enlevés chirurgicalement ou non disponibles pour l'analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement)</p> <p>N0 : Absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• N0(i-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, étude immunohistochimique négative (IHC)</li> <li>• N0(i+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, IHC positive, avec des amas cellulaires <math>\leq 0,2</math> mm (considéré comme sans métastase ganglionnaire)</li> <li>• N0(mol-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire négative (RT-PCR : reverse transcriptase polymerase chain reaction)</li> <li>• N0(mol+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire positive (RT-PCR)</li> </ul> <p>N1mi : micrométastases &gt; 0,2 mm et <math>\leq 2</math> mm  N1 : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et/ou envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• N1a : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires</li> <li>• N1b : envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• N1c : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique (pN1a + pN1b)</li> </ul> <p>N2 : Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• N2a : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire &gt; 2 mm</li> <li>• N2b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire</li> </ul> <p>N3 : Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• N3a : Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires (avec au moins un amas cellulaire &gt; 2 mm) ou envahissement des ganglions sous-claviculaires</li> <li>• N3b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique</li> <li>• N3c : envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux</li> </ul>
<b>Métastases à distance (M)</b>
<p>Mx : Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance</p> <p>M0 : Absence de métastases à distance</p> <p>M1 : Présence de métastase(s) à distance</p>

**Tableau 1 : Classification TNM du cancer du sein, 7<sup>e</sup> édition 2010**

Stade	TNM
0	Tis N0 M0
I	T1 N0 M0
IIA	T0 N1 M0 ; T1 N1 M0; T2 N0 M0
IIB	T2 N1 M0; T3 N0 M0
IIIA	T0 N2 M0; T1 N2 M0; T2 N2 M0; T3 N1 M0; T3 N2 M0
IIIB	T4 N0 M0; T4 N1 M0; T4 N2 m
IIIC	Tous T N3 M0
IV	Tous T Tous N M1

**Tableau 2 : Stades UICC du cancer du sein, 7<sup>e</sup> édition 2010**

- **Les cancers du sein inflammatoires (IC)** sont définis par la survenue concomitante d'une tumeur mammaire et de signes inflammatoires locaux, ce qui n'est pas le cas des cancers du sein localement avancés, négligés, secondairement inflammatoires. Comme pour un cancer localement avancé, le sein est lourd, tendu, douloureux, chaud, érythémateux. La palpation, gênée par l'œdème cutané, n'individualise pas toujours une tumeur.

Les cancers du sein inflammatoires sont codés T4d dans la classification TNM de 2010. Ils sont le plus souvent diagnostiqués devant des signes cutanés inflammatoires accompagnant la tumeur maligne. Cependant, en pratique, la distinction entre les LABC et les IC n'est pas forcément rigoureuse : les signes inflammatoires pouvant apparaître d'emblée ou secondairement.

Pour mieux individualiser ces formes graves de cancer du sein, pour en harmoniser les traitements, l'institut Gustave-Roussy de Villejuif a introduit il y a une vingtaine d'années la notion de poussée évolutive : PeV. La PeV est basée sur l'augmentation de la taille de la tumeur et sur la présence ou non de signes inflammatoires. Elle comprend quatre stades :

-PeV 0 : absence de signe évolutif

-PeV 1 : existence d'une tumeur à temps de croissance rapide (doublement de la taille clinique avec doublement intratumoral, dans les six mois précédant la consultation, sans manifestation inflammatoire)

-PeV 2 : inflammation en regard de la tumeur (œdème et/ou érythème)

-PeV 3 : inflammation des deux tiers du sein (mastite carcinomateuse).

Cette classification introduit la notion très subjective et sujette à caution de PeV 1. Pour cette raison, cette classification n'est pas admise par tous, elle n'est pas reconnue par les Anglo-Saxons et n'est pas intégrée dans le TNM.

#### b) Les examens mammographiques et échographiques

Dans la pratique courante, la mammographie et l'échographie complètent l'examen clinique du sein. La mammographie, par son excellente sensibilité (plus de 80%) est toujours l'examen de référence pour le diagnostic et la surveillance du cancer du sein. Il faut cependant souligner que 11 à 25% des cancers ne sont pas perçus lors du dépistage mammographique, soit parce qu'ils ne sont pas détectés (mammographie de mauvaise qualité, lésion de petite taille, faible densité par rapport à la glande environnante, inexpérience du radiologue), soit parce qu'ils sont incorrectement classés comme bénins (séméiologie d'une opacité apparemment bénigne, calcifications non spécifiques, asymétrie de densité mammaire). A ce moment-là, une échographie s'avère indispensable pour préciser le diagnostic. En effet, cet

examen peut mettre en évidence des lésions infra-mammographiques dans des seins denses ou affiner le diagnostic en cas de discordance radio-clinique. En outre, l'échographie présente l'avantage de pouvoir réaliser simplement et rapidement une cytoponction sous contrôle visuel. Elle augmenterait la sensibilité de la mammographie seule à plus de 90% <sup>30</sup>.

- **La classification ACR** est la classification radiologique de référence, d'abord décrite par les radiologues américains (ACR = American College of Radiologists), puis désormais adoptée en France.

Elle permet de décrire l'imagerie du sein (mammographie, mais aussi échographie et IRM) en classant les anomalies en fonction de leur aspect, selon le classement ci-dessous (Tableau 3):

- **D'autres techniques d'imagerie** ont vu leur intérêt croître dans le but de détecter de l'angiogénèse tumorale, afin d'améliorer le diagnostic et de limiter le nombre de biopsies chirurgicales diagnostiques pour des lésions bénignes: l'échographie-doppler permet d'affiner le diagnostic dans les tumeurs infracliniques occultes mammographiquement, la tomodensitométrie apparaît très intéressante dans le cadre des cancers inflammatoires car permet un bilan local, difficile à réaliser par les méthodes standards (mammographie et échographie). En cas de cancers volumineux, elle permet un bilan loco-régional et un suivi évolutif objectif sous chimiothérapie. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) nucléaire a un rôle reconnu pour résoudre les problèmes diagnostiques d'imagerie conventionnelle en post-thérapeutique après traitement conservateur ou pour l'exploration des prothèses en silicone. Du fait de sa grande sensibilité pour le diagnostic des cancers invasifs (>90%), elle est parfois utilisée pour l'évaluation préopératoire en cas de traitement conservateur, permettant la détection de tumeurs multicentriques et controlatérales cliniquement et radiologiquement muettes. Elle peut également être utilisée chez la femme jeune dont les seins, plus denses, ne permettent pas toujours une évaluation précise avec la mammographie.

Toutes ces techniques devront être plus amplement développées afin d'être utilisées en pratique courante.

<b>ACR1</b>	Seins strictement normaux, sans image même bénigne
<b>ACR2</b>	Seins présentant une/des images 100% rassurantes et identifiables comme bénignes. La surveillance doit alors être standard (tous les deux ans pour une femme sans antécédent, différente si antécédents particuliers).
<b>ACR3</b>	Présence d'une image d'allure bénigne mais dont la bénignité ne peut être affirmée à 100% (97% seulement). Seule une surveillance pourra affirmer la bénignité sur deux ans. Une biopsie n'est cependant pas nécessaire sauf cas exceptionnels ou si l'image se modifiait. Il est donc proposé un contrôle à 4 mois (images nodulaires) ou 6 mois (microcalcifications).
<b>ACR4</b>	Présence d'une image suspecte qui peut être une lésion bénigne, pré-cancéreuse, ou même un cancer dans 40% des cas environ. Une cytoponction ou biopsie est nécessaire rapidement pour affirmer le diagnostic de façon certaine.
<b>ACR5</b>	Présence d'une image très suspecte (97% de cancers). Une biopsie ou cytoponction est nécessaire pour affirmer le diagnostic et guider le geste opératoire.
<b>ACR0</b>	On ne peut conclure, plus d'éléments sont nécessaires (mammographie insuffisante, pas d'échographie, etc).

**Tableau 3 : Classification ACR**

### c) L'examen d'anatomopathologie

L'examen anatomopathologique permet d'établir le diagnostic de malignité à partir d'une biopsie ou d'une pièce opératoire. L'examen microscopique, sur biopsie ou pièce opératoire, permet de donner un type histologique et d'identifier plusieurs facteurs pronostiques (comme la différenciation et l'activité mitotique) et prédictifs (comme la recherche des récepteurs hormonaux) de la tumeur. L'examen macroscopique, sur pièce opératoire, permet de mesurer la taille tumorale, d'étudier les berges d'exérèse et donne une orientation diagnostique en fonction de l'aspect de la lésion.

- **Prélèvements anatomopathologiques** : Plusieurs sortes de prélèvements peuvent être réalisées : les cytoponctions, les microbiopsies et les macrobiopsies.

\* La cytoponction s'effectue avec des aiguilles de 20 à 25 G selon le type d'image, le volume du sein, la profondeur de la lésion et les habitudes du praticien. De faible coût et de réalisation facile pour une équipe entraînée, elle est particulièrement indiquée pour le drainage des kystes et des abcès. De plus, elle est d'une grande aide dans la surveillance des seins opérés, irradiés où des rétractions secondaires au traitement sont bien difficiles à différencier d'une reprise évolutive. Les faux positifs sont rares (<1%) et les faux négatifs variables selon les séries (2 à 5%). Les limites de la cytoponction sont les prélèvements insuffisants, fréquents pour les

opérateurs peu expérimentés, les faux négatifs, les difficultés parfois rencontrées à distinguer le bénin du malin. Le caractère *in situ* ou infiltrant des cancers ne peut jamais être affirmé.

Les biopsies ont l'avantage de ramener une « carotte » tissulaire sur laquelle peut être effectué un diagnostic histologique, avec précision du type tumoral, du caractère infiltrant, une recherche de multifocalité et de facteurs prédictifs et pronostiques.

Lors de la découverte d'une anomalie au cours d'une échographie et/ou d'une mammographie, une biopsie est réalisée sous anesthésie locale à l'aide d'une aiguille guidée, dans le sein, jusqu'à l'anomalie grâce à un appareil de radiologie ou d'échographie.

\* La microbiopsie est le prélèvement le plus courant, il est effectué avec une aiguille de 3 à 5 mm. Cette technique présente des limites pour le diagnostic des lésions infracliniques en raison de prélèvements insuffisants.

\* La macrobiopsie peut alors être indiquée, effectuée avec une aiguille de 5 à 10 mm, elle est désormais la technique de référence en ce qui concerne les microcalcifications afin d'éviter le recours aux biopsies chirurgicales

- **La classification histologique** (Tableau 4), est la classification des tumeurs en fonction de leur nature anatomo-pathologique, à ce jour utilisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Le cancer du sein se développe à partir d'un constituant histologique du sein, la plupart des lésions mammaires (98%) sont issues du revêtement des canaux galactophores ou des lobules, ce sont les carcinomes. Selon leur localisation, ils seront qualifiés de canaux (85 à 90% des cas) ou lobulaires (10 à 15%) (Figure 6).

\* Les carcinomes *in situ* ou non infiltrants correspondent à une prolifération carcinomateuse qui se développe dans la lumière des canaux ou des lobules, de proche en proche, sans franchir leur membrane, ni envahir le tissu conjonctif. Suivant la localisation de la prolifération, on individualise deux types de carcinome *in situ* :

1) Le carcinome canalaire *in situ*, englobe un groupe de lésions hétérogènes caractérisées par des aspects cliniques, mammographiques et histologiques très variés. Ces lésions peuvent être révélées cliniquement par la présence d'une tumeur, d'un écoulement mamelonnaire ou d'une maladie de Paget du mamelon. Toutefois, depuis la pratique généralisée du dépistage, le mode de révélation le plus fréquent est la présence de microcalcifications découvertes à la mammographie.

Il arrive que les CCIS infiltrent les tissus voisins et deviennent des cancers infiltrants <sup>31</sup>.

2) Le carcinome lobulaire *in situ* est une lésion rare, il représente 2 à 3% des cancers. N'ayant ni traduction macroscopique, ni mammographique, le CLIS est généralement découvert fortuitement histologiquement sur une pièce opératoire d'une patiente opérée pour une autre lésion, et est plutôt considéré comme un facteur de risque de développer un cancer du sein, en effet la fréquence de survenue d'un cancer infiltrant après le diagnostic de CLIS est de 10 à 20% selon les séries <sup>32</sup>.

Pour souligner la nature non-invasive des CLIS, il a été proposé le terme de néoplasie lobulaire intraépithéliale <sup>31</sup>.

\* Les carcinomes infiltrants ou invasifs sont de taille variable, de moins de 10 mm de diamètre dans des lésions dépistées par mammographie à plus de 8 cm. Cliniquement, ils se présentent comme des lésions fermes, et peuvent entraîner une rétraction cutanée ou une infiltration du muscle sous-jacent. La peau peut présenter un aspect "en peau d'orange" et le mamelon peut être rétracté. Les cancers infiltrants peuvent se propager vers les ganglions axillaires ou vers d'autres parties du corps.

La classification OMS des carcinomes infiltrants date de 1981, elle classe selon leurs aspects morphologiques, différents types de cancers infiltrants à pronostic inégal et donc nécessitant une prise en charge thérapeutique différente.

La fréquence des différents types de carcinomes infiltrants du sein est la suivante :

- carcinome canalaire : 75 à 80%
- carcinome lobulaire infiltrant : 10%
- carcinome mucineux : 3%
- carcinome tubuleux : 2%
- carcinome médullaire : 1 à 3%
- carcinome papillaire : 2%
- autres : 5%

1) Le carcinome canalaire infiltrant (CCI), forme la plus fréquente, se traduit le plus souvent par une tumeur palpable. Macroscopiquement, il s'agit d'une tumeur typiquement dure, stellaire, de contours irréguliers, blanchâtre. Très rarement, elle se présente comme une tumeur arrondie, bien limitée plutôt évocatrice d'autres types de cancers infiltrants (médullaire et mucineux).

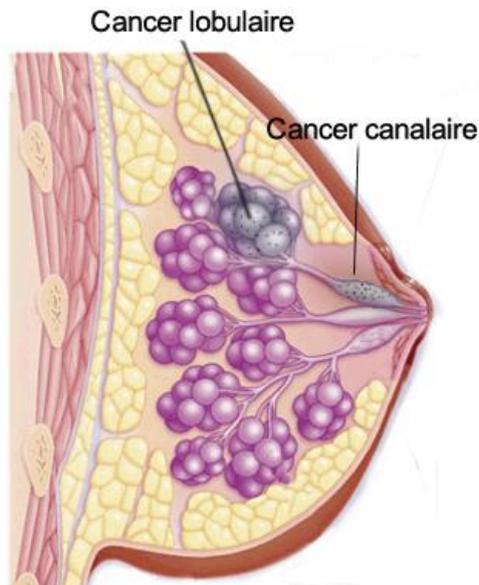
2) Le carcinome lobulaire infiltrant (CLI) peut se traduire par une tumeur palpable et/ou une opacité mammographique ; mais un caractère particulier du carcinome lobulaire infiltrant est sa présentation quasi muette sur le plan clinique ou radiologique. Ceci implique la découverte à un âge plus avancé avec une plus grande taille ou avec des métastases, de même la bilatéralité est plus importante (15-20%) que pour le CCI.

Macroscopiquement, la tumeur est de couleur grise, blanche ou beige clair. Le tissu mammaire ne paraît parfois pas anormal.

L'évolution du CLI se caractérise par des disséminations multiples, en particulier au niveau des séreuses (plèvre, péritoine) et des ovaires, entraînant une surveillance particulière de ces sites.

<b>Tumeurs épithéliales malignes :</b>
Carcinomes non infiltrants in situ
- intracanaux sans autre indication
- lobulaire in situ
Carcinomes infiltrants
- canalaire infiltrant sans forme commune
- canalaire infiltrant avec composante intracanaux prédominante
- lobulaire infiltrant
- mucineux
- médullaire
- papillaire
- tubuleux
- adénoïde kystique
- sécrétant
- apocrine
Carcinomes métaplasiques
- riche en glycogène
- à cellules en bague à chatons
- à cellules riches en lipides
- à différenciation neuro-endocrine
Maladie de Paget de mamelon
<b>Tumeurs malignes mixtes épithéliales et conjonctives :</b>
Sarcome phyllode
Carcinosarcome
<b>Autres tumeurs malignes :</b>
Mélanome
Angiosarcome
Autres sarcomes
Lymphomes
<b>Métastases intramammaires</b>

**Tableau 4 : Classification histologique de l'OMS**



**Figure 6 : Possibles localisations de cancer du sein**

### **- Classification moléculaire des sous-types de cancers du sein**

Jusqu'à la fin des années 1990, seules les données histologiques et cliniques permettaient de classer les différents types de cancer du sein mais, plus récemment, l'utilisation de techniques génomiques à haut débit comme les puces à ADN a permis d'y ajouter une caractérisation moléculaire. Les premières études d'expression génique des cancers du sein, notamment par Perou et al.<sup>33</sup> et Sorlie et al.<sup>34</sup> ont montré l'hétérogénéité de la maladie au niveau moléculaire, déjà suspectée au vu des données cliniques et histologiques.

Cinq sous-types majeurs de cancers du sein ont été définis comme suit lors de la 13<sup>e</sup> conférence internationale de Saint Gallen<sup>35</sup> sur le cancer du sein :

\* Le sous-type luminal A: récepteur aux oestrogènes (RE) et/ou à la progestérone (RP) positifs, HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) négatif, Ki-67 faible (<20%). C'est le sous-type le plus commun, représentant approximativement 50 à 60% des cancers du sein. La prolifération de ces tumeurs est lente et leur évolution plutôt favorable, elles sont caractérisées par une forte positivité des récepteurs aux hormones (RH) avec un fort potentiel de sensibilité à l'hormonothérapie et une faible chimiosensibilité.

\* Le sous-type luminal B (HER2-négatif): RE positifs, RP faibles ou négatifs, HER2 négatif, Ki-67 élevé ( $\geq 20\%$ ), représente 10% des tumeurs du sein et est caractérisé par une forte prolifération et un pronostic significativement moins bon que les luminaux A. La sensibilité endocrine dépend de l'expression des RH et la chimiosensibilité est plus élevée.

\* Le sous-type des tumeurs HER2 positives (HER2<sup>+</sup>) représente environ 15% des cancers du sein, également divisé en 2 sous-catégories : tumeurs pures HER2<sup>+</sup> avec RH négatifs (non luminales): HER2 surexprimé et RH absents, et tumeurs luminales HER2<sup>+</sup> avec RH positifs. Ces tumeurs agressives présentent une forte prolifération et un mauvais pronostic, et sont caractérisées par une forte sensibilité aux thérapies anti-HER2 et aux chimiothérapies, alors que la sensibilité endocrine est faible pour les luminaux.

\* Le sous-type triple-négatif (TN): RH absents et HER2 négatif, apparaît dans 15 à 20% des cas et est particulièrement agressif avec de forts taux de rechute et un mauvais pronostic. Jusqu'à 90% des cancers TN sont basaux, avec une surexpression de kératines basales et/ou d'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Ce sous-type, traité classiquement par chimiothérapie, ne dispose pas encore de thérapie spécifique mais plusieurs cibles potentielles figurent dans la liste des gènes surexprimés (kinases, gènes du cycle...).

La différence entre ces sous-types est importante, si bien qu'il devient de plus en plus admis qu'il s'agit de maladies différentes. Si cette classification permet déjà de dégager des groupes de pronostic différent, elle exige également leur reconnaissance en routine et l'intégration progressive de la classification moléculaire ajoutée à la classification histoclinique existante devrait permettre une meilleure approche des traitements <sup>36</sup>.

Ainsi, les thérapies ciblées ont permis d'améliorer les taux de survie des sous-types HER2-positifs ou RH-positifs, cependant la chimiothérapie cytotoxique reste la seule option thérapeutique des cancers TN. L'identification de cibles moléculaires est alors critique pour améliorer l'espérance de vie de ces patientes qui n'est aujourd'hui pas supérieur à un an <sup>37</sup>, mais celle-ci est rendue difficile par l'hétérogénéité de ce groupe. En effet, les analyses d'expression génique du cancer du sein TN ont récemment identifié 6 sous-types distincts, qui jouent chacun un rôle biologique unique et répondent différemment aux thérapeutiques actuelles <sup>38</sup>.

Les cancers TN sont alors classés comme suit:

- **BL1** (BL pour basal-like) caractérisé par une signature génique enrichie de gènes du cycle cellulaire et de la réponse aux dommages de l'ADN,
- **BL2** caractérisé par une surexpression de la signalisation des facteurs de croissance et des marqueurs myoépithéliaux,

- **M** et **MSL** sont deux sous-types mésoenchymateux avec une forte expression des gènes impliqués dans la différenciation et la signalisation des facteurs de croissance,
- **IM** est un sous-type immuno-modulateur qui surexprime les gènes liés aux processus cellulaires immunitaires,
- et **LAR** est un sous-type luminal qui a la particularité d'exprimer des récepteurs aux androgènes.

## **Chapitre 2 : Les facteurs prédictifs et pronostiques des cancers du sein**

Le cancer du sein est une maladie hétérogène, qui varie aussi bien par ses caractéristiques cliniques et morphologiques que par le profil biologique de chaque tumeur. La diversité des tumeurs induit des différences de réponse thérapeutique et de survie à stade égal. Dans le but de pouvoir attribuer de façon optimale un traitement à un patient donné, il a alors été nécessaire de définir deux types de facteurs :

Des facteurs permettant de prédire une réponse ou une résistance à un traitement donné, *les facteurs prédictifs*.

Des facteurs permettant de prédire l'évolution clinique de la maladie, c'est-à-dire le risque de récurrence, d'apparition de métastases ou de mortalité, en l'absence de tout traitement adjuvant, *les facteurs pronostiques*.

Dans cette partie, nous nous intéresserons à la valeur prédictive et/ou pronostique de différents facteurs qui ont été étudiés ou qui le sont encore actuellement. Chaque facteur peut être potentiellement à la fois prédictif et pronostique.

Dans le cadre d'un traitement néoadjuvant, les facteurs prédictifs sont potentiellement évaluables sur les biopsies réalisées au diagnostic, avant tout traitement, il en est de même pour les facteurs pronostiques, mais ceux-ci sont également évaluables sur les pièces opératoires mammaires et/ou sur les prélèvements du curage de la région axillaire.

### **1-Les facteurs cliniques**

#### **a) L'âge et le statut ménopausique (valeur prédictive et pronostique)**

Plusieurs études ont démontré que les patientes âgées de moins de 40 ans au moment du diagnostic ont une moins bonne survie et un taux de rechutes locorégionales plus important<sup>39</sup>. Ces études ont aussi mis en évidence que le jeune âge est souvent associé à des

paramètres de mauvais pronostic comme une taille plus importante, un stade et un grade histologique SBR (Scarff-Bloom et Richardson) élevés et des récepteurs hormonaux négatifs, ainsi qu'une proportion de tumeurs HER2-positives plus élevée<sup>40</sup>.

Si l'état ménopausique n'a aucune influence pronostique, il existe un consensus sur son pouvoir de sélection thérapeutique. Dès le début des tentatives de traitement adjuvant, la chimiothérapie est apparue plus efficace pour les femmes ayant moins de 60 ans tandis que l'hormonothérapie bénéficie principalement aux femmes ménopausées<sup>41</sup>.

#### b) La taille et le stade cliniques (valeur pronostique)

La taille de la tumeur se place en première ou en deuxième position dans toutes les analyses multifactorielles. Plusieurs études rapportent que la taille tumorale clinique et le stade ont une valeur pronostique, aussi bien chez les patientes N<sup>+</sup> que N<sup>-</sup><sup>42,43</sup>.

En situation néoadjuvante, plusieurs études rapportent également la valeur pronostique de la taille tumorale et du stade clinique. Ainsi, une étude de Jacquillat et al.<sup>44</sup> montre que la taille tumorale initiale (p=0,001), le statut ganglionnaire initial (p=0,0019) et le stade tumoral initial (p=10<sup>-4</sup>) sont prédictifs de la survie globale et de la survie sans rechute. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Bonadonna et al.<sup>45</sup>.

## 2-Les facteurs histopathologiques

#### a) L'envahissement ganglionnaire (valeur pronostique)

C'est le facteur pronostique le mieux connu et le plus important en cancérologie mammaire<sup>46</sup>. On l'évalue à partir de l'analyse histologique des ganglions prélevés dans le curage de la région axillaire. Pendant longtemps, les patientes présentant une atteinte ganglionnaire (N<sup>+</sup>) étaient subdivisées en 3 sous-populations en fonction du nombre de ganglions envahis : 0, 1-3, 4 et plus. Actuellement, 4 sous-groupes sont proposés : 0, 1-3, 4-7, 8 et plus ou 0, 1-3, 4-9, 10 et plus.

De nombreuses études ont corrélé la survie globale et la survie sans rechute au nombre de ganglions envahis, les patientes N<sup>-</sup> ont un meilleur pronostic que les patientes N<sup>+</sup>. Les premières études remontent aux années 80. Sur une étude incluant plus de 20 000 patientes ayant subi seulement une chirurgie, les auteurs ont montré que le pronostic des malades N<sup>+</sup> était plus mauvais que celui des malades N<sup>-</sup><sup>47</sup>. De plus, le pronostic est d'autant plus péjoratif que le nombre de ganglions envahis est important. Ainsi, à 5 ans, chez les patientes N<sup>-</sup>, la

survie globale était de 71,8%, elle était de 63,1% chez les patientes présentant un ganglion envahi, de 51,9% chez les patientes ayant 4 ganglions envahis et elle chute à 40,7% chez les patientes possédant entre 6 et 10 ganglions envahis.

D'autres études ont montré que la survie globale et la survie sans rechute étaient inversement proportionnelles au nombre de ganglions envahis chez des patientes ayant reçu une chimiothérapie adjuvante <sup>48</sup>.

Cette conclusion a parfois mené à des controverses au sujet de la chimiothérapie néoadjuvante (CTNA) car il a été démontré que le nombre de ganglions envahis pouvait significativement varier chez des patientes répondant bien à la CTNA <sup>49</sup>, mais il a ensuite été prouvé que le nombre de ganglions résiduels suite à une CTNA est un facteur pronostique aussi valable que le nombre de ganglions positifs évalué avant chimiothérapie adjuvante <sup>50</sup>.

La puissance pronostique du nombre de ganglions résiduels chez des patientes ayant reçu une CTNA a effectivement été démontrée par plusieurs études <sup>45,51,52</sup>.

#### b) La taille histologique (valeur pronostique)

La mesure histologique de la tumeur est beaucoup plus précise que la mesure clinique. Il a été montré que la taille tumorale histologique était un facteur pronostique puissant de la survie globale et de la survie sans rechute, et ce, aussi bien chez des patientes ayant reçu une chimiothérapie adjuvante <sup>45</sup>, que chez des patientes ayant reçu une CTNA <sup>53</sup>.

#### c) La réponse pathologique complète (pCR) (valeur pronostique)

La pCR, ou réponse histologique complète, est évaluée après la CTNA et combine l'envahissement ganglionnaire et la taille tumorale histologique. Dans de nombreux essais cliniques néoadjuvants les patientes atteignant une pCR ont montré une meilleure survie à long terme, indiquant la pCR comme un facteur pronostique fort <sup>54,55</sup>. Ceci est particulièrement avéré lorsque le sein et le creux axillaire sont libres de tout cancer invasif <sup>55</sup>. En effet, il est nécessaire de souligner que le taux de pCR varie selon les études, et ce en partie à cause des différentes classifications employées. En effet, l'absence de tumeur invasive dans le sein seulement ou dans le sein et les ganglions, ainsi que l'absence ou non de tumeur *in situ*, également dans le sein seulement ou dans le sein et les ganglions ne sont pas encore établies et une définition précise et uniforme de la pCR est encore requise.

Concernant la présence résiduelle de carcinome *in situ*, son influence pronostique n'est pas encore totalement claire. Dans une étude rétrospective sur 2302 patientes atteintes de cancer du sein et traitées par CTNA, 3,4% ont présenté une pCR dans le sein et le creux axillaire et 8,6% avaient un carcinome *in situ* résiduel. Il n'y avait pas de différence concernant les taux

de SSR à 10 ans (81 *versus* 82%) et de SG à 10 ans (92 *versus* 93%)<sup>56</sup>. En revanche, une analyse poolée de 7 essais randomisés incluant 6377 patientes a montré une différence, petite mais significative, de SSR entre les patientes sans aucune maladie résiduelle et celles avec du CCIS résiduel, ainsi qu'une tendance pour une meilleure SG<sup>57</sup>.

Il est à noter que la valeur pronostique de la pCR est valable lorsqu'on ne différencie pas les sous-types moléculaires, en effet, lorsque ceux-ci sont pris en compte, les taux de pCR diffèrent considérablement: les tumeurs luminales A obtiennent de faibles taux de pCR, les luminales B un taux intermédiaire, tandis que les tumeurs triple négatives et celles surexprimant le récepteur HER2 obtiennent de bons taux de pCR. Cela représente la seconde raison de la variation du taux de pCR selon les études. Pour exemple, l'équipe de Ooe et al.<sup>58</sup> obtient des taux de pCR de 10%, 19%, 42% et 59% respectivement pour chaque sous-type. De plus, l'impact pronostique n'est pas le même: pour les tumeurs Luminales A et B ainsi que pour les tumeurs surexprimant le récepteur HER2 et les RH la pCR n'est pas associée au pronostic, alors que pour les patientes présentant des tumeurs hautement prolifératives comme les cancers TN et les tumeurs surexprimant le récepteur HER2 (RH<sup>+</sup>) la pCR peut discriminer précisément les bons *versus* les mauvais pronostics<sup>57,59</sup>.

#### d) Le grade histologique (valeur pronostique)

La morphologie des cellules tumorales ainsi que le nombre de mitoses sont variables. Ces différents caractères morphologiques: différenciation, pléiomorphisme nucléaire et nombre de mitoses, sont à la base de divers gradings histopronostiques. Actuellement le grade le plus utilisé est celui de Scarff-Bloom et Richardson (SBR)<sup>60</sup>.

Le grade SBR est basé sur la somme de trois scores, déterminés à partir de 3 caractéristiques histologiques indépendantes: le degré de différenciation architecturale, l'étendue du pléiomorphisme et de l'anisocaryose, et le taux de mitoses (Tableau 5). Le score total permet ainsi de séparer les tumeurs en 3 catégories: grade I pour les tumeurs très différenciées, grade II pour les tumeurs moyennement différenciées et grade III pour les tumeurs faiblement différenciées. Ce grade est utilisé pour tous les carcinomes infiltrants de type canalaire.

Le grade SBR a été critiqué du fait que 50 à 60% des tumeurs sont classées dans le grade II; or, ce grade regroupe à la fois des patientes qui évoluent très favorablement et d'autres qui évoluent très défavorablement. Afin d'affiner la classification SBR, Le Doussal et al.<sup>61</sup> ont créé un grade SBR modifié, le MSBR, en éliminant du score final la différenciation. Ce grade comprend 5 subdivisions basées sur le pléiomorphisme nucléaire et l'index mitotique (Tableau 6). Les cinq grades sont eux-mêmes subdivisés en deux groupes pronostiques: un groupe à faible risque métastatique, regroupant les grades MSBR 1, 2 et 3,

et un groupe à haut risque métastatique (2 fois plus de risque que dans le premier groupe), regroupant les grades MSBR 4 et 5.

Quel que soit le système d'évaluation du grade histologique utilisé, il constitue un facteur pronostique important et indépendant pour le risque métastatique et la survie des patientes. Plusieurs études ont montré que la survie globale et la survie sans rechute sont meilleures chez des patientes présentant une tumeur très différenciée (grade I) comparé à des patientes présentant une tumeur moyennement (grade II) ou peu différenciée (grade III), et ce en situation adjuvante<sup>62</sup> comme en néoadjuvante<sup>51,53</sup>.

Paramètres	Score	Grade tumoral total
<b>Formation de tubes</b>		La somme des différents scores obtenus aboutit à un total de 3 à 9 à partir duquel la tumeur est classée en 3 grades.
Majoritaire (> 75%)	1	
Modérée (10-75%)	2	
Faible ou nulle (< 10%)	3	
<b>Pléiomorphisme nucléaire</b>		
Variations de taille et de forme des noyaux très discrètes	1	
Variations de taille et de forme des noyaux modérées	2	<b>Grade I : 3, 4, 5</b>
Variations importantes de taille et de forme des noyaux	3	<b>Grade II : 6, 7</b>
<b>Index mitotique</b>		<b>Grade III : 8, 9</b>
Moins de 10 mitoses pour dix champs au grossissement 400	1	
Entre 10 et 20 mitoses pour dix champs au grossissement 400	2	
Plus de 20 mitoses pour dix champs au grossissement 400	3	

**Tableau 5. Grade SBR selon Elston et Ellis (1991)**

Pléiomorphisme nucléaire	Index mitotique	Grade tumoral total
1	1	<b>1</b>
1	2	<b>2</b>
2	1	
2	2	<b>3</b>
1	3	
3	1	
2	3	<b>4</b>
3	2	
3	3	<b>5</b>

**Tableau 6. Grade MSBR selon Le Doussal et al (1989)**

e) L'index mitotique (valeur prédictive et pronostique)

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe ci-dessus, l'index mitotique est l'un des 3 composants du grade SBR. C'est un des plus anciens paramètres étudiés, qui était le moyen le plus simple d'apprécier la prolifération cellulaire, valeur prédictive de la tumeur.

En situation adjuvante, l'étude d'Andre et al.<sup>63</sup> rapporte qu'un index mitotique élevé (3) est associé à un grade SBR III et à des récepteurs hormonaux négatifs ( $p < 0.001$ ), et qu'il est prédictif d'un bénéfice apporté par la chimiothérapie adjuvante.

En situation néoadjuvante, les travaux de Zambetti et al.<sup>64</sup> rapportent qu'un index mitotique élevé (3) est prédictif d'une réponse pathologique complète (pCR): le taux de pCR chez des patientes traitées par chimiothérapie et présentant un index mitotique élevé (3) est nettement supérieur à celui de patientes ayant un index mitotique plus faible (1+2) : 26% versus 6%.

Parmi les trois composantes du grade histologique SBR, l'index mitotique est également le facteur pronostique le plus puissant. Dans ce sens, il a été démontré que plus une tumeur présente un indice mitotique élevé, plus les survies globale et sans rechute diminuent<sup>65</sup>.

f) Le type histologique (valeur prédictive et pronostique)

Des études ont été réalisées afin de savoir si le type histologique influençait la réponse au traitement. D'après les travaux de Cocquyt et al.<sup>66</sup>, le taux de réponse objective à une CTNA est significativement plus élevé avec un cancer canalaire qu'avec un cancer lobulaire (75% versus 50%,  $p = 0.015$ ), et les taux de pCR présentent également une différence

significative en faveur des cancers canaux (15% versus 0%,  $p=0.007$ ). Des résultats similaires sont retrouvés par Cristofanilli et al.<sup>67</sup> concernant la pCR : 15% versus 3%,  $p<0.001$ .

Les deux études citées ci-dessus ont également cherché à évaluer l'impact pronostique du type histologique. Bien que la taille tumorale post-chimiothérapie soit plus élevée en présence d'un cancer lobulaire, la survie sans rechute (SSR) et la survie globale (SG) à 5 ans sont meilleures dans le groupe des cancers lobulaires que dans le groupe des cancers canaux (SSR, 87% versus 66%,  $p=0.004$  ; SG, 93% versus 70%,  $p=0.001$ ). Les auteurs rapportent néanmoins que dans le groupe des cancers lobulaires, les patientes sont plus âgées et la tumeur présente significativement plus de récepteurs oestrogéniques positifs, soit la possibilité de bénéficier d'une hormonothérapie.

Plus récemment une étude de Nagao et al.<sup>68</sup> comparant 500 tumeurs invasives canaux à 62 tumeurs de tous autres types a confirmé la valeur prédictive et pronostique du type histologique du cancer du sein.

#### g) La présence d'embols (valeur pronostique)

L'invasion de la membrane basale constitue un phénomène majeur du développement du cancer. Elle modifie considérablement le pronostic : dès l'invasion de la membrane basale, les mêmes mécanismes de pénétration des membranes vont pouvoir être utilisés pour l'invasion des capillaires lymphatiques et sanguins. Dans la circulation, les cellules cancéreuses ne prolifèrent pas. Elles doivent résister à des agressions mécaniques et pour cela, elles ont tendance à s'agréger en formant des embols. Plusieurs études ont retrouvé que la présence d'embols est un facteur de mauvais pronostic. Une étude comparant les taux de survie sans rechute à 2 ans chez 232 patientes traitées par mastectomie et curage axillaire +/- radiothérapie a trouvé des taux de récurrence respectifs de 40% et de 20,5% selon la présence ou non d'embols ( $p<0.005$ ). Au total, 53.4% des patientes présentant des embols ont rechuté<sup>69</sup>. Par ailleurs, une étude publiée par Houvenaeghel et al.<sup>70</sup> rapporte que la présence d'embols est un facteur prédictif significatif de l'envahissement ganglionnaire ( $p<10^{-6}$ ), qui est également un facteur de mauvais pronostic.

### 3-Les biomarqueurs d'intérêt thérapeutique

Les biomarqueurs sont des molécules présentes à la surface ou à l'intérieur des cellules tumorales, il peut s'agir de protéines ou de gènes.

L'introduction des techniques de protéomique et de génomique au cours de ces quinze dernières années a permis une meilleure caractérisation de la biologie du cancer et a démontré que de meilleurs facteurs prédictifs et/ou pronostique que les classiques facteurs clinicopathologiques détaillés ci-dessus existent <sup>71</sup>.

Selon la 12<sup>ème</sup> conférence internationale sur le cancer du sein de St Gallen <sup>35</sup> différents sous-types moléculaires de cancer du sein sont décrits sur la base de 4 biomarqueurs, désormais détectés par techniques immunohistochimique (IHC) en routine: RE, RP, HER2 et Ki-67. Ces biomarqueurs affectent le pronostic et donc le choix de thérapies spécifiques <sup>72</sup>.

#### a) Les récepteurs hormonaux (valeur prédictive et pronostique)

Les récepteurs hormonaux (RH) stéroïdiens et plus précisément les récepteurs aux oestrogènes (RE) et à la progestérone (RP) sont les protéines effectrices de la réponse biologique des hormones stéroïdiennes dans les cellules mammaires. Ce sont des facteurs de transcription, localisés dans le noyau cellulaire. Ils lient, chacun de façon spécifique, une hormone stéroïde et cette liaison leur permet de reconnaître des séquences d'ADN spécifiques au niveau du noyau, puis d'activer la transcription des gènes spécifiques. Les récepteurs hormonaux sont présents dans les cellules des lobules et des galactophores de la glande mammaire normale. Ils sont plus fortement exprimés dans les adénocarcinomes lobulaires et canaux bien différenciés.

Les RH, et plus particulièrement les RE, sont les seuls marqueurs prédictifs jusqu'alors validés dans le cadre d'un traitement par hormonothérapie et utilisés en routine dans la décision thérapeutique <sup>73</sup>. La présence des RE est associée à une meilleure réponse au traitement endocrinien utilisé en situation adjuvante <sup>73</sup>. L'expression du RP est régulée par les RE, ainsi elle est rarement observée sur des tumeurs n'exprimant pas RE, et elle est généralement associée à une meilleure réponse au traitement endocrinien <sup>71</sup>.

De plus, plusieurs études ont montré que les patientes présentant des tumeurs RH<sup>+</sup> peinaient à atteindre une pCR après CTNA, ce qui suggère que les tumeurs exprimant les RH sont plutôt résistantes à cette approche thérapeutique.

Ces résultats expliquent l'intérêt porté à l'hormonothérapie néoadjuvante depuis quelques années. En effet, des études montrent que les taux de réponses objectives sont tout à

fait comparables à ceux obtenus après CTNA et qu'il existe une corrélation significative entre la présence de RE et la réponse au traitement <sup>74</sup>.

Concernant la valeur pronostique des RE<sup>+</sup>, la première étude à ce sujet a été réalisée avant l'introduction des traitements adjuvants <sup>75</sup>, elle indiquait un taux de rechute nettement plus élevé pour les patientes RE<sup>-</sup> que pour les patientes RE<sup>+</sup>. De nombreuses études confirment ce résultat, dont celle de Chen et al. <sup>53</sup>. Dans l'étude du NSABP B-06, les patientes étaient randomisées pour subir soit une mastectomie ou une tumorectomie seule, soit une mastectomie ou une tumorectomie suivie d'une radiothérapie. Aucun traitement adjuvant n'était donné aux patientes. La survie globale et sans rechute chez les patientes présentant une tumeur RE<sup>+</sup> étaient respectivement de 92% et 74%, tandis que les taux chutent respectivement à 82% et 66% pour une tumeur RE<sup>-</sup> <sup>76</sup>.

Alors que certaines études avec un recul médian plus long retrouvent cette valeur pronostique <sup>77</sup>, d'autres suggèrent que la valeur pronostique n'est plus retrouvée à long terme. Hilsenbeck et al. <sup>78</sup> ont montré que l'impact pronostique des RE<sup>+</sup> s'annule après 3 ans de suivi.

La valeur pronostique des RP a été beaucoup moins étudiée que celle des RE. Plusieurs études rapportent une valeur pronostique significative des RP pour les tumeurs N<sup>-</sup>, pour exemple, dans le protocole NSABP B-06, la survie à 5 ans est meilleure (90% versus 83%, p<0,01) pour les tumeurs qui possèdent des RP que pour celles qui sont RP<sup>-</sup> <sup>76</sup>.

En définitive, plusieurs études démontrent que la présence simultanée de RE et de RP correspond à un pronostic meilleur et nous mènent à la conclusion que la présence des RH est associée à un meilleur pronostic en terme d'intervalle sans rechute et de survie. Toutefois, cet avantage est faible, surtout dans la durée. La détermination des récepteurs aura donc son utilité surtout comme facteur prédictif de réponse à un traitement endocrinien lorsque l'un au moins des récepteurs est présent.

### b) L'oncogène HER2

En 1985, plusieurs équipes ont isolé indépendamment le même oncogène. Elles l'ont appelé simultanément HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) et c-erbB2 à cause de ses similitudes avec le gène EGFR et avec l'oncogène v-erbB du virus de l'érythroblastose aviaire <sup>79,80</sup>. HER2 est aussi l'homologue humain du gène NEU isolé de cellules de neuroglioblastomes chez le rat. Localisé sur le bras long du chromosome 17 (17q21), il appartient à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, constituée de quatre récepteurs membranaires : EGFR ou HER1, HER2, HER3 et HER4.

Le récepteur HER2 est une glycoprotéine de 185 kiloDaltons (p185) qui possède un domaine de liaison extracellulaire riche en cystéine, un domaine transmembranaire lipophile et un domaine intracellulaire possédant l'activité tyrosine kinase. Cette protéine joue un rôle déterminant dans la transduction des signaux de prolifération et de différenciation cellulaire, et son système de signalisation intervient également dans le développement embryonnaire.

Dans le cancer du sein, le gène codant la protéine HER2 est amplifié chez 20 à 30% des patientes. L'activation de l'oncogène HER2 provient de la surexpression de la protéine qui peut provenir elle-même d'une amplification génique, c'est-à-dire d'une multiplication du nombre de copies du gène HER2, dont la conséquence est la stimulation de sa transcription. Il arrive aussi que HER2 soit surexprimé à la suite de modifications de l'activité transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle, sans amplification génique.

Au plan cellulaire, ce dérèglement de HER2 induit une augmentation de la croissance cellulaire et du potentiel métastatique. Cet état de surexpression d'HER2 est de mauvais pronostic pour la patiente. Ces tumeurs grandissent plus rapidement, sont plus agressives et beaucoup moins sensibles à la chimiothérapie ou à l'hormonothérapie. Le cancer HER2<sup>+</sup> tend à être plus agressif que tous les autres types de cancer du sein.

Slamon et al.<sup>81</sup> ont été les premiers à faire le lien entre la surexpression d'HER2 et un mauvais pronostic. Chez des patientes présentant des ganglions envahis, ils ont montré qu'il existait une corrélation significative entre une surexpression d'HER2 et une diminution de la survie sans rechute ( $p < 0,0001$ ) et de la survie globale ( $p = 0,0011$ ) et que cette corrélation était indépendante des autres facteurs pronostiques. Depuis cette première étude, de nombreuses autres ont suivies, Ross et Fletcher<sup>82</sup> ont analysé de manière rétrospective 47 études, réalisées en situation adjuvante, ils en concluent que HER2 est un facteur pronostique indépendant dans 60% des études.

Concernant les patientes traitées par CTNA, les études les plus récentes<sup>83</sup>, ne retrouvent pas d'impact pronostique pour les patientes HER2<sup>+</sup>, cela est dû au développement et à l'utilisation du trastuzumab qui a bouleversé les taux de survie de ces patientes.

La surexpression de HER2 dans le cancer du sein a également une valeur prédictive puisqu'elle influence la réponse aux traitements par chimiothérapie et par thérapies ciblant HER2. Concernant la valeur prédictive de HER2 dans le cadre d'un traitement par chimiothérapie, certains essais en situation adjuvante (essai NSABP B11<sup>84</sup>) et néoadjuvante<sup>85</sup> ont retrouvé une valeur prédictive positive de la surexpression du gène pour la réponse aux anthracyclines et notamment à des doses élevées. Une corrélation entre la réponse aux taxanes

et le statut de HER2 n'a pas encore été démontrée, le peu d'études menées à ce propos regroupent pour la plupart des effectifs réduits de cancers du sein avancés et les résultats sont contradictoires.

Concernant la valeur prédictive de HER2 dans le cadre d'un traitement par CTNA, l'étude rétrospective de Penault-Llorca et al.<sup>83</sup>, prouve que les tumeurs HER2<sup>+</sup> ont 4 fois plus de chance de répondre à la CTNA que les autres (p<0,05). Il semblerait donc que la surexpression de l'oncogène HER2 constitue un facteur important dans la prédiction de la réponse à la CTNA.

Enfin, la valeur prédictive de HER2 concernant les traitements ciblant HER2 est évidente. Plusieurs études ont posé la question de l'intérêt d'un traitement par trastuzumab administré toutes les 3 semaines et de sa durée, après traitement néoadjuvant ou adjuvant chez des patientes ayant eu un cancer surexprimant HER2. L'analyse combinée des études NSABP-B31<sup>86</sup> et NCCTG N9831<sup>87</sup> rapportent des taux de survie sans progression à 4 ans de 85% versus 67%, et des taux de survie globale à 4 ans de 91% versus 87% en faveur des bras trastuzumab. Concernant l'étude HERA<sup>88</sup>, les taux de survie sans rechute à 2 ans sont de 77,4% dans le bras contrôle et de 85,8% dans le bras trastuzumab 1 an (p<0.0001).

Les thérapies de seconde génération ciblant HER2 comme lapatinib et pertuzumab confirment la valeur prédictive de l'oncogène HER2 puisque leur administration, en combinaison avec la chimiothérapie et le trastuzumab augmentent encore les taux de pCR et de survie sans rechute<sup>89,90</sup>.

### c) L'antigène Ki-67 (valeur prédictive et pronostique)

Ki-67 est un antigène nucléaire exprimé par les cellules en prolifération, c'est-à-dire la fraction de cellules tumorales engagées dans le cycle cellulaire (phases G1, S, G2 et M), mais qui ne se diviseront pas forcément.

L'index Ki-67 permet donc d'évaluer le taux de prolifération des cellules tumorales, qui est un des paramètres pronostiques les plus importants dans les cancers du sein<sup>91</sup>, précédemment évalué par mesure de la phase S et de la ploïdie. La détermination de l'index Ki-67 se fait par une technique immunohistochimique en comptant le pourcentage de cellules présentant un marquage positif de l'antigène Ki-67, grâce à l'anticorps MIB-1<sup>91</sup>.

En situation adjuvante ou chez des patientes ayant reçu un traitement locorégional seul, plusieurs études ont démontré la valeur pronostique de l'index Ki-67<sup>92</sup>. Dans l'étude de Rudolph et al.<sup>93</sup> portant sur 370 patientes (N<sup>o</sup>), les patientes présentant un index de

prolifération élevée ont un risque de 5 à 20 fois plus fort de décès. Sur les analyses effectuées en multivarié, les auteurs retrouvent le fort impact pronostique de ce facteur, à la fois sur la survie globale et sur la survie sans rechute ( $p < 0,0001$ ). Ces résultats montrent l'importance de la prolifération cellulaire dans la dissémination tumorale.

En situation néoadjuvante, l'étude de Rozan et al.<sup>94</sup>, sur 329 patientes, rapporte un taux de survie à 5 ans de 85% lorsque la tumeur ne surexprime pas Ki-67 (valeur  $< 10\%$ ) et un taux de survie à 5 ans de 68% lorsque la tumeur présente un indice de prolifération élevé. En analyse multivariée, ce facteur est retrouvé pronostique avec l'envahissement ganglionnaire et la taille tumorale. La valeur pronostique de Ki-67 avant CTNA est validée par plusieurs études plus récentes<sup>95,96</sup>.

Ki-67 est également utilisé comme marqueur prédictif suite à des essais adjuvant et néoadjuvant<sup>92,96</sup>.

L'étude de Penault-Llorca et al.<sup>83</sup> retrouve une tendance prédictive de Ki-67 pré-chimiothérapie sur la survie sans rechute, et significativement corrélé à la survie sans rechute post-chimiothérapie. De plus, Burcombe et al.<sup>97</sup> constatent que 78% des patientes qui ont présenté une forte diminution de Ki-67 sont en réponse histologique complète, alors que seulement 27% des patientes qui ont présenté une diminution faible de Ki-67 sont en réponse histologique complète. Il a été suggéré qu'une forte prolifération avant thérapie pouvait prédire une réponse accrue à la chimiothérapie et qu'une diminution significative de Ki-67 avait lieu suite à la CTNA<sup>95,97</sup>.

Cette hypothèse est validée par l'étude de Nishimura et al.<sup>95</sup>, puisqu'un index Ki-67 élevé ( $> 25\%$ ) révèle un fort taux de pCR et cette équipe a également démontré l'association significative de la réponse pathologique aux valeurs de Ki-67 en analyse multivariée.

#### d) Principaux biomarqueurs en cours de validation

Les dernières avancées technologiques en biologie moléculaire ont permis de mieux comprendre la biologie cellulaire tumorale pour identifier des anomalies génomiques complexes (mutation de gènes, aberrations dans le nombre de copies, méthylation et translocations) et d'identifier de nouveaux biomarqueurs impliqués dans de multiples voies de signalisation, ce qui pourrait améliorer les pratiques cliniques générales en contribuant à une approche pronostique et prédictive personnalisée<sup>98</sup>. Cependant, le potentiel de ces marqueurs manque encore de validation<sup>71</sup>, la plupart des biomarqueurs énumérés ci-dessous sont en cours d'étude.

### **- Autres marqueurs de la prolifération cellulaire**

La prolifération cellulaire a d'abord été évaluée via la phase S et de la ploïdie, et l'est désormais grâce à la mesure de l'index Ki-67.

Désormais, de nombreux autres marqueurs de prolifération cellulaire et leur rôle sont à l'étude : MAI (mitotic activity index), PPH3 (Phosphohistone H3)<sup>99</sup>, cycline A, cycline B1<sup>100</sup>, cycline E, cycline D1<sup>101</sup>.

### **- Des marqueurs de l'apoptose**

\* L'association entre le gène suppresseur de tumeur p53 et les taux de survie dans le cancer du sein a été le sujet de nombreuses investigations qui semblent, pour la plupart, démontrer la valeur pronostique de p53. Quant à sa valeur prédictive de la réponse à la chimiothérapie, celle-ci a présenté des résultats contradictoires et n'est donc pas établie<sup>15</sup>.

\* La plupart des études sur Bcl-2 conclut que sa surexpression augmente de façon significative la survie globale et sans rechute mais, selon les études, cette significativité peut être perdue lors d'analyses multivariées ou avec un recul médian plus long.

La surexpression de Bcl-2 semble corrélée à une meilleure réponse au traitement par hormonothérapie pour les tumeurs RH<sup>+</sup>, en revanche il n'est pas encore prouvé que cette surexpression soit prédictive de la réponse à la chimiothérapie<sup>102</sup>.

\* De plus, l'expression des caspases, qui peuvent jouer un rôle d'initiatrice ou d'effectrice de la voie de l'apoptose, dans les cancers du sein, a été significativement liée à la survie globale et à la chimiorésistance<sup>103</sup>.

### **- Des marqueurs de l'invasion tumorale**

\* Plusieurs études suggèrent un rôle pronostique de la Cathepsine D, un niveau élevé de cette protéase serait associé avec des mauvais taux de survie globale et sans rechute<sup>53</sup>.

\* L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), son récepteur (uPAR), et son inhibiteur de type I (PAI-1) ont été associés avec un faible pronostic dans les cancers du sein<sup>104</sup>.

\* Les familles des métalloprotéinases (MMP) et leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP) sont surexprimées dans les tissus tumoraux, elles sont impliquées dans l'initiation des cancers,

l'invasion et les métastases. Des niveaux élevés de MMP et de TIMP ont été corrélés à un faible pronostic <sup>105</sup>.

#### **- Des marqueurs de l'angiogénèse**

De nombreuses études ont démontré l'association de niveaux élevés de VEGF, principal médiateur de l'angiogénèse, et d'une densité accrue des microvaisseaux avec un mauvais pronostic <sup>106</sup>.

#### **- Des marqueurs de l'hypoxie**

\* La surexpression de la protéine HIF-1 $\alpha$  a été retrouvée dans plusieurs types de cancers, et est associée avec un mauvais pronostic dans les cancers du sein N<sup>-</sup>. De plus cette surexpression contribue à la résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie <sup>107</sup>.

\* L'expression de CAIX (Carbonic anhydrase IX) est également significativement associée à un mauvais pronostic, ainsi que des niveaux élevés d'HAI-2 (Hepatocyte growth factor inhibitor type 2) <sup>107</sup>.

#### e) Vers une thérapie personnalisée

En plus de la découverte de nouveaux potentiels biomarqueurs, les avancées technologiques ont permis le développement de techniques de diagnostic moléculaire grâce à des puces à ADN ou à des réactions en chaîne par polymérase après transcription inverse (RT-PCR). Ces technologies détectent les ARNm, révélateurs d'un profil d'expression génique, ou une "signature" composée de plusieurs gènes parmi des milliers, qui peuvent apporter des informations pronostiques et/ou prédictives propres à chaque tumeur.

- **Mammaprint** analyse 70 gènes critiques, impliqués dans le cycle cellulaire, l'invasion, les métastases, l'angiogénèse, et les signaux de transduction, et classe les patientes en 2 groupes distincts, "faible risque de métastases" ou "risque élevé de métastases" <sup>108</sup>.

- **Oncotype DX** mesure l'expression de 21 gènes par RT-PCR pour établir un score de récurrence comme indicateur pronostique. Ce test a été établi spécifiquement pour les patientes RE<sup>+</sup> et N<sup>-</sup>, et donc traitées par Tamoxifène, et les classe en 3 groupes : risque faible, intermédiaire ou élevé <sup>109</sup>.

- **La signature génomique IGG® (Index de Grade Genomique)** a été développée pour reclasser les patientes avec des tumeurs de grade histologique II en bas grade ou haut grade, et aide ainsi à la décision thérapeutique <sup>110</sup>.

- **EndoPredict®** est un test multigénique capable de prédire le risque de rechute à distance spécifiquement dans le cancer du sein RE+/HER2-. Ce test est basé sur la quantification du niveau d'expression de 8 gènes spécifiques du cancer et de 3 gènes de référence par RT-qPCR <sup>111</sup>.

- **Le test PAM50** (Prosigna™) a reçu l'AMM européenne en septembre 2012. PAM50 utilise l'expression de 50 gènes spécifiques et 5 gènes de référence pour établir un score de risque de rechute et peut être utilisé dans tous les sous-groupes de cancers du sein <sup>112</sup>.

- **Le test Breast Cancer Index** a été développé avec un algorithme combinant 2 biomarqueurs : HOXB13 et IL17RB et le test GGI. Différentes études montrent que le score BCI est le seul facteur capable de prédire non seulement la rechute précoce mais également la rechute tardive en le comparant avec Oncotype DX et IHC4 <sup>113</sup>, et qu'il est le facteur pronostique le plus puissant comparé aux facteurs clinico-pathologiques classiques <sup>114</sup>.

#### **4-Principaux index pronostiques**

Comme détaillés ci-dessus il existe de nombreux facteurs cliniques, histopathologiques et biologiques prédictifs et/ou pronostiques. Cependant c'est encore la combinaison de plusieurs de ces facteurs qui apporte la prédiction la plus fiable du risque de rechute et donc le meilleur pronostic <sup>115</sup>.

##### **a) L'index pronostique de Nottingham (NPI = Nottingham Prognostic Index)**

Cet index a été proposé en 1982 <sup>116</sup> suite à une étude rétrospective sur 9 facteurs. Seulement 3 facteurs histopathologiques sont restés significatifs lors de l'analyse multivariée, et sont alors utilisés pour le calcul, comme suit : 0,2 x taille tumorale (cm) + index d'envahissement ganglionnaire (1 pour 0 ganglion; 2 pour 1 à 3 ganglions; 3 pour 4 et plus) + grade tumoral (SBR: 1-3). Trois groupes de patientes sont alors définis avec des chances de survie différentes : bon pronostic (<3,4) / pronostic modéré (3,4-5,4) / mauvais pronostic (>5,4)

Cet index a ensuite été testé par Galea et al. <sup>117</sup> sur une série de 1629 patientes de moins de 70 ans et présentant un cancer du sein opérable traité par chimiothérapie adjuvante, les auteurs concluent que NPI donne une excellente indication du pronostic.

Le maintien de cette valeur pronostique a ensuite été testé par Chollet et al.<sup>118</sup> sur une série de 451 patientes traitées par CTNA et en utilisant donc les facteurs évalués suite à cette chimiothérapie: la taille tumorale résiduelle, le nombre de ganglions envahis résiduel et le grade SBR post-CTNA. Le score conserve alors sa corrélation significative avec les courbes de survies globale et sans rechute et donc sa valeur pronostique.

#### b) L'index RDBN (Residual Disease in Breast and Nodes)

Cet index a récemment été proposé par Chollet et al.<sup>119</sup>. Suite à la validation du maintien de la valeur pronostique de NPI lorsque celui-ci est calculé avec les facteurs évalués suite à une CTNA<sup>118</sup>, l'équipe montre la forte valeur pronostique de la maladie résiduelle dans le sein et le creux axillaire après CTNA<sup>120</sup>.

C'est ainsi que tandis que NPI est initialement calculé avec des facteurs histopathologiques évalués sur la maladie au diagnostic, RDBN utilise les mêmes facteurs, mais évalués sur la maladie résiduelle:  $0,2 \times$  taille résiduelle tumorale (cm) + index d'envahissement ganglionnaire résiduel (0 pour 0 ganglion; 1 pour 1 à 4 ganglions; 2 pour 5 à 7; et 3 pour 8 et plus) + grade tumoral post-CTNA (SBR: 1-3). En effet, la CTNA peut modifier ces facteurs. Ainsi l'index RDBN évalue la réponse de la maladie au traitement néoadjuvant.

De plus, la classification proposée par l'index RDBN inclue la pCR et classe les patientes en 4 groupes:

- Niveau 1: pCR dans le sein et le creux axillaire, avec ou sans carcinome in situ
- Niveau 2: index RDBN de 0,1 à 2,9
- Niveau 3: index de 3,0 à 4,3
- Niveau 4: index  $\geq$  4,4

Plus le niveau est élevé, moins bon est le pronostic, ainsi Chollet et al.<sup>119</sup> ont obtenu les taux de survie globale à 15 ans suivants dans l'ordre des niveaux: 87,7%, 69,5%, 44% et 36,9%.

Cet index a ensuite été validé par Corben et al.<sup>121</sup>, qui ont démontré, en 2012, sur une série de 62 patientes traitées en néoadjuvant, que l'évaluation de la tumeur résiduelle après CTNA par l'index composite RDBN est bien corrélée avec les espérances de vie à long terme.

J'ai également prouvé dans mon étude rétrospective<sup>122</sup> sur 310 patientes traitées par CTNA que les facteurs pronostiques les plus intéressants sont ceux évalués sur la pièce opératoire, après chimiothérapie: taille tumorale résiduelle, nombre de ganglions envahis résiduel et SBR post-CTNA. Après avoir validé la valeur pronostique de l'index RDBN, j'ai montré que cet index semble aussi permettre de prédire les survies de différents sous-types moléculaires et pourrait donc permettre aux cliniciens un meilleur choix des thérapeutiques adjuvantes, à l'avenir.

### c) Le score IHC4

Ce score inclut les 4 marqueurs réalisés en routine en IHC, à savoir RE, RP, HER2 et Ki-67. IHC4 a été développé dans l'étude ATAC<sup>123</sup>, afin de calculer un score de risque de rechute. Les résultats ont montré que ce score IHC4 est un facteur pronostique indépendant des facteurs clinico-pathologiques classiques, et la comparaison de ce score au test Oncotype DX<sup>TM</sup> montre que ces 2 tests apportent la même information concernant le pronostic des patientes.

Ce score a également été combiné à certains paramètres cliniques tels que le pN, le pT, le grade SBR et l'âge des patientes pour former l'index IHC4+C, encore plus puissant.

## **Chapitre 3 : Les traitements néoadjuvants dans les cancers du sein opérables**

Les traitements du cancer du sein varient en fonction notamment de la taille et de la position de la tumeur dans le sein. Les cancers du sein opérables sont définis par des tumeurs de taille égale ou supérieure à 2 cm et/ou en position centrale dans le sein et traités par CTNA. Ce traitement est également le traitement de référence des cancers du sein localement avancé ou inflammatoire, en revanche, les tumeurs de petite taille (inférieure à 2cm) sont généralement traitées par chirurgie première suivie d'une radiothérapie, puis si nécessaire, les patientes peuvent recevoir une chimiothérapie et/ou une hormonothérapie dites alors adjuvantes.

La chimiothérapie néoadjuvante (CTNA) correspond à l'utilisation d'un traitement cytotoxique systémique avant le traitement locorégional (chirurgie et/ou radiothérapie). La terminologie de traitement néoadjuvant pour le cancer du sein a été utilisée au début des années 80, lors de l'introduction de la CTNA dans le traitement des ostéosarcomes.

### **1-Les justificatifs de la chimiothérapie néoadjuvante**

#### a) Les justificatifs historiques

Dès 1943, Haagensen et Stout<sup>124</sup> ont établi des critères d'inopérabilité basés sur l'étude rétrospective de plus de 1000 cancers du sein. Les tumeurs opérées, s'accompagnant d'érythème, de peau d'orange et/ou d'infiltration cutanée avaient, à 5 ans, une survie sans

rechute locale de 48% et sans rechute métastatique de 3%. Si l'adjonction d'une radiothérapie améliore le contrôle local, cette association ne modifie en rien les survies sans rechute ni globale. Il fallait donc envisager l'utilisation de traitements médicaux capables d'agir sur les micrométastases déjà présentes lors du diagnostic.

En 1959, Brock montre l'efficacité du cyclophosphamide sur le chlorome du rat. Cette tumeur n'est guérie que dans 15% des cas par la chirurgie, or l'adjonction du cyclophosphamide en post-opératoire immédiat accroît ce taux à 28%. Il passe à 50% si l'antimitotique est administré une heure avant la chirurgie et même à 90% s'il est administré 7 à 8 jours avant le traitement local.

#### b) Les justificatifs expérimentaux

Plusieurs études expérimentales, réalisées sur des souris, montrent que l'exérèse incomplète d'une masse tumorale s'accompagne d'une prolifération des cellules résiduelles<sup>125</sup>. Ceci s'accompagne, dans les 24 heures, d'une augmentation de l'index de marquage à la thymidine tritiée pendant une période de quelques jours. Il s'ensuit une augmentation du temps de doublement cellulaire et une augmentation de la taille tumorale. Ces modifications cellulaires constatées chez l'animal après chirurgie sont reproductibles après radiothérapie.

En outre, Fisher<sup>126</sup> a pu démontrer qu'un traitement systémique de type chimiothérapie ou hormonothérapie, avant l'exérèse de la tumeur primitive, permettait d'inhiber la croissance des métastases.

Une autre base rationnelle de la CTNA découle de l'hypothèse de Skipper<sup>127</sup> selon laquelle la réduction rapide du nombre de cellules tumorales grâce à la chimiothérapie limite le risque d'émergence de clones résistants. Par conséquent, on peut supposer que l'administration précoce de chimiothérapie, avant tout autre traitement, est susceptible de diminuer le risque d'apparition de ces clones au niveau de la tumeur primitive et des micrométastases.

#### c) Les justificatifs cliniques

Sur ces bases expérimentales, les cliniciens ont utilisé la CTNA dans deux situations cliniques différentes :

- \* dans les cancers du sein localement avancé et inflammatoire, à cause du risque présumé élevé de (micro-)métastases

- \* dans le cancer du sein opérable, pour :

  - permettre une chirurgie conservatrice plus fréquente

- obtenir une meilleure éradication de la maladie micro-métastatique par un traitement précoce avant le développement de clones résistants et alors que le facteur anti-angiogénique potentiel sécrété par la tumeur primitive est toujours présent
- tester la chimiosensibilité tumorale *in vivo*.

#### d) Chimiothérapie néoadjuvante versus adjuvante

La CTNA a été utilisée initialement dans les formes localement avancées et les formes inflammatoires de cancers du sein, afin d'améliorer le contrôle local et la survie en comparaison à un traitement local exclusif. Elle devait également permettre une chirurgie partielle en cas de réduction tumorale importante, évitant ainsi une mastectomie. Devant les résultats encourageants, cette modalité thérapeutique a été proposée pour les formes dites opérables et est depuis de plus en plus utilisée. Désormais plusieurs études ont démontrées la faisabilité et l'efficacité de la CTNA <sup>128,129</sup>. En effet, malgré des taux de survies globales et sans rechute comparables à ceux d'une administration adjuvante de la même chimiothérapie, la CTNA présente plusieurs avantages importants énoncés ci-dessus :

- une augmentation de 10 à 20% du taux de chirurgies conservatrices <sup>128</sup>,
- sans le retard imposé par le temps chirurgical, un traitement systémique bien plus précoce (8 à 10 semaines) de la maladie micro-métastatique et
- une analyse de la chimiosensibilité tumorale *in vivo*, qu'elle soit clinique, permettant d'ajuster la CTNA comme Wang-Lopez et al.<sup>130</sup> l'ont fait, ou biologique, sur la pièce opératoire, et permettant une adaptation des thérapeutiques adjuvantes.

## 2-La chimiothérapie néoadjuvante des cancers du sein opérables

### a) Chimiothérapie à base d'anthracyclines

Les anthracyclines s'intercalent dans l'ADN et se fixent sur la chromatine nucléaire, ils interfèrent aussi avec l'action de la topo-isomérase II, enzyme réparatrice de l'ADN, et produisent le clivage du brin d'ADN.

La première anthracycline était la daunorubicine, surtout active dans les hémopathies malignes (leucémies et lymphomes), alors que la doxorubicine, isolée quelques années plus tard en Italie, est également active dans les adénocarcinomes et les sarcomes : on la considère comme le chef de file de ces médicaments. Deux objectifs ont ensuite guidé la recherche de nouvelles anthracyclines ; découvrir des molécules ne présentant pas de chimiorésistance

croisée avec les premières et une moindre toxicité pour le cœur. C'est ainsi que l'épirubicine est désormais l'anthracycline la plus utilisée dans le traitement des cancers du sein.

Le traitement anticancéreux à base d'anthracyclines est une polychimiothérapie combinée de fluorouracile, doxorubicine et cyclophosphamide (FAC) ou de fluorouracile, épirubicine et cyclophosphamide (FEC).

La supériorité des traitements contenant des anthracyclines sur ceux n'en contenant pas a d'abord été démontrée sur les traitements adjuvants de patientes atteintes de cancer du sein<sup>131</sup>. La chimiothérapie par anthracyclines est ainsi désormais incontournable dans les situations adjuvante, néoadjuvante et métastatique<sup>132</sup>.

#### b) Chimiothérapie comportant un taxane

Le principal mécanisme d'action des taxanes est l'inhibition de la fonction des microtubules, ces derniers étant essentiels pour la division cellulaire, les taxanes bloquent la division normale des cellules. Les taxanes jouent donc le rôle de poison du fuseau et sont également supposés être radiosensibilisants. Les taxanes comprennent plus de 300 composés dont le paclitaxel (Taxol) et le docétaxel (Taxotère).

Depuis l'introduction des taxanes, il a été établi qu'ils étaient également très efficaces en terme de réponse, aussi bien en monothérapie, qu'en association avec des anthracyclines. De nombreux essais utilisant un taxane avec ou sans anthracycline et testant leur association simultanée ou séquentielle ont donc été publiés.

- L'étude GEPARDUO<sup>133</sup> a comparé l'association de docétaxel et de doxorubicine (ADOC) toutes les 2 semaines pendant 4 cycles à un schéma séquentiel AC-DOC (adriamycine-cyclophosphamide suivi de docétaxel) chez 913 patientes. Les résultats montrent que le schéma séquentiel AC-DOC améliore significativement le taux de réponses pathologiques complètes en comparaison avec la combinaison ADOC (14 versus 7%). Le taux de réponses objectives est également meilleur dans le premier groupe que dans le deuxième : 85 versus 75.2%, ainsi que le taux de chirurgies conservatrices : 63.4 versus 58.1%.

Deux autres essais ont comparé des stratégies séquentielles :

- L'essai d'Aberdeen<sup>134</sup> a porté sur 162 patientes recevant 4 cycles de CVAP (cyclophosphamide, vincristine, doxorubicine, prednisolone) en situation néoadjuvante. Cent deux patientes ont répondu partiellement ou totalement à cette polychimiothérapie sur le plan clinique et ont été randomisées pour recevoir soit 4 cycles supplémentaires de CVAP (bras A), soit 4 cycles de docétaxel avant chirurgie (bras B). Les 60 patientes non répondeuses au protocole CVAP ont reçu systématiquement 4 cycles de docétaxel avant d'être opérées de leur

tumeur (bras C). Les taux de réponses objectives étaient respectivement de 64%, 85% et 47%. Pour les patientes répondeuses, le traitement séquentiel avec docetaxel a permis un taux de réponses complètes pathologiques de 31% versus 15% pour la poursuite de 4 cycles de CVAP. A 5 ans, la survie globale est de 97% pour le bras B versus 72% pour le bras A. La survie sans récurrence est de 90% pour le bras B versus 72% dans le bras A. Le taux de chirurgies conservatrices est de 67% dans le bras séquentiel versus 48% dans le bras A.

- L'essai du NSABP B-27<sup>135</sup> concerne 2411 patientes. Trois bras ont été proposés : soit 4 AC (adriamycine-cyclophosphamide) suivis de chirurgie et de radiothérapie (groupe I), ou 4 AC suivis de 4 cures de docétaxel puis chirurgie et radiothérapie (groupe II), soit 4 AC suivis de chirurgie et de 4 cures de docétaxel et radiothérapie (groupe III). Les taux de réponses objectives sont respectivement de 85,7%, 90,7% et 85,4% et les taux de pCR sont de 12,9%, 26,1% et 14,5%. En ce qui concerne la chirurgie conservatrice, les taux sont respectivement de 47,9%, 50,8% et 48,9%.

Les différentes études citées ci-dessus sont en faveur d'un traitement séquentiel plutôt que combiné en termes de réponses objectives et de réponses histologiques complètes. Ces données montrent également que, chez les patientes qui répondent à un traitement initial par anthracyclines, l'adjonction de docétaxel est une approche plus performante que la poursuite des anthracyclines.

### **3-Les cancers du sein HER2-positifs**

Le cancer du sein comme les autres cancers est caractérisé par des mutations dans le génome des cellules cancéreuses. Une mutation particulièrement importante d'un point de vue clinique est l'amplification d'une région du chromosome 17q21 qui aboutit à la surexpression du proto-oncogène HER2 et donc aux tumeurs HER2-positives.

#### **a) Trastuzumab**

Le trastuzumab (Herceptin®, Roche-Genentech), un anticorps monoclonal humanisé qui se lie à la région extracellulaire de la protéine HER2, ancrée à la membrane, empêche l'activation des récepteurs HER2 et donc la prolifération cellulaire. C'est un des premiers traitements par anticorps monoclonaux utilisé en routine en cancérologie, en combinaison avec la chimiothérapie il a été prouvé qu'il augmente les survies globales et sans rechute des cancers du sein métastatiques<sup>136</sup> et, plus récemment en traitement adjuvant des patientes avec un cancer du sein HER2-positif.

Le premier essai de phase III examinant trastuzumab en néoadjuvant en combinaison avec la chimiothérapie a été stoppé prématurément dû à l'impressionnante supériorité du bras expérimental <sup>137</sup>, Buzdar et al. y comparaient 6 mois de CTNA consistant en 4 cycles de FEC versus la même chimiothérapie avec ajout simultané de trastuzumab hebdomadaire pour 24 semaines dans les stades non-inflammatoires II et IIA de cancers du sein HER2-positif. Les patientes recevant le trastuzumab ajouté à leur chimiothérapie ont présenté un taux de pCR significativement supérieur (65%) à ceux recevant la chimiothérapie seule (26%,  $p=0,016$ ). Il n'y a pas eu de différence dans le taux de chirurgies conservatrices du sein entre les 2 groupes (57% vs. 53%), ni dans les cardio-toxicités. Cette 'success story' a été suivie par l'étude NOAH, qui a montré des améliorations aussi bien en terme de taux de pCR (43% vs. 22%,  $p=0,0007$ ) qu'en terme de survie sans rechute à 3 ans (71% vs. 56%,  $p=0,013$ ) grâce à l'ajout de trastuzumab aux 3 cycles de doxorubicine plus paclitaxel, suivis de 4 cycles de paclitaxel seuls et de 3 cycles de cyclophosphamide plus methotrexate et fluorouracil <sup>138</sup>. De plus, dans l'étude GeparQuattro <sup>139</sup>, parmi 1509 participantes, 445 avaient des tumeurs HER2-positives et ont reçu le trastuzumab en même temps que le docétaxel ou que le docétaxel + capecitabine; le taux de pCR dans le sein et en axillaire est significativement différent de celui des tumeurs HER2-négatives (32% vs. 16%,  $p<0,001$ ) sans jouer sur le taux de chirurgies conservatrices du sein. Valachis et al. <sup>140</sup> confirment ces résultats avec une méta-analyse de plusieurs études randomisées qui indique que l'ajout de trastuzumab à la CTNA augmente significativement les taux de pCR et de survie sans rechute comparé à une chimiothérapie seule chez des patientes présentant des cancers du sein localement avancés. Dans presque tous les essais le traitement par trastuzumab est complété après chirurgie pour une durée totale d'un an, comme l'indiquent les recommandations cliniques du NCCN (National Comprehensive Cancer Network).

A noter que le potentiel cardiotoxique du trastuzumab a été testé dans différentes indications et Seidman et al. démontrent un profil de toxicité cardiaque élevé en association avec un traitement à base d'anthracyclines (27%) alors qu'il est beaucoup plus faible en association avec du paclitaxel (13%) ou seul (3-7%) <sup>141</sup>. Ainsi le trastuzumab est désormais prescrit en deuxième phase de CTNA, c'est-à-dire en association avec les taxanes <sup>142</sup>.

Ainsi une nette amélioration a été observée chez les patientes HER2-positives depuis l'extension de l'utilisation du trastuzumab; cependant environ 10% de ces patientes développent des rechutes à distance <sup>143</sup> et les risques cardiotoxiques excluent certaines patientes de ce traitement, c'est pourquoi le développement de nouveaux agents ciblant pour traiter les cancers du sein HER2-positifs reste cliniquement cohérent.

### b) Pertuzumab

Le pertuzumab (Omnitarg®, Roche-Genentech) est un anticorps monoclonal se fixant sur un épitope différent de HER2 par rapport au trastuzumab.

Dans une étude de phase II randomisée (NeoSphere<sup>90</sup>) la combinaison de pertuzumab + trastuzumab ajoutée à la CTNA a démontré une augmentation du taux de pCR en comparaison à l'addition de pertuzumab ou de trastuzumab à la CTNA, ainsi qu'un taux de pCR de 16,8% chez les patientes traitées seulement par la double thérapie ciblée, sans chimiothérapie.

### c) Lapatinib

Le lapatinib (Tykerb®, GlaxoSmithKline) est un inhibiteur de la tyrosine kinase se fixant sur EGFR et HER2.

Bien qu'il n'ait pas prouvé d'efficacité supérieure au trastuzumab, les études randomisées étudiant l'impact d'addition de lapatinib (NeoALTTO<sup>144</sup>, NSABP B-41<sup>89</sup>) en combinaison à une CTNA et au trastuzumab ont démontrées une augmentation du taux de pCR dans le bras contenant cette addition.

D'autres inhibiteurs de la tyrosine kinase, tels que *Neratinib* et *Afatinib* sont actuellement testés en combinaison avec différents chimiothérapeutiques et pour diverses applications, notamment en indication néoadjuvante<sup>145</sup>.

## 4-Les cancers du sein hormonodépendants

Le bénéfice d'un traitement hormonal dans le cancer du sein hormonosensible est de nos jours parfaitement admis.

a) Le tamoxifène, modulateur sélectif des récepteurs des oestrogènes, est le traitement de référence des femmes non ménopausées et présentant une tumeur hormono-positif en situation adjuvante, et a largement contribué à la validation des traitements endocrines.

b) Les inhibiteurs de l'aromatase de troisième génération : létrozole, anastrozole et exemestane, sont des agents hormonaux plus récemment développés, et qui offrent ainsi aux cliniciens l'opportunité de disposer d'un arsenal thérapeutique plus efficace et mieux toléré. Chez les femmes ménopausées les inhibiteurs de l'aromatase ont démontré leur supériorité sur le tamoxifène en terme de survies globale et sans rechute<sup>146,147</sup>.

La thérapie endocrine néoadjuvante a d'abord été administrée aux patientes portant un cancer du sein localement avancé mais ne pouvant bénéficier de chimiothérapie à cause de leur âge et/ou de comorbidités. Récemment, de nouvelles perspectives pour l'utilisation de cette hormonothérapie néoadjuvante ont émergées sur la base d'études démontrant que les patientes présentant des tumeurs RH<sup>+</sup> présentent des taux de pCR significativement plus faibles que celles présentant des tumeurs RH, quels que soient les durées ou régimes de chimiothérapie <sup>148</sup>. Cette constatation laisse suggérer que les tumeurs hormonosensibles sont plutôt résistantes aux chimiothérapies <sup>149</sup>. De plus, malgré la difficulté d'atteindre une pCR après leur CTNA ces patientes présentent un bon pronostic même en présence d'un résidu tumoral <sup>54</sup>, ce qui est largement dépendant de l'efficacité de la thérapie post-opérative endocrine.

Bien que plusieurs études aient démontré l'efficacité de l'utilisation néoadjuvante des inhibiteurs de l'aromatase en terme de réponse objective et de taux de chirurgies conservatrices du sein <sup>150</sup>, à l'heure actuelle l'hormonothérapie néoadjuvante ne constitue pas un traitement standard.

### **5-Evaluation de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante**

Les avancées des thérapeutiques anticancéreuses sont basées sur l'évaluation des résultats obtenus par les traitements et leur introduction dans la pratique courante en oncologie. Ces évaluations requièrent des comparaisons entre les résultats et nécessitent d'avoir des données standardisées. C'est pourquoi il est devenu nécessaire de développer un « langage commun » pour décrire les résultats obtenus dans le traitement du cancer et ce de façon internationale.

#### **a) La réponse clinique**

En 1994 plusieurs organisations de recherche, dont l'Organisation Européenne de Recherche et de Traitement du Cancer (EORTC) et l'Institut National du Cancer (NCI) des Etats-Unis et du Canada se sont réunies afin de revoir les critères utilisés pour évaluer la réponse au traitement dans les tumeurs solides, ce qui aboutit aux recommandations nommées RECIST (Response Criteria in Solid Tumors), qui ont été publiées en 2000 <sup>151</sup>, puis ajustées en 2009 <sup>152</sup>. Selon ces recommandations l'évaluation de la réponse au traitement ne prend en compte que les mesures clinique et/ou radiologique du plus grand diamètre de chacune des lésions évaluées. Ainsi, on peut mesurer :

- Une Réponse Complète (RC) : en cas de disparition de toutes les lésions cibles

- Une Réponse Partielle (RP) : en cas d'une diminution d'au moins 30% de la somme des plus grands diamètres des lésions prises comme lésions cibles
- Une Stabilisation (ST, ou NC pour « no change ») : en cas de diminution inférieure à 30% et d'augmentation inférieure à 20% de la somme des plus grands diamètres des lésions cibles
- Une Progression (PG) : en cas d'augmentation d'au moins 20% de la somme des plus grands diamètres des lésions cibles, ou si une nouvelle lésion apparaît

La réponse clinique est une information importante pour décider d'interrompre, changer ou prolonger le traitement systémique, de plus elle a un impact évident sur la décision de réaliser un traitement conservateur ou une mastectomie.

#### b) La réponse anatomo-pathologique

L'analyse de la réponse pathologique est réalisée sur les pièces opératoires (mammectomie, tumorectomie, quadrantectomie) mammaires et sur les curages axillaires, c'est une base nécessaire pour établir le pronostic de chaque patiente et un guide pour mettre au point la stratégie de traitement post-chirurgical.

- **La réponse pathologique complète** est largement admise comme but ultime d'une CTNA efficace, et est désormais utilisée comme objectif principal dans presque tous les essais cliniques néoadjuvants <sup>53</sup>. La plupart des études suivent la recommandation de von Minckwintz <sup>153</sup> selon laquelle la pCR, définie comme l'absence de tumeur résiduelle invasive et *in situ* dans le sein et les ganglions, est le meilleur moyen de discriminer les patientes de bon pronostic de celles de mauvais pronostic. Cependant une définition précise et uniforme est encore requise, différentes définitions de la pCR sont alors utilisées, incluant l'absence de tumeur invasive dans le sein seulement ou dans le sein et les ganglions, et l'absence ou non de tumeur *in situ*, également dans le sein seulement ou dans le sein et les ganglions.

#### **- Classification de la maladie résiduelle :**

Pour évaluer la maladie résiduelle dans le sein et le creux axillaire, plusieurs équipes de pathologistes ont proposé des classifications de la réponse à la CTNA <sup>154,155,156,157</sup>, cependant aucun consensus ne permet de privilégier une classification plutôt qu'une autre, à l'heure actuelle.

Les deux classifications couramment utilisées en Europe sont celles de Chevallier et Sataloff, qui sont comparables <sup>158</sup> et évaluent toutes deux la réponse sur le sein et le creux axillaire.

\* La classification de Chevallier <sup>159</sup>

Class 1: Disparition complète de toute trace de tumeur (*in situ* et invasive)

Class 2: Présence de carcinome *in situ* seulement dans le sein, absence de toute cellule tumorale dans le creux axillaire

Classe 3: Persistance de carcinome invasif avec altération du stroma

Classe 4: Peu ou pas de modification de la tumeur

Cette classification reste une référence en France, cependant, la classe 3 englobe une population très hétérogène de patientes comprenant de très bons répondeurs (pour lesquels le reliquat est minime et très altéré) et des répondeurs partiels (qui présentent une régression tumorale de moins de 50%). Le grade 2 est considéré comme une rémission complète.

\* La classification de Sataloff <sup>160</sup>

- Sur le sein : T-A: Effet thérapeutique total ou quasi-total (>95%)

T-B: Effet thérapeutique supérieur à 50%

T-C: Effet thérapeutique inférieur à 50%

T-D: Pas d'effet thérapeutique

-Sur le creux axillaire : N-A: Effet thérapeutique, plus de métastase

N-B: Pas de métastase, pas d'effet thérapeutique

N-C: Effet thérapeutique mais persistance de métastases

N-D: Pas d'effet thérapeutique, métastases

Cette classification tient compte de la viabilité cellulaire, elle isole ainsi un groupe de très bons répondeurs en prenant en compte les reliquats tumoraux très nécrosés non mesurables macroscopiquement, dont la signification clinique est très proche des répondeurs complets, et stratifie les répondeurs partiels en « bons répondeurs » (effet thérapeutique supérieur à 50%) et « mauvais répondeurs ».

## **Chapitre 4 : L'immunité anti-tumorale**

La découverte de l'immunité anti-tumorale est une histoire pleine de rebondissements qui a pris ses racines au XIX siècle, lorsqu'un chirurgien du Memorial Hospital de New York, William Coley, a constaté des régressions de tumeur chez des malades qui développaient

parallèlement un épisode infectieux. Un peu plus tard, d'autres équipes ont confirmé que l'injection d'extraits de bactéries à des souris pouvait entraîner la nécrose hémorragique de leur tumeur: ces substances stimulaient les défenses immunitaires de l'organisme qui, à leur tour, limitaient la prolifération cancéreuse.

D'autres arguments sont en faveur de l'immunosurveillance: par exemple, la découverte de tumeurs cliniquement silencieuses, ou encore l'observation de régressions spontanées de tumeurs. De plus, les cancers sont plus fréquents pendant la période néonatale ainsi que chez les sujets âgés, deux périodes de la vie au cours desquelles le système immunitaire serait moins efficace, de même que ces maladies sont plus fréquentes chez les sujets immunodéprimés <sup>161</sup>.

Un argument encore plus probant concerne l'infiltration de certaines tumeurs par des cellules lymphoïdes (lymphocytes T et cellules natural killer), qui est considérée depuis longtemps comme le signe d'un pronostic favorable <sup>162</sup>, notamment dans les cancers du sein <sup>163</sup>.

### **1-Immunosurveillance**

Le concept d'immunosurveillance a été proposé par Burnet en 1970<sup>164</sup> suite à l'hypothèse de Thomas en 1959 selon laquelle l'immunité à médiation cellulaire serait le principal mécanisme impliqué dans l'élimination des tumeurs.

Malgré l'impact bénéfique de certaines réponses immunitaires, des études réalisées dans les années 2000 ont révélé l'ambivalence des relations entre le système immunitaire et les cancers. Une nouvelle théorie a alors été conçue selon laquelle l'immunosurveillance de la tumeur évoluerait au cours du temps et serait divisée en trois phases dite des « 3E » <sup>161</sup>:

#### **a) Elimination**

Cette phase est enclenchée dès la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire. Le développement tumoral, qui se fait aux dépens du tissu sain, met en place un contexte pro-inflammatoire par la libération de signaux de danger (appelés DAMPs pour damaged associated molecular pattern) <sup>165</sup>. Ce contexte favorise alors le recrutement et l'activation de cellules cytotoxiques de l'immunité innée ainsi que le recrutement des cellules présentatrices d'antigène, qui activeront ensuite l'immunité adaptative.

Ainsi, durant cette étape, la tumeur est contrôlée par le système immunitaire, voire entièrement éliminée.

### b) Equilibre (ou Immunosélection)

La relation dynamique entre le système immunitaire et la tumeur conduit à une phase d'équilibre, qui peut durer de nombreuses années. Durant cette période certaines cellules tumorales peu prolifératives et/ou peu immunogènes ont survécu à la phase d'élimination. La tumeur est dite « en dormance » : elle est contrôlée mais continue d'évoluer lentement <sup>161</sup>. Plus longtemps dure cet équilibre, plus il y a de risques qu'une mutation entraînant l'échappement au contrôle immunitaire des cellules tumorales survienne. Durant cette longue phase, les cellules tumorales subissent une pression importante du système immunitaire qui conduit à un phénomène de sélection des phénotypes les plus adaptés à survivre que l'on nomme « immunosélection » (ou "immunoediting").

D'autre part l'inflammation associée aux cancers et l'instabilité génétique des cellules tumorales semblent contribuer à l'établissement d'un microenvironnement pro-tumoral et immunosuppresseur.

### c) Echappement tumoral (ou Immunosubversion)

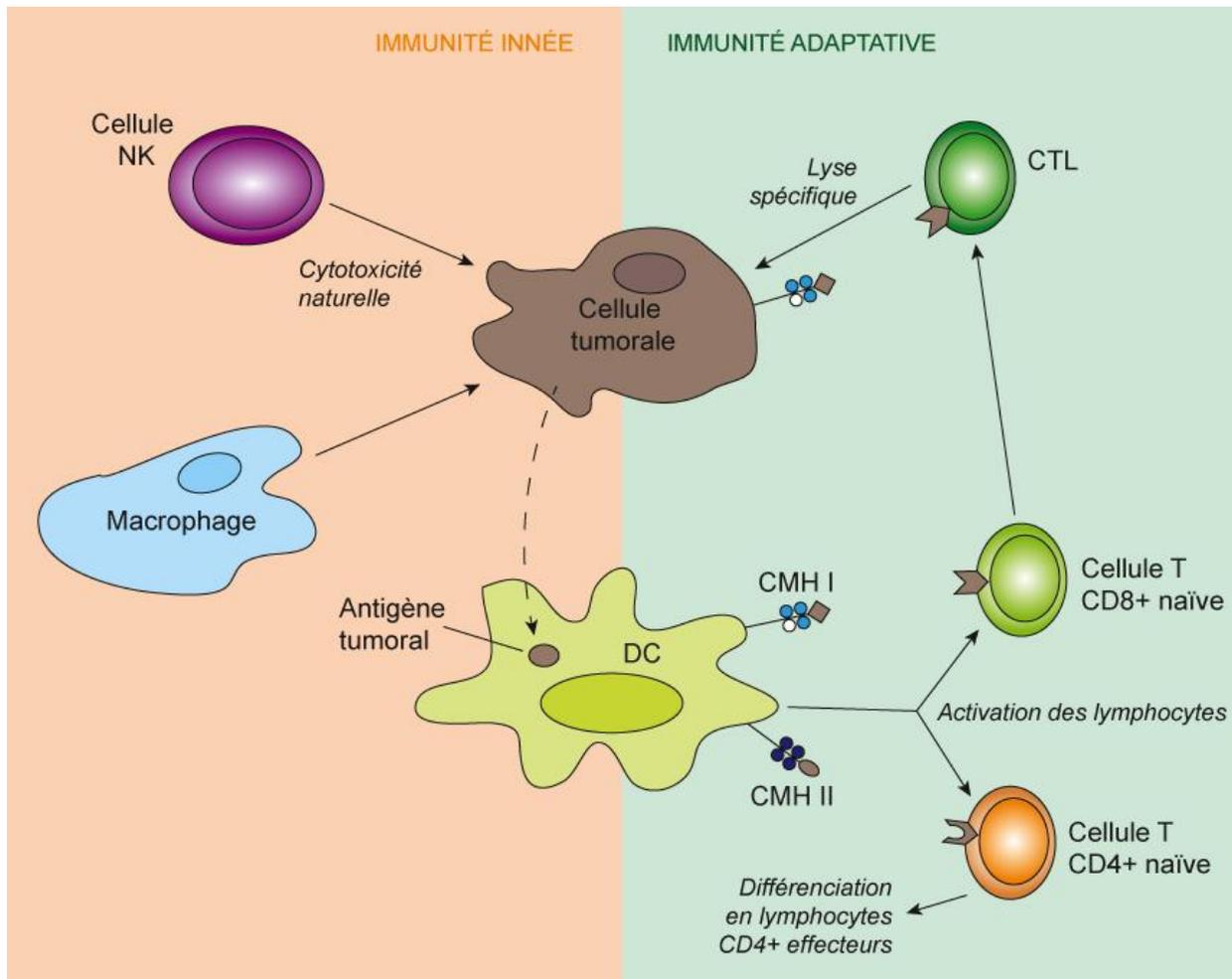
Les clones résistants, ainsi sélectionnés, lors de l'immunosélection, sont capables d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Ils vont alors permettre à la tumeur de proliférer brusquement voire générer des métastases : c'est la phase d'échappement.

L'échappement est croissant puisque la tumeur accumule de nombreux et différents mécanismes au fil du développement de la maladie. Les populations tumorales sont hétérogènes, ainsi que leurs mécanismes d'échappement, ce qui rend leur élimination par le système immunitaire ou par un traitement immunologique d'autant plus difficile.

## **2-La réponse immunitaire anti-tumorale**

La réponse anti-tumorale mise en place par le système immunitaire repose sur la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales. Cette réponse se déroule en deux phases: une immédiate, la réponse innée, qui va déclencher la réponse cellulaire spécifique, appelée réponse adaptative qui, si elle est plus tardive, est aussi plus durable.

De nombreux travaux expérimentaux notamment en infectiologie, en cancérologie et en auto-immunité ont permis de comprendre les différentes étapes de cette réponse (Figure 7) <sup>166,167</sup>.



**Figure 7 : Contrôle des cellules tumorales par le système immunitaire**

a) L'immunité innée

La première ligne de défense de l'organisme est l'immunité innée, recrutée par différentes voies et impliquant principalement les cellules natural killer.

**- Voies de recrutement**

\* Les DAMPs sont des signaux de souffrance cellulaire qui vont activer des récepteurs cellulaires de l'immunité innée (PRR : Pattern Recognition Receptor), présents à la fois sur les cellules immunitaires et d'autres cellules, comme les cellules épithéliales, fibroblastiques ou endothéliales, et ainsi déclencher une réaction inflammatoire.

Les cellules tumorales étant des cellules altérées, elles émettent des DAMPs et activent l'immunité innée.

\* L'inflammation peut conduire à la destruction des cellules tumorales, ainsi qu'à la réparation tissulaire qui suit. Pour cela, elle va recruter les cellules cytotoxiques de l'immunité innée

dans le tissu menacé et les activer en sécrétant des facteurs solubles comme des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), les chimiokines, qui sont des cytokines chimio-attractantes, et les interleukines (IL) IL-1, IL-6, IL-12 et IL-18. Des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , peuvent également être libérées au cours de l'inflammation pour aboutir à sa résolution.

La réponse innée implique les cellules cytotoxiques de la première ligne de défense, telles que les cellules natural killer T (NKT), les lymphocytes T- $\gamma\delta$ , mais aussi et principalement les lymphocytes natural killer (NK) et les macrophages:

- **Les lymphocytes NK** sont les principales cellules de l'immunité innée impliquées dans l'immunité anti-tumorale. Les cellules NK sont des grands lymphocytes granuleux représentant 5 à 10 % des lymphocytes circulants du sang. Ces cellules n'expriment ni le BCR (B-cell receptor), récepteur des immunoglobulines (Ig), ni le TCR (T-cell receptor), récepteur des antigènes, et sont capables de détruire des cellules infectées ou transformées sans qu'il y ait besoin d'une pré-immunisation, en déchargeant le contenu de leurs granules lytiques. Par ailleurs ces cellules sont capables, après activation, de produire des cytokines, chimiokines et des facteurs de croissance, notamment l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) qui a un pouvoir anti-tumoral.

#### \* Les sous-populations de cellules NK

Phénotypiquement une cellule NK est caractérisée par l'expression des deux molécules CD16 et CD56.

L'étude de la coexpression des molécules CD16 et CD56 à la surface des cellules NK a permis de mettre en évidence deux sous populations qui présentent de nombreuses différences phénotypiques et fonctionnelles.

- La première, de phénotype CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> ou dim, représente environ 10% des cellules NK du sang périphérique.

- La seconde sous-population NK est CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup>.

#### - CD16 (FC $\gamma$ RIII)

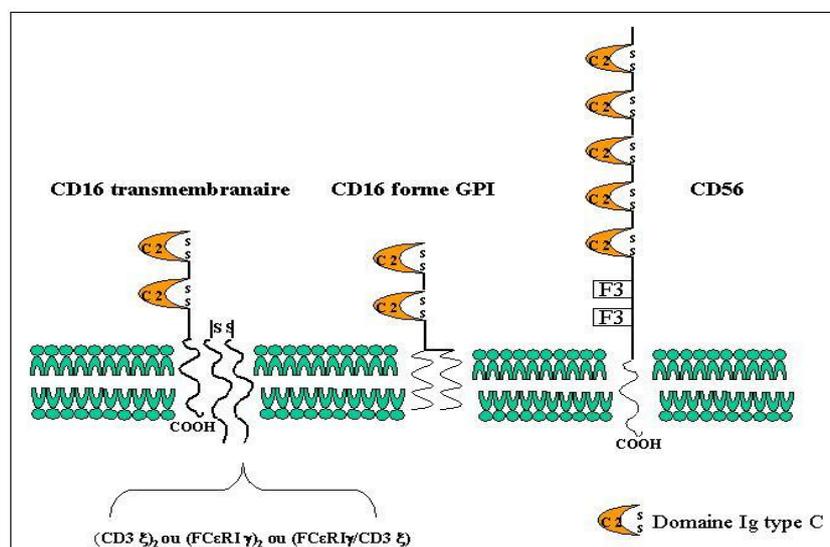
CD16 est un récepteur de faible affinité pour le fragment constant (Fc) des IgG. Il appartient à la superfamille des immunoglobulines et existe sous deux formes, une forme transmembranaire et une forme ancrée par un motif glycosyl phosphatidyl inositol cette dernière étant exprimée par les neutrophiles (Figure 8). CD16 transmembranaire est présent essentiellement sur les cellules NK ainsi que sur les macrophages et les mastocytes. Il est

essentiel pour la mise en place du mécanisme d'ADCC (Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity).

En effet, le ligand de CD16 étant la partie constante des immunoglobulines de type IgG, la cellule NK reconnaît ses cellules cibles sur lesquelles des anticorps générés au cours de la réponse immunitaire spécifique, par exemple, se sont fixés aux Ag de surface. Le recrutement de ces récepteurs par ces anticorps conduit à une agrégation des molécules CD16, puis une phosphorylation des tyrosines des motifs activateurs qui conduira au relargage des granules cytotoxiques et à la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , et donc ainsi à la lyse des cellules tumorales.

#### - CD56

CD56 est une isoforme de la molécule d'adhérence neuronale. Ce récepteur appartient aussi à la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé par les cellules NK et une partie des lymphocytes T.



**Figure 8: Les marqueurs CD16 et CD56.**

Seule la forme transmembranaire de CD16 est présente à la surface des cellules NK. Elle est associée à d'autres protéines par l'intermédiaire d'un acide aminé chargé positivement et situé dans le domaine transmembranaire.

#### - Différence de fonctions

La fonction cytotoxique est une fonction majeure des cellules NK. Elle ne se manifeste cependant pas de façon équivalente dans les deux populations. En effet la population CD56<sup>dim</sup> possède un fort potentiel cytotoxique en absence d'activation par des cytokines (IL-2, IL-12). Ce n'est pas le cas des CD56<sup>bright</sup> qui ne présentent qu'une très faible activité cytotoxique

mais peuvent toutefois acquérir un potentiel équivalent après incubation avec de l'IL-2 ou de l'IL-12<sup>168</sup>.

D'autre part les lymphocytes NK CD56<sup>bright</sup>, après stimulation par des interleukines (IL-15, IL-18 et IL-12) représentent une source importante de cytokines immunorégulatrices, incluant l'INF- $\gamma$  et le TGF- $\beta$  ainsi que l'IL-10, l'IL-13 et le GM-CSF (Granulo-Monocytes-Colony Stimulating Factor). Comparativement les cellules NK CD56<sup>dim</sup> ne produisent, après activation, que de faible quantité de ces mêmes cytokines<sup>169,170</sup>.

Pendant les premières phases de la réponse inflammatoire les cellules NK CD56<sup>dim</sup> peuvent être recrutées sur le site inflammatoire en réponse à différentes chimiokines. Une fois arrivées sur ce site, les cellules NK sont activées par les cytokines secrétées par les cellules immunitaires innées, et/ou l'engagement de récepteurs activateurs tels que les récepteurs toll-like (TLRs) et/ou les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCRs)<sup>171</sup>.

Les cellules NK activées peuvent alors induire la lyse des cellules tumorales, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et peuvent également interagir avec les autres cellules du système inné afin d'augmenter l'efficacité de la réponse adaptative<sup>172</sup>.

#### \* Les récepteurs de toll-like

Les TLR appartiennent aux PRR<sup>173</sup>, ils sont exprimés à la surface des cellules NK quel que soit leur état d'activation et peuvent agir en synergie avec les signaux des cytokines ou des chimiokines pour activer les fonctions NK.

#### \* Les récepteurs de cytotoxicité naturelle

NKp46, NKp44, et NKp30 sont parmi les premiers récepteurs activateurs identifiés à la surface des cellules NK humaines. Ces molécules de surface structurellement non-relées ont été définies comme NCRs pour leur capacité commune à fortement activer les fonctions cytolytiques des cellules NK.

Les ligands de ces récepteurs sont exprimés par une large gamme de cellules susceptibles d'être des cellules-cible des cellules NK, et particulièrement les cellules tumorales<sup>174</sup>. Les ligands des NCRs exprimés par les cellules tumorales les plus fréquemment identifiés sont des Ag du soi dont l'expression à la surface de la cellule est induite par une activation ou un stress cellulaire, ou par des mécanismes encore inconnus liés à la transformation tumorale.

En plus de leur rôle dans l'activation de la cytotoxicité naturelle, les NCRs peuvent avoir des fonctions régulatrices par l'induction de sécrétion de cytokines<sup>175</sup>.

#### \* Les récepteurs spécifiques du CMH-I

L'activation des cellules NK est sous le contrôle de récepteurs des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) associées à des polypeptides issus des protéines du soi. Ces récepteurs préviennent l'attaque des cellules NK sur des cellules du soi et permettent la destruction de cellules n'exprimant pas ou peu les molécules de CMH-I, c'est-à-dire les cellules transformées ou infectées.

Chez l'Homme deux différents récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMH-I existent :

1) les KIRs (killer Ig-like receptors), qui appartiennent à la superfamille des Ig et reconnaissent les molécules "classiques" du CMH-I appelées HLA-A, -B, -C<sup>176</sup>, et dans lesquels on retrouve le récepteur CD16/FCγRIII.

2) les récepteurs CD94/NKG2A, qui appartiennent à la famille des lectines-C, formant un hétérodimère, et reconnaissent les molécules "non classiques" du CMH ou HLA-E, -F, -G, -H<sup>177</sup>.

En plus des KIRs inhibiteurs, d'autres formes de KIRs ont été identifiées, il s'agit de formes activatrices, qui interagissent avec les molécules du CMH-I avec une affinité beaucoup plus faible que les formes inhibitrices. L'activité activatrice ou inhibitrice des KIRs dépend de leur domaine intra-cytoplasmique, en effet, ceux-ci peuvent présenter une queue cytoplasmique courte "S" qui donnera un KIR activateur ou longue "L" qui donnera un KIR inhibiteur<sup>176</sup>.

#### \* Le récepteur NKG2D

Ce récepteur appartient à la famille des lectines-C mais son homologie avec cette famille est faible. Contrairement aux autres récepteurs de la famille des lectines-C, NKG2D ne reconnaît pas une classe particulière de molécules du CMH, cependant ses ligands ont une structure très proche de celles molécules CMH-I. Ses principaux ligands sont les protéines MICA et MICB (MHC-class I Related protein A et B), qui sont généralement absentes de la surface des cellules saines chez un adulte. Cependant dans des conditions pathologiques, comme une infection virale ou une transformation tumorale, leur expression est très souvent induite<sup>178</sup>.

- **Les macrophages** sont des phagocytes, cellules dont le rôle est d'ingérer les débris cellulaires et les pathogènes. Ils participent à l'immunité innée en tant que défense non-spécifique, mais sont capables de participer à l'immunité adaptative via le phénomène d'opsonisation. En effet les macrophages possèdent un récepteur de la partie constante des immunoglobulines qui leur permet de reconnaître des cellules cibles sur lesquelles des

anticorps se sont fixés aux Ag de surface. De plus, les macrophages sont également capables de se comporter comme cellules présentatrices d'antigènes.

Les macrophages sont activés suite à la sécrétion d'IFN- $\gamma$  sur le site tumoral par les NK et peuvent également être recrutés sur ce site par les chimiokines MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted). La présence de macrophages sur le site tumoral est également favorisée par la sécrétion de cytokines inflammatoires IL-12, IFN- $\alpha$  et - $\gamma$  par les cellules dendritiques et les cellules NK.

Ajoutée à leur fonction de phagocytose les macrophages peuvent participer à la création d'un environnement inflammatoire via la sécrétion de cytokines ou chimiokines attirant à leur tour les cellules dendritiques et les cellules NK, et favoriser l'expression des récepteurs activateurs à la surface de ces dernières.

#### \* Les sous-types M1/M2

L'étude des marqueurs de surface et des facteurs de croissance exprimés par les macrophages a permis de mettre en évidence deux sous populations qui présentent des différences phénotypiques et fonctionnelles.

- M1 : macrophages activés, issus d'une activation dite "classique", par l'IFN- $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$ , et l'engagement de TLRs. Les macrophages M1 produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-23 et IL-6, en grande quantité, qui induisent la stimulation des lymphocytes Th1 (Cf paragraphe suivant: b) L'immunité adaptative) afin de détruire le pathogène <sup>179</sup>.

- M2 : macrophages alternativement activés, par IL-4 et IL-13. Les macrophages M2 produisent des facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10, le TGF- $\beta$  et l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 $\beta$  (IL-1R $\alpha$ ), et exhibent donc des fonctions anti-inflammatoires et des capacités de réparation et de remodelage du tissu endommagé <sup>180</sup>.

Le rôle des macrophages dans la progression de la tumeur a été validé par le fait que les macrophages jouent un rôle fondamental dans la réponse inflammatoire et que l'inflammation chronique participe à la carcinogénèse mais également par la corrélation établie entre une densité élevée en macrophages et un mauvais pronostic <sup>181</sup>.

Cependant leur rôle dans le rejet de la tumeur reste ambigu car si les macrophages de type M2 peuvent favoriser la croissance tumorale et l'angiogénèse de la tumeur, les macrophages de type M1 peuvent tuer les cellules tumorales en sécrétant des radicaux oxygénés toxiques<sup>182</sup>.

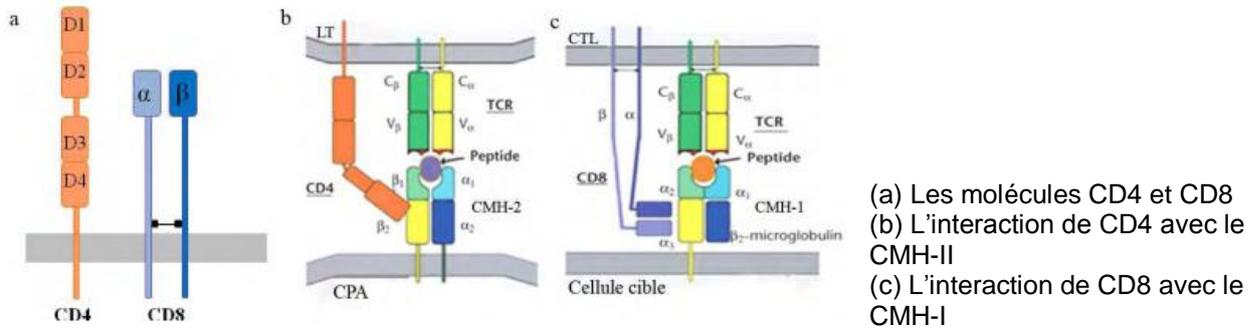
### b) L'immunité adaptative

#### **- La présentation de l'antigène tumoral**

Le contexte inflammatoire du site tumoral favorise le recrutement de cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques, qui sont à l'interface entre la réponse innée et la réponse adaptative.

D'autre part les cellules tumorales, suite aux nombreuses mutations génétiques ou épigénétiques qu'elles subissent, expriment des molécules aberrantes parfois antigéniques et immunogéniques, que l'on appelle les antigènes tumoraux. La nécrose ou l'apoptose de ces cellules au sein du tissu tumoral va libérer des antigènes tumoraux qui seront alors capturés par les cellules dendritiques immatures infiltrant le site inflammatoire. Sous l'influence des DAMPs, celles-ci vont maturer, c'est-à-dire exprimer à leur surface les molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T et migrer dans un organe lymphoïde secondaire pour présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T naïfs associés aux molécules du CMH aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup><sup>183</sup>. En effet, l'activation des lymphocytes T naïfs ne sera effective que si l'interaction initiale entre les lymphocytes T et cellules dendritiques est permise par les nombreuses molécules d'adhésion (ICAM-1/LFA1, LFA3/CD2, VCAM-1/VLA4) et si le premier signal (reconnaissance du peptide : CMH/TCR + CD4 ou CD8) est accompagné des signaux dits de co-stimulation (deuxième signal : B7/CD28). Les lymphocytes T activés vont alors proliférer et se différencier en cellules T effectrices telles que les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), lymphocytes T auxiliaires (ou lymphocytes "helper" : Th), plasmocytes et cellules mémoires.

Historiquement, les LT ont été classés en deux sous populations : les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. En effet, au cours de la lymphopoïèse, les lymphocytes T se divisent en deux sous-types fonctionnellement distincts, chacun restreint par une classe de molécules du CMH et distinguable sur l'expression des corécepteurs CD8 et CD4. Ces molécules co-réceptrices favorisent la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR en interagissant respectivement avec le CMH-I ou le CMH-II. Toutes les deux permettent, via leur queue intra-cytoplasmique, le recrutement de molécules de signalisation et augmentent ainsi d'un facteur 100 la sensibilité du TCR pour le complexe CMH/peptide (Figure 9).



**Figure 9. La structure des corécepteurs CD4 et CD8 et leur interaction avec le CMH**

Adapté de Janeway, immunobiology, 6<sup>e</sup> édition.

### - Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Suite à leur activation, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs entrent dans une phase de prolifération et de différenciation aboutissant à une population clonale de cellules cytotoxiques ou CTL. Les CTL migrent dans la tumeur et éliminent les cellules tumorales par cytotoxicité. Pour cela, les CTL disposent de deux principales voies inductrices de mort : la voie perforine/granzyme et la voie Fas/Fas-L. Il existe également une troisième voie basée sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$  qui, libérées à proximité des cellules cibles peuvent entraîner leur mort<sup>184</sup>. Il est intéressant de noter qu'il existe une autre population de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dite régulatrice dont nous ne parlerons pas dans ce manuscrit<sup>185</sup>.

#### \* La voie perforine/ granzyme

Le mécanisme clé de la cytotoxicité des CTL est la voie perforine/granzyme dépendante du flux calcique, voie également utilisée par les cellules NK. Suite à la rencontre entre un CTL et sa cible, le lymphocyte polarise sa machinerie lytique vers la zone de contact cellulaire, permettant la libération de deux protéines lytiques majeures : la perforine et les granzymes<sup>186</sup>.

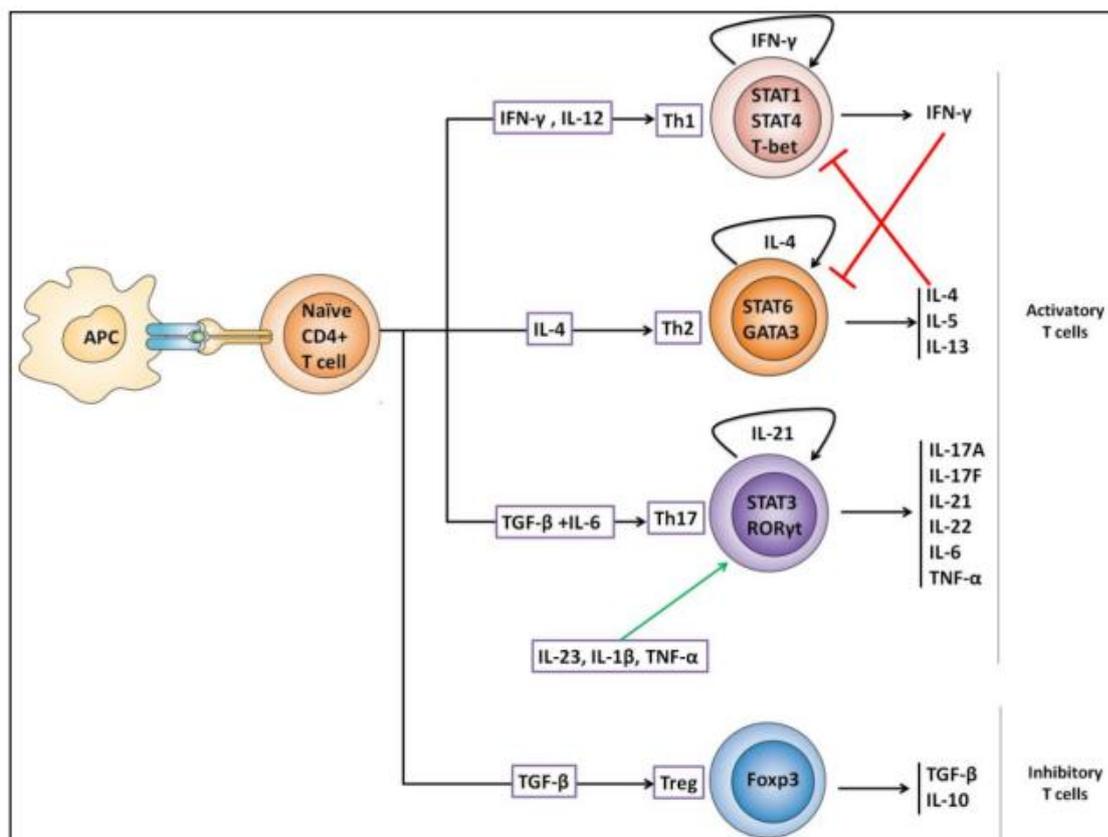
#### \* La voie Fas/Fas-L

La deuxième voie majoritairement impliquée dans l'activité cytotoxique des CTL est la voie Fas/Fas-L (Fas : Apoptosis stimulating fragment -Ligand). Fas-L est un récepteur de mort appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF. Cette molécule est très peu exprimée à l'état basal par les CTL mais son expression est induite suite à la stimulation du TCR, puis l'interaction du récepteur Fas exprimé par la cellule tumorale avec Fas-L induit la cascade d'activation des caspases et l'apoptose de la cellule cible<sup>187</sup>.

## - Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Dès 1975, des données semblent indiquer l'existence de 2 sous-populations distinctes parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> murins spécifiques pour un antigène particulier<sup>188</sup>. Des travaux permettent ensuite de classer ces deux sous-populations sur la base de leur profil de sécrétion cytokinique: les lymphocytes Th1 produisent de l'IFN- $\gamma$  et les lymphocytes Th2 de l'IL-4<sup>188</sup>. La différenciation en lymphocytes Th1 ou Th2 est fonction de multiples facteurs comme la dose antigénique, l'affinité du TCR, les signaux de co-stimulation ou encore l'influence des cytokines présentes dans le milieu environnant. De plus, il est important de noter que les mécanismes inducteurs d'une des deux catégories sont souvent inhibiteurs de l'autre<sup>189</sup>.

Depuis sa découverte, cette dichotomie a été largement remise en question avec la découverte de nouvelles sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. En effet, il est maintenant bien connu qu'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf peut aussi se différencier en lymphocytes Th17 ou en lymphocytes T régulateurs (Treg) (Figure 10)<sup>190</sup>.



**Figure 10 : Représentation schématique des voies de différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves**  
Le choix du lignage dépend des facteurs de transcription activés et est donc conditionné, entre autre, par l'environnement cytokinique. Adapté de<sup>191</sup>.

Il est important de noter que ce processus de différenciation n'est pas un événement statique, en effet différentes sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent s'interchanger<sup>190</sup>. Par exemple, sous certaines conditions les Th17 peuvent devenir des Treg et inversement.

De plus, l'existence d'autres sous-populations a récemment été proposée<sup>190</sup> parmi lesquelles se trouvent les lymphocytes Th3 producteurs de TGF-β, les Tr1 producteurs d'IL-10, les lymphocytes Th9 producteurs d'IL-9, les lymphocytes Th22 produisant de l'IL-22, les lymphocytes Th25 produisant de l'IL-25 et les lymphocytes Th folliculaires localisés dans les régions folliculaires des ganglions lymphatiques. Ces sous-populations, à l'inverse des lymphocytes Th1, Th2, Th17 et Treg ne produisent pas une cytokine particulière ni de facteur de transcription spécifique, l'appartenance de ces cellules à un lignage spécifique nécessite donc de plus amples investigations.

#### \* Lymphocytes Th1

La cytokine clé de la différenciation Th1 est l'IL-12<sup>192</sup>, principalement produite par les macrophages et les cellules dendritiques et qui peut être induite par les lymphocytes T, ce qui nécessite 2 signaux activateurs : l'IFN-γ et l'interaction CD40/CD40L.

Les lymphocytes Th1 se caractérisent par leur profil de sécrétion cytokinique plutôt de type pro-inflammatoire (IL-2, IFN-α, TNF-α et TNF-β) et l'expression de facteurs de transcription spécifiques : STAT1, STAT4 et T-bet.

Les lymphocytes Th1 sont importants dans les réponses immunitaires contre les pathogènes intracellulaires tels que les virus ou les bactéries et participent principalement à l'immunité à médiation cellulaire, mais peuvent également intervenir dans l'immunité humorale. La cytokine effectrice principale est l'IFN-γ qui joue un rôle important dans l'inhibition et la destruction des cellules tumorales. L'IFN-γ favorise également le signal délivré lors de l'interaction CD40 (sur la cellule présentatrice d'antigènes)/CD40L (sur le lymphocyte T CD4<sup>+</sup> activé) qui active les cellules présentatrices d'antigènes et donc augmente leur potentiel d'activation des lymphocytes T naïfs.

En parallèle, les lymphocytes Th1 favorisent la différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en CTL via l'IL-2 et l'IFN-γ. Il est également intéressant de noter que certains lymphocytes Th1 peuvent posséder des capacités cytolytiques dépendant de la voie Fas/Fas-L et de la perforine<sup>192</sup>.

Enfin, les lymphocytes Th1 peuvent également aider la réponse des lymphocytes B en favorisant la commutation isotypique en IgG.

Il est à noter que l'infiltration spontanée de ces cellules Th1 a été observée dans divers cancers et parfois corrélée à un pronostic favorable <sup>193</sup>, leur action anti-tumorale passe principalement par la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , ainsi que par l'inhibition des lymphocytes Th2.

#### \* Lymphocytes Th2

La cytokine clé du développement Th2 est l'IL-4 <sup>194</sup>, principalement produite par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mais qui peut également provenir des mastocytes, des basophiles, des éosinophiles et des cellules NKT. La signalisation induite par l'IL-4 permet la transcription de gènes spécifiques Th2, dont le facteur de transcription clé dans la polarisation Th2 : GATA3 ou encore le gène de l'IL-4 lui-même.

Les lymphocytes Th2 produisent principalement des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 et se caractérisent par l'expression des facteurs de transcription spécifiques: STAT6 et GATA3. Les lymphocytes Th2 sont plutôt impliqués dans les réponses contre les pathogènes extracellulaires comme les parasites et participent principalement à l'immunité à médiation humorale.

Concernant leur rôle dans l'immunité anti-tumorale, il a été montré que la production par ces cellules de TGF- $\beta$  et d'IL-10 favorise la croissance tumorale car ces cytokines régulent la réaction inflammatoire et créent un environnement favorable au développement de la tumeur et à l'échappement immunitaire <sup>195,196</sup>.

De plus les lymphocytes Th2 inhibent la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes Th1 qui est un acteur anti-tumoral important. Une proportion plus importante de cellules Th2 que de cellules Th1 est donc nécessaire pour permettre la prolifération des cellules tumorales sans être rejetées par les mécanismes immunitaires anti-tumoraux <sup>197</sup>.

#### \* Lymphocytes Th17

La preuve que les lymphocytes Th17 constituent un lignage séparé des Th2 et des Th1 a été apportée par des expériences démontrant un bon développement Th17 chez des souris déficientes pour les principaux facteurs nécessaires au développement des Th1 (T-bet) et des Th2 (GATA3) <sup>198</sup>. L'identité cellulaire de cette population a par la suite été confirmée par la découverte des facteurs de transcription qui lui sont spécifiques : STAT3 et ROR $\gamma$ t <sup>199</sup>.

Chez l'Homme, l'exacte combinaison de cytokines qui stimule la différenciation en lymphocytes Th17 est matière à débat, cependant plusieurs études soulignent le rôle important de TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 dans ce processus<sup>200</sup>. Plusieurs cytokines telles que l'IL-23, IL-21, IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  amplifie cette différenciation et la réponse des lymphocytes Th17, tandis que l'IL-23 est nécessaire à l'expansion, la maintenance et la stabilisation du phénotype Th17 et pourrait également servir de facteur de survie pour ces cellules<sup>200</sup>.

Après activation, ces cellules produisent majoritairement de l'IL-17A, du TNF- $\alpha$ , de l'IL-6, de l'IL-21, de l'IL-22, de l'IL-26 et du GM-CSF.

Les lymphocytes Th17 possèdent des rôles paradoxaux : bénéfiques dans le cas de réponses protectrices contre les pathogènes extracellulaires (comme les bactéries ou les champignons) et délétères vu leur importance fonctionnelle au niveau des manifestations d'auto-immunité et dans l'établissement de syndromes d'inflammation chronique.

Concernant le développement tumoral, les cellules Th17 ont été retrouvées dans le microenvironnement tumoral de nombreuses tumeurs, notamment les tumeurs du sein<sup>201</sup> ce qui indique leur rôle dans la progression tumorale. La fonction biologique des lymphocytes Th17 tend vers une fonction pro-inflammatoire car celle-ci dépend principalement de la forte sécrétion d'IL-17A par ces lymphocytes. Or, les lymphocytes Th17 et l'IL-17A ont toutes deux été rapportées comme indicateur de mauvais pronostic dans les cancers<sup>201,202</sup>.

#### \* Lymphocytes T régulateurs

La possibilité d'une différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes Treg a été largement démontrée durant ces dernières années. En effet, le TGF- $\beta$ 1 associé à une stimulation du TCR permet, *in vitro*, la conversion de lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> régulateurs<sup>203</sup>. L'IL-2 et l'interaction PD-1/PD-L1 sont également des paramètres importants pour réaliser cette néo-conversion<sup>204,205</sup>. De plus, l'identité cellulaire de cette population a été confirmée par la découverte du facteur de transcription qui lui est spécifique : Foxp3.

Les lymphocytes Treg jouent un rôle clé dans la croissance et la progression tumorale en inhibant la réponse immunitaire mise en place contre la tumeur<sup>206</sup>. En effet, une fonction importante de ces cellules régulatrices est la suppression des cellules effectrices du système immunitaire qui sont spécifiques du soi, limitant ainsi l'auto-immunité et l'inflammation dans des conditions physiologiques normales. Le rôle des lymphocytes Treg dans la carcinogénèse et l'envahissement tumoral chez l'Homme émerge seulement. Par exemple, des niveaux plus élevés de cellules régulatrices T CD25<sup>+</sup> ont été trouvés dans le sang de patients atteints de

cancer du pancréas ou du sein en comparaison avec des donneurs sains. Des cellules régulatrices T CD25<sup>+</sup> ont également été trouvées dans des ganglions drainants des tumeurs gynécologiques, et des proportions augmentées de ces cellules ont été démontrées dans les lymphocytes T associés à des tumeurs de poumon ou d'ovaire, de même que ces cellules sécrètent la cytokine immunosuppressive TGF- $\beta$ <sup>207</sup>.

En revanche, basé sur la fonction d'immunorégulation des lymphocytes Treg, il serait raisonnable de concevoir que les lymphocytes Treg peuvent également prévenir et/ou retarder l'inflammation liée au développement tumoral. Toutefois, cette hypothèse requiert encore une validation expérimentale, attendue<sup>208</sup>.

Une notion intéressante, mise en lumière par l'étude de Kuchroo<sup>209</sup>, est qu'il y aurait une différenciation variable des précurseurs T CD4<sup>+</sup> en fonction de la quantité de TGF- $\beta$ 1 et d'IL-6 présente dans le microenvironnement. Ainsi, en situation physiologique, la présence d'une forte concentration en TGF- $\beta$ 1, favoriserait la génération de lymphocytes Treg, afin d'assurer la tolérance périphérique au soi, alors que dans une situation physiopathologique et inflammatoire, l'IL-6, produite par les cellules de l'immunité innée, induirait plutôt la différenciation en lymphocytes Th17, c'est-à-dire le développement d'effecteurs afin d'assurer une réponse immunitaire optimale<sup>209</sup>.

### **3-Les mécanismes d'échappement tumoral**

#### **a) Microenvironnement pro-tumoral**

Lors de l'échappement au système immunitaire, les cellules tumorales n'étant pas toutes éliminées, l'inflammation devient chronique, ce qui est néfaste pour l'individu car les contrôles du système immunitaire visent à éviter une stimulation immunitaire excessive. L'inflammation devenue chronique va alors favoriser la mise en place de mécanismes d'immunosuppression via l'expression au sein du tissu, par les cellules tumorales ou par les cellules immunitaires infiltrantes, de cytokines régulatrices<sup>210</sup> telle que, principalement, la cytokine pro-inflammatoire IL-6, qui module l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire.

L'immunosuppression générale se traduit également par l'activation de voies de signalisations centrales: - principalement le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) qui, sous stimulation continue inflammatoire, est constitutivement activé et assure la transcription de gènes inflammatoires cibles, comme le TNF- $\alpha$ , qui est une cytokine pro-

inflammatoire majeure, qui peut notamment stimuler la croissance et la survie des tumeurs et de plusieurs cellules immunitaires<sup>211</sup>.

- Les facteurs de transcription tels que la famille des STAT, AP-1 (activator protein-1) et d'autres<sup>212,213</sup> régulent également les cytokines pro-inflammatoires et les médiateurs de renouvellement des cellules souches, la prolifération cellulaire et leur survie, tous impliqués dans le maintien de l'inflammation.

Cette immunosuppression se reflète également par une perte d'expression de la chaîne  $\zeta$  (CD247) du TCR responsable de l'anergie, c'est-à-dire le fait que la cellule effectrice reconnaisse l'antigène tumoral mais n'est plus réactive, ou de la diminution de cellules effectives innées NK et adaptatives lymphocytes T<sup>214</sup>.

#### b) Faible immunogénicité des cellules tumorales

- **Perte d'antigène immunogène** : les cellules tumorales peuvent supprimer leur antigène de surface, par exemple en endocytant les anticorps qui s'y fixent afin de se purger des antigènes tumoraux<sup>215</sup>. Des études ont montré que des tumeurs exprimant faiblement un antigène, bien que pouvant être reconnues par des lymphocytes T préalablement activés, ne permettaient pas d'activer des lymphocytes T anti-tumoraux spécifiques.

- **Perte de molécules d'adhésion** à la surface des cellules tumorales afin d'empêcher les cellules immunitaires de s'y fixer ainsi que perte des molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T<sup>216</sup>, les lymphocytes T peuvent alors devenir anergiques.

- **Délétion des molécules de CMH-I** présentatrices des antigènes tumoraux, qui va inhiber la réponse T, tout en conservant l'expression d'autres allèles de CMH-I pour ne pas activer les cellules NK<sup>217</sup>.

#### c) Recrutement de populations immunitaires régulatrices

Certaines cytokines et chimiokines sécrétées par la tumeur favorisent l'accumulation au sein de la tumeur de nombreuses populations cellulaires régulant la réponse immunitaire.

- **Les cellules Treg** infiltrent la tumeur en réponse à des cytokines telles que TGF- $\beta$  et IL-10<sup>218</sup> et jouent un rôle clé dans la régulation de l'immunosurveillance. Elles ont en effet été retrouvées dans de nombreux types de cancer et souvent corrélées à un mauvais pronostic

<sup>219</sup>. Les proportions respectives de lymphocytes Treg et de cellules effectrices anti-tumorales lors de l'apparition de la tumeur détermineraient le rejet de la tumeur ou sa progression <sup>218</sup>.

- **Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)** infiltrent presque tous les types de tumeurs. Naturellement, la survie et l'activation prolongée de macrophages conduit à la destruction tissulaire et devrait donc éliminer les cellules tumorales. Cependant, les TAMs sont des macrophages de type M2, transformés sous l'influence de cytokines inappropriées et du microenvironnement. Ces cellules vont alors produire des facteurs de croissance et des facteurs angiogéniques, conduisant à la dégradation de la matrice extracellulaire et favorisant l'invasion des cellules tumorales <sup>220</sup>.

- **Les cellules dendritiques immatures** sont un phénotype courant du microenvironnement inflammatoire chronique. Sans l'expression à leur surface des molécules de co-stimulation elles peuvent induire l'anergie ou réduire l'activité des lymphocytes T, de plus ces cellules supportent la croissance tumorale via le recrutement et l'activation des lymphocytes Treg <sup>221</sup>.

- Enfin **les cellules myéloïdes immunosuppressives** représentent une population cellulaire immature également présente dans la plupart des cancers. Leur propriété principale est leur capacité à inhiber aussi bien les réponses immunes innées qu'adaptatives <sup>222</sup>. Leur nombre est fortement augmenté dans des conditions d'inflammation chronique, ce qui diminue le nombre des cellules myéloïdes matures telles que les macrophages et les cellules dendritiques.

- **Les lymphocytes Th17** (Cf paragraphe précédent: b) L'immunité adaptative) sont présents parmi les lymphocytes infiltrant la tumeur et entretiennent l'inflammation chronique notamment via la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-17A.

- **Les lymphocytes T reg** (Cf paragraphe précédent: b) L'immunité adaptative) montrent une présence augmentée lors du développement tumoral et joue un rôle clé dans l'immunosuppression en éliminant les cellules effectrices du système immunitaire.

#### d) Facteurs solubles immunosuppresseurs

- **Cytokines immunorégulatrices** : les deux principales étant le TGF- $\beta$  et l'IL-10. Le TGF- $\beta$  a d'abord un effet anti-tumoral (anti-prolifératif et anti-invasif), mais celui-ci est rapidement compensé par son effet immunosuppresseur comme l'induction de lymphocytes

Tregs et leur sécrétion d'IL-10, ainsi que par le détournement de certaines voies de signalisation à l'avantage de la cellule tumorale<sup>223</sup>. L'IL-10 peut aussi être sécrétée par les cellules tumorales et va changer le profil de la réponse immunitaire en inhibant les cellules dendritiques et en favorisant l'apparition de lymphocytes Tregs<sup>224</sup>.

- **Cytokines pro-inflammatoires**, telles qu'IL-6 et IL-23. Ces cytokines contribuent à la carcinogénèse et à la croissance tumorale en entretenant l'inflammation chronique favorable à ce développement. De plus elles favorisent la production d'autres cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-17 dont le rôle pro-tumoral sera détaillé chapitre **5**.

- **Les MIC solubles**, des molécules inhibitrices du récepteur NKG2D, activateur indispensable à la cytotoxicité des cellules NK et des CTL peuvent également être produites par les cellules tumorales et induire une altération des réponses immunitaires anti-tumorales<sup>225</sup>.

#### e) Dérégulation des signaux d'apoptose

- **Surexpression de molécules anti-apoptotiques**, comme bcl-2<sup>226</sup>.

- **Activation constitutive** de p53 ou autres **oncogènes** codants pour des protéines anti-apoptotiques<sup>227</sup>.

- **Inhibition des cascades de caspases** qui devraient aboutir à l'apoptose des cellules tumorales<sup>227</sup>.

- **Expression de Fas-L** à la surface des cellules tumorales qui vont induire l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques<sup>228</sup>.

#### f) Barrière physique

De nombreux types de tumeurs surexpriment des molécules telles que des fibres de collagène ou des facteurs de coagulation qui vont former une barrière physique entre les cellules tumorales et le système immunitaire, une sorte de "site de privilège immun" où les cellules immunitaires n'ont pas accès et où la tumeur peut donc proliférer<sup>229</sup>.

#### 4-L'immunothérapie des cancers

Le concept d'immunothérapie anti-tumorale est théoriquement doublement séduisant car la spécificité de la réponse immunitaire devrait permettre de cibler les tumeurs sans endommager les tissus sains de l'organisme, et la mémoire immunitaire pourrait permettre d'éviter la récurrence cancéreuse par des cellules tumorales ayant échappé à un premier traitement.

Les antigènes tumoraux, exprimés par les cellules tumorales, sont des cibles privilégiées pour les immunothérapies et ont alimenté l'espoir de développer des vaccins thérapeutiques contre les tumeurs exprimant ces antigènes.

En effet, plusieurs modèles murins ont montré l'efficacité de vaccins anti-tumoraux, souvent capables de prévenir le développement de tumeurs (vaccins préventifs) et, plus rarement, de les traiter (vaccins thérapeutiques). Cependant, l'application chez l'homme de ces travaux a été source de nombreuses déconvenues qui auraient pu stopper l'aventure de l'immunothérapie anti-tumorale à l'heure où de nombreuses thérapies ciblées émergeaient. Jusqu'à une série de découvertes récentes et essentielles à la réussite de ces approches: la compréhension du fait que les tumeurs endogènes acquièrent au cours du temps de nombreux mécanismes d'échappement. Par conséquent, le développement d'immunothérapies efficaces implique non seulement de transférer ou d'induire le développement d'effecteurs anti-tumoraux afin de stimuler les réponses immunitaires anti-tumorales, mais aussi de neutraliser les mécanismes d'échappement, qui s'opposent à leur action.

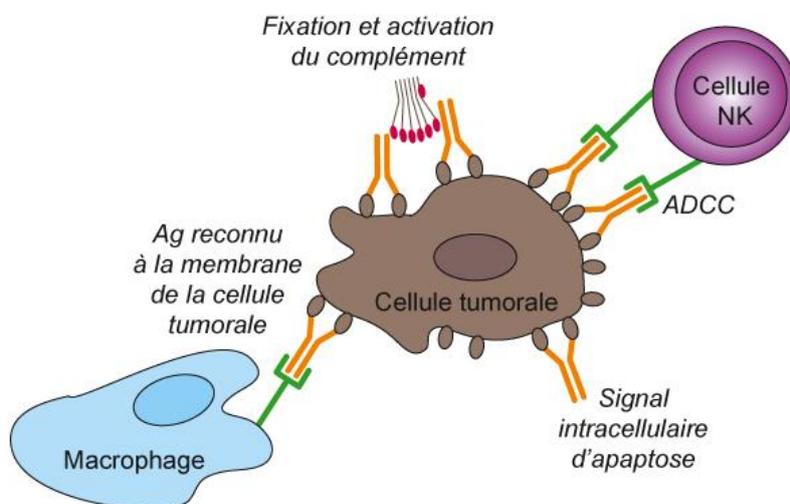
L'immunothérapie des cancers a depuis été évaluée comme la "percée médicale de l'année 2013" par le très prestigieux journal Science, et plébiscitée lors de la 50<sup>ème</sup> édition du congrès de l'ASCO (American Society of Clinical Oncology), en 2014, en partie parce qu'elle peut induire une réponse immunitaire rapide, durable, adaptable et qui se propage d'elle-même<sup>230</sup>.

##### a) L'administration d'anticorps monoclonaux ciblant la tumeur

Au cours de ces dernières années, la vision négative sur l'immunothérapie en cancérologie s'est d'abord atténuée grâce au succès des anticorps thérapeutiques en cancérologie, qui a constitué une avancée thérapeutique majeure. Ainsi, des anticorps contre HER2 (trastuzumab : Herceptine®), CD20 (rituximab: Mabthéra®), l'EGFR (cétuximab : Erbitux®) ou le VEGF (bévacicumab : Avastin®) ont démontré leur efficacité et sont prescrits dans un nombre de plus en plus important de tumeurs (cancers du sein, lymphomes,

tumeurs du côlon, cancers du rein, tumeurs de la sphère otorhinolaryngée, cancers du poumon).

En effet, ces anticorps peuvent bloquer l'activation et/ou la prolifération des cellules tumorales (en ciblant des récepteurs de facteurs de croissance comme l'EGFR ou HER2), induire une apoptose, même discrète (anti-CD20), inhiber des molécules pro-angiogéniques (anti-VEGF), ou interférer avec les capacités d'adhérence des cellules tumorales (anti-EpCAM, epithelial cell adhesion molecule). Mais il est aujourd'hui admis que cette immunothérapie repose également sur l'activation des mécanismes effecteurs de l'immunité, comme l'ADCC, la phagocytose via les cellules immunitaires liant l'anticorps par son fragment Fc, ou via l'activation de la voie classique du complément<sup>231</sup> aboutissant à la formation d'un complexe d'attaque membranaire responsable de la mort des cellules tumorales (Figure 11).



**Figure 11 : Mode d'action des anticorps** Certains anticorps peuvent bloquer la liaison de ligands sur des récepteurs de facteurs de croissance ou provoquer un signal direct d'apoptose vers la cellule tumorale. La majorité des anticorps vont recruter des cellules effectrices (NK, macrophages) qui vont entraîner la lyse de la cellule tumorale par un mécanisme d'ADCC. La partie Fab de l'anticorps se fixe sur la cellule tumorale et la partie Fc sur des récepteurs Fcγ activateurs à la surface des cellules effectrices ce qui déclenche leur cytotoxicité.

Plus récemment, chez la souris, l'efficacité clinique de certains anticorps thérapeutiques a aussi été reliée à leur capacité à induire des lymphocytes T anti-tumoraux en favorisant la présentation de l'antigène tumoral aux lymphocytes T<sup>232</sup>. Chez l'homme, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et une réponse anticorps endogène ont été détectés après administration

de trastuzumab <sup>233</sup>. Les réponses immunitaires cellulaires et humorales endogènes induites par l'administration d'anticorps sont le plus souvent dirigées contre la même cible que celle de l'anticorps thérapeutique. Ainsi la réponse lymphocytaire T mémoire générée pourrait être un élément-clé de la durabilité de la réponse aux anticorps monoclonaux.

Les anticorps peuvent également être utilisés comme des véhicules, de nombreux efforts d'ingénierie ont alors été entrepris au cours de la dernière décennie, principalement en manipulant la région constante de ces anticorps <sup>231</sup> afin de les coupler à des drogues ou en les rendant bispécifiques, ce qui permet le recrutement de cellules de l'immunité comme les lymphocytes T.

- **Les anticorps couplés** à des drogues (ADCs : Antibody-drug conjugates) permettent d'apporter la molécule thérapeutique, de manière ciblée, au contact des cellules cancéreuses via l'interaction de leurs régions variables (fragments Fab) avec leur antigène tumoral spécifique. De nombreux ADCs sont actuellement en développement clinique et l'un d'entre eux, le brentuximab vedotin (Adcetris®, Takeda), a été approuvé par la FDA (Food and drug administration aux États-Unis) en août 2011. Plus récemment le trastuzumab emtansine (T-DM1®, Genentech) qui conjugue l'anticorps trastuzumab avec le DM1, un dérivé d'emtansine <sup>234</sup> a montré une excellente activité anti-tumorale chez les patientes atteintes de cancer du sein HER2+. L'anticorps trastuzumab se lie aux récepteurs HER2 à la surface des cellules tumorales, ce qui permet l'internalisation de T-DM1, et DM1 est ensuite libéré dans ces cellules; la chimiothérapie est donc délivrée directement dans les cellules exprimant HER2 <sup>235</sup>.

L'avantage des ADCs est de présenter, en plus d'une excellente efficacité, une très bonne tolérance.

Les anticorps peuvent être couplés à d'autres agents toxiques tels que les radioéléments qui peuvent permettre un diagnostic de précision mais également de cibler la radiothérapie de manière à éviter les organes radiosensibles <sup>236,237</sup>.

- **Les anticorps bispécifiques** possèdent deux régions variables différentes et peuvent ainsi reconnaître deux antigènes différents. Le but de ces anticorps est de fixer un antigène tumoral et un marqueur exprimé par une cellule du système immunitaire, comme les lymphocytes T la plupart du temps. Cet anticorps lie donc deux cibles simultanément et permet ainsi le réadressage de cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral, l'activation immunitaire dépendante de la cible et donc l'induction de réponses anti-tumorales.

Catumaxomab, Ertumaxomab, et FBTA05 sont quelques exemples d'anticorps bispécifiques actuels. Par exemple, Ertumaxomab est un anti-HER2-anti-CD3, CD3 étant un récepteur exprimé par les lymphocytes T, cet anticorps bispécifique va alors conduire à la formation d'un complexe HER2-ertumaxomab-CD3 menant à l'aggrégation et à l'activation de cellules T, macrophages, cellules dendritiques et cellules NK, ce qui va ensuite causer la mort des cellules tumorales via leur phagocytose. La lyse efficace de cellules cibles exprimant faiblement HER2 a ainsi été démontrée *in vitro*, sur des cellules où le trastuzumab était inefficace <sup>238</sup>.

#### b) L'inhibition des voies immunosuppressives

Une meilleure connaissance du microenvironnement tumoral a suggéré l'hypothèse selon laquelle l'immunosuppression associée aux tumeurs pouvait expliquer la résistance des tumeurs à l'immunothérapie, ainsi, la tumeur est infiltrée par des populations cellulaires et des molécules immunosuppressives.

Les immunothérapies efficaces qui voient le jour actuellement prennent en compte l'inhibition de la réponse régulatrice cellulaire soit en la bloquant, soit en générant des cellules mémoires résistantes à son inhibition. Pour le blocage des réponses régulatrices, il n'existe pas encore de molécule capable d'éliminer transitoirement les lymphocytes Treg, mais d'intenses recherches sont poursuivies dans ce domaine. D'autres approches sont évaluées, utilisant de nombreuses cibles thérapeutiques. Les molécules augmentant l'immunogénicité des cellules tumorales lors de leur mort induite par chimiothérapie semblent prometteuses <sup>239</sup>.

Les technologies modernes permettant la production d'anticorps spécifiques de molécules cibles ont également permis de renforcer l'immunosurveillance des tumeurs, celle-ci peut en effet désormais bénéficier de l'utilisation, éventuellement conjointe, d'anticorps antagonistes bloquant des molécules comme CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) ou PD-1 (programmed cell death protein-1) qui jouent un rôle central dans l'inhibition des réponses immunes anti-tumorales.

L'utilisation de ces anticorps se fonde sur la présence dans les tumeurs de lymphocytes T que l'expression de CTLA-4 et/ou PD-1, molécules inhibitrices, ont rendus anergiques <sup>240</sup>. Cette anergie peut également être due à d'autres molécules inhibitrices comme Tim-3 ou BTLA, ou à la présence dans le microenvironnement tumoral de molécules suppressives comme TGF $\beta$ , IL-10 ou IDO <sup>241,242</sup>, or le blocage de ces molécules par des anticorps ou des petites molécules chimiques est en cours d'évaluation. De plus, certaines cytokines (IL-7, IL-15, IL-21) ou certains adjuvants comme des ligands de TLR pourraient

également lever l'état d'anergie des lymphocytes T infiltrant les tumeurs ou les rendre réfractaires aux mécanismes d'immunosuppression<sup>243</sup>, toutefois, l'action ambivalente de certaines cytokines ou agonistes des TLR rend difficile leur manipulation sur le plan clinique<sup>244</sup>.

#### **- L'anti-CTLA-4**

L'activation classique des lymphocytes T ne peut se faire sans signal de costimulation. Ce signal activateur est délivré par l'interaction des molécules B7 à la surface des cellules présentatrices d'antigènes ou des cellules tumorales, avec le marqueur membranaire CD28 exprimé par les lymphocytes T. Or, la molécule CTLA-4, exprimée par les lymphocytes T après leur activation, est capable d'inhiber ce signal de costimulation en se liant elle-même à la molécule B7 et en délivrant un signal inhibiteur.

L'interaction CD28/B7 ne participe pas seulement à la cytotoxicité directe des lymphocytes T mais aussi au recrutement de composants des réponses immunes innées et adaptatives. Ainsi, en bloquant l'activité des récepteurs CD28, CTLA-4 bloque l'efficacité de la réponse immunitaire. CTLA-4 est notamment fortement exprimée par les lymphocytes Treg, ce qui augmente leur prolifération et leur activité immunosuppressive.

Les travaux pionniers de James Allison dans les années 1990<sup>245</sup> avaient démontré que le traitement par un anticorps bloquant CTLA-4 augmentait l'immunogénicité des tumeurs. On sait aujourd'hui que le blocage de CTLA-4 favorise l'activation du système immunitaire, à la fois directement en bloquant l'inhibition des T effecteurs anti-tumoraux et, indirectement, en invalidant la capacité des lymphocytes Treg à protéger la tumeur<sup>246</sup>. Le blocage de CTLA-4 pourrait en outre permettre de réactiver les lymphocytes T rendus anergiques, en induisant leur résistance aux lymphocytes Treg. L'expression de CTLA-4 semble en effet essentielle à la fonction des lymphocytes Treg, en particulier dans les cancers, comme l'a montré l'étude de Sakaguchi<sup>247</sup>.

Ainsi, l'anticorps anti-CTLA-4 ou ipilimumab a démontré son efficacité dans deux essais cliniques de phase III, chez des patients atteints de mélanomes<sup>248</sup>, et a reçu une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) en 2011 dans le mélanome métastatique, où il a permis d'obtenir une amélioration de la survie des patients de plusieurs mois<sup>249</sup>.

#### **- L'anti-PD-1**

La molécule PD-1 est également exprimée par les lymphocytes T après leur activation, et particulièrement par les lymphocytes Treg. La voie PD-1 est utilisée principalement dans les tissus périphériques, où les lymphocytes T sont exposés à ses ligands: PD-L1 et PD-L2,

exprimés par les cellules tumorales et leur stroma. L'interaction récepteur-ligand inhibe l'activation des cellules T et la lyse engendrée par les CTL<sup>205</sup>.

L'expression de PD-L1 a été rapporté dans divers types de tumeurs humaines<sup>250</sup> et apparaît comme un mécanisme majeur mis en place par les tumeurs pour échapper au système immunitaire de l'hôte. Le blocage de PD-1 par son Ac a été testé en phase I, la plus grande cohorte comprend 296 patients et des réponses sont mises en évidence chez 15 à 20% des patients présentant des carcinomes du poumon non à petites cellules, des mélanomes, des cancers de rein. En revanche aucune réponse n'a été observée chez les patients présentant des cancers de prostate ou du colon, qui sont des tumeurs qui n'expriment pas PD-L1. De la même manière que pour ipilimumab, les réponses sont parfois durables et parfois même jusqu'à un an ou plus<sup>251</sup>, ce qui est important pour des patients qui ont déjà été lourdement traités et qui ne répondent plus aux thérapies conventionnelles.

- **La combinaison** de ces deux anticorps a également été testée et démontre une régression rapide et importante de la tumeur dans presque 1/3 de patients atteints de mélanome<sup>252</sup> et traités par anti-CTLA-4 et anti-PD-1. De plus, certains patients continuent de répondre après l'arrêt du traitement ce qui suggère l'établissement d'une mémoire immunitaire.

#### c) La vaccination anti-tumorale

Les vaccins thérapeutiques anti-tumoraux sont conçus pour stimuler les cellules immunitaires qui ciblent spécifiquement les antigènes tumoraux, et sont ainsi associés à une toxicité minimale.

Lorsque les cellules T lysent ces cellules cibles grâce à l'activation par un vaccin, de nouveaux antigènes tumoraux sont libérés et peuvent être capturés par les cellules présentatrices d'antigènes<sup>253</sup>. Ainsi, contrairement aux traitements standards anti-cancéreux, le système immunitaire peut élargir sa réponse à de multiples antigènes tumoraux avec le temps, et non seulement celui présenté par la construction vaccinale.

#### **- Les diverses préparations de vaccins anti-tumoraux possibles:**

\* Des cellules tumorales modifiées, par exemple en les transfectant avec des ADNc codant pour des molécules de co-stimulation (B7) ou pour des cytokines (IL-2) afin d'augmenter leur immunogénicité.

\* Des antigènes tumoraux synthétisés sous forme de peptides ou de protéines complètes qui seront présentés par des CMH à la surface de cellules présentatrices d'antigènes.

Actuellement des essais sont menés avec des antigènes tumoraux qui ont été fusionnés avec des ligands de la surface des cellules dendritiques, comme des chimiokines ou des fragments Fc d'immunoglobulines par exemple, pour adresser cet antigène à la cellule dendritique.

\* Des vecteurs viraux ou de l'ADN nu porteurs du gène codant pour l'antigène tumoral.

\* Des lysats tumoraux, qui contiennent des antigènes tumoraux

\* Des vaccins à base de cellules dendritiques, qui peuvent être préalablement chargées avec des peptides tumoraux, des extraits de cellules tumorales, des corps apoptotiques, des exosomes, ou encore être fusionnées avec des cellules tumorales

#### **- Quelques succès de l'immunothérapie reposant sur des vaccins anti-tumoraux:**

\* Sipuleucel-T est le premier vaccin thérapeutique commercialisé chez l'homme, il a été approuvé par la FDA, en juin 2010, après trois essais de phase III, et est destiné à des patients atteints de cancer de la prostate résistant aux anti-androgènes mais sans métastase viscérale. Le vaccin cellulaire comprend les cellules mononucléées autologues du patient sensibilisées *in vitro* avec une protéine de fusion associant la phosphatase acide prostatique, antigène tumoral, couplée au GM-CSF, qui permet de recruter des cellules myéloïdes et peut-être d'engager leur différenciation en cellules dendritiques.

Dans l'essai clinique de Kantoff et al.<sup>254</sup>, deux groupes de patients ont été vaccinés, soit avec le vaccin cellulaire soit avec les cellules mononucléées sans l'antigène. La diminution du risque de mortalité s'est avéré significative : 36 mois après le début du traitement, 31,7 % des patients ayant reçu le vaccin étaient vivants contre seulement 23 % dans le groupe ayant reçu le placebo, ce qui représente une amélioration de la survie globale de 4,1 mois (25,8 mois versus 21,7 mois,  $p = 0,03$ ) qui est un résultat significatif pour ce type de patients, résistants à la chimiothérapie.

\* Le groupe de P. Hwu a récemment montré dans un essai clinique de phase III randomisé qu'un vaccin anti-tumoral associant le peptide gp100, antigène de différenciation mélanocytaire, à de l'IL-2 à fortes doses est plus efficace que l'administration d'IL-2 seule à fortes doses chez des patients atteints de mélanomes métastatiques<sup>255</sup>. Ainsi le taux de réponse clinique chez les patients qui reçoivent le vaccin et l'IL-2 ( $n=91$ ) est de 16 % alors qu'il n'est que de 6 % en l'absence du vaccin ( $p=0,03$ ). La survie globale des patients ayant reçu le vaccin et l'IL-2 est de 17,8 mois contre seulement 11 mois chez les patients ayant reçu l'IL-2 seule ( $p=0,06$ ).

### **- Vers une amélioration des vaccins anti-tumoraux**

L'utilisation de peptides longs comprenant des épitopes peptidiques reconnus par les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, de virus recombinants avec les ADNc codant pour des antigènes tumoraux ou l'utilisation de DC sensibilisées avec des lysats tumoraux ou des peptides, s'est avérée efficace pour induire des réponses lymphocytaires T CD8<sup>+</sup> anti-tumorales dans des essais cliniques chez l'homme, et sont parfois associées à des réponses cliniques. Néanmoins, chez des patients atteints de cancers métastatiques, cette induction lymphocytaire est souvent transitoire <sup>256</sup>. Pour minimiser les risques d'immunisation contre le vecteur viral, des stratégies de type prime-boost utilisant deux différents vecteurs viraux recombinants codant pour le même antigène ont été développées avec un certain succès <sup>257</sup>. Des vecteurs non réplicatifs ciblant différentes sous-populations de cellules dendritiques ont également été développés. Ces nouveaux outils associés à l'identification de nouveaux adjuvants pour augmenter l'immunité cellulaire devraient permettre de mieux amplifier la réponse immune anti-tumorale sur les plans qualitatif et quantitatif.

#### d) Molécules visant à stimuler le système immunitaire

Si l'intérêt pour les immunothérapies se focalise aujourd'hui sur les vaccins anti-tumoraux et l'inhibition des voies immunosuppressives, il faut rappeler que l'immunothérapie active non spécifique fondée sur le principe d'une stimulation globale du système immunitaire chez des patients cancéreux a déjà fait ses preuves. Morales et al. ont été les premiers, en 1976 <sup>258</sup> a démontré des effets bénéfiques de la stimulation générale du système immunitaire dans le cancer de la vessie, l'injection intralésionnelle de BCG est désormais une méthode de référence dans le traitement des tumeurs non invasives de la vessie.

Les cytokines peuvent également être utilisées en immunothérapie en tant qu'activatrices du système immunitaire. On trouve notamment l'IL-2, nécessaire en faibles doses à la survie des lymphocytes activés, le GM-CSF et l'IFN- $\alpha$  pour stimuler les cellules présentatrices d'antigènes, qui ont été testés lors d'essais cliniques, parfois en combinaison. Leur effet potentialisateur de l'amplification et de la survie des populations lymphocytaires a été clairement établi. Par exemple, l'injection d'IL-2 et d'IFN- $\alpha$  est ainsi devenue le traitement de référence dans les cancers du rein métastatiques <sup>259</sup>.

#### e) Les thérapies visant à renforcer les réponses T par transfert de lymphocytes anti-tumoraux

Depuis plus de 20 ans, la majorité des immunothérapeutes cherchent à guérir le cancer en activant les lymphocytes T anti-tumoraux, cette approche se justifie par l'observation bien documentée d'une réponse naturelle lymphocytaire T reconnaissant différents types d'antigènes tumoraux. La mise en évidence de lymphocytes T anti-tumoraux dans d'exceptionnelles observations de régressions spontanées de tumeur chez l'homme, et le bon pronostic généralement associé aux tumeurs infiltrées par des lymphocytes T renforçaient cette hypothèse de travail. Les expériences pionnières de l'équipe de Rosenberg, dès 1984<sup>260</sup>, ont validé ce rôle positif des lymphocytes T lors de nombreux protocoles d'immunothérapie adoptive où des lymphocytes T autologues, activés et amplifiés *in vitro*, étaient réadministrés *in vivo*, ce qui aboutissait à une réduction du nombre et de la taille des métastases dans plusieurs modèles de tumeurs murines. Dans le modèle des macrométastases de l'adénocarcinome du côlon MC 38, c'est non seulement une disparition des métastases hépatiques ou pulmonaires qui était observée, mais une guérison de 100 % des souris<sup>261</sup>. Les souris guéries par ce traitement étaient de plus immunisées contre une nouvelle greffe des cellules provenant de la tumeur d'origine, car les lymphocytes transférés déclenchaient *in vivo* une cascade de sécrétions de cytokines et de coopérations cellulaires amplifiant la réponse spécifique anti-tumorale. Les résultats observés sur les tumeurs murines ayant été confirmés par plusieurs équipes, des essais cliniques ont été envisagés dans le traitement du mélanome et du cancer du rein. Un essai clinique de traitement des mélanomes par des lymphocytes activés a été mené en France<sup>262</sup> et montre une augmentation significative de la survie sans rechute des patients traités par des lymphocytes activés, par rapport au groupe témoin. De plus, une corrélation est observée entre l'efficacité clinique et le pourcentage de lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux.

Cependant, beaucoup d'efforts ont été focalisés sur les procédés techniques d'amplification des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mais aucun protocole pleinement satisfaisant n'est encore disponible car la fréquence des lymphocytes T spécifiques des cellules tumorales demeure extrêmement variable d'un patient à l'autre.

#### f) Thérapies combinées

Combiner l'action des mécanismes d'immunosuppression et celle d'activateurs du système immunitaire dans des protocoles d'immunothérapie montre son efficacité dans les

modèles murins et représente sans doute la seule voie d'avenir pour l'immunothérapie des tumeurs humaines <sup>263</sup>.

Ainsi, les stratégies de combinaisons thérapeutiques incluent la combinaison de plusieurs immunothérapies, notamment la vaccination anti-tumorale et les anticorps visant à inhiber les voies immunosuppressives (comme anti-CTLA-4 et anti-PD-1), mais aussi la combinaison de ces nouveaux agents avec les thérapies anti-tumorales courantes.

Récemment, des études suggèrent l'intérêt de réaliser des thérapies combinées pour leur action synergique. La prise en compte de l'immunosuppression associée au cancer et la combinaison de l'immunothérapie avec les traitements conventionnels tels que la chimiothérapie <sup>264</sup>, la radiothérapie <sup>265</sup> ou les anti-angiogéniques <sup>266</sup> devraient encore améliorer l'efficacité et les indications cliniques des immunothérapies, notamment dans le traitement du cancer du sein <sup>267</sup>.

## **Chapitre 5 : L'interleukine-17**

### **1- Caractérisation**

L'IL-17, également appelée IL-17A, fait partie d'une famille de cytokines composée de 6 membres, l'IL-17A, l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D, l'IL-17E (aussi connue comme IL-25) et l'IL-17F <sup>268</sup>. Cet ensemble de cytokines existe aussi bien chez la souris que chez l'Homme.

IL-17A est le prototype et le membre le mieux caractérisé de la famille des cytokines IL-17. Chez l'Homme le gène codant l'IL-17A est localisé sur le chromosome 6p12. La séquence d'acides aminés de l'IL-17A partage environ 55% d'homologies avec celle de l'IL-17F, ainsi les IL-17 A et F peuvent être secrétées sous forme d'homodimères ou peuvent former un hétérodimère IL-17A/F <sup>268</sup>.

#### **a) Récepteurs d'IL-17 et signalisation**

La signalisation engendrée par la famille des cytokines IL-17 a lieu grâce à la liaison à leur récepteur (IL-17R), ces récepteurs forment également une famille de 5 sous-unités, de l'IL-17RA à l'IL-17RE <sup>269</sup>. Tandis que les homodimères IL-17A et IL-17F, ainsi que l'hétérodimère IL-17A/F se lient au même complexe IL-17RA/RC, l'IL-17B, C et E sont reconnues respectivement par l'homodimère d'IL-17RB, l'homodimère d'IL-17RE, et le complexe IL-17RA/RB (Tableau 7).

Récepteur	Ligand(s)
IL-17RA/RC	IL-17A, IL-17F, IL-17A/F, vIL-17*
IL-17RA/RB	IL-17E
IL-17RA/RD	inconnu
IL-17RB	IL-17B
IL-17RD	inconnu
IL-17RE	IL-17C
inconnu	IL-17D

**Tableau 7: Récepteurs et ligands de la famille des IL-17 (\*IL-17 viral)**

Les récepteurs IL-17RA et IL-17RC sont des protéines transmembranaires ubiquitaires, IL-17RA a une expression particulièrement élevée sur les cellules immunitaires alors qu'IL-17RC est exprimé préférentiellement sur les cellules non-immunes <sup>269</sup>.

Lorsqu'IL-17A se lie à son récepteur cela induit le recrutement de la molécule adaptatrice Act1, IL-17R et Act1 interagissent alors, via leur domaine respectif SEFIR <sup>270</sup>, et recrutent d'autres molécules adaptatrices telle que TRAF6. L'IL-17 active ainsi la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, qui induit la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-6 et les facteurs de transcription I $\kappa$ B $\zeta$  et C/EBP, ainsi que les MAPK et éventuellement PI3K <sup>269</sup>.

#### b) Cellules productrices d'IL-17

A l'origine, l'IL-17 a été caractérisée comme une cytokine sécrétée par une sous-population particulière de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, appelée Th17. Elle est, en réalité, aussi produite par plusieurs cellules de l'immunité telles que les lymphocytes NKT, les lymphocytes T $\gamma$  $\delta$ , les lymphocytes NK, les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et des neutrophiles <sup>268</sup>.

#### **- Les lymphocytes Th17**

Bien que l'IL-17A ait été caractérisée dès le début des années 1990, les cellules Th17 ne l'ont été qu'en 2005. Comme vu précédemment (Chapitre **4 / 2 / b**) ces cellules produisent majoritairement de l'IL-17A mais également toute une variété de cytokines incluant l'IL-17F, l'IL-21, l'IL-22, le TNF- $\alpha$  et l'IL-26.

Un des marqueurs essentiels des lymphocytes Th17 *in vivo* est le récepteur aux chimiokines CCR6 qui permet à ces cellules de migrer vers les sites inflammatoires. Les cellules Th17 jouent ainsi un rôle dans l'inflammation, l'auto-immunité et le développement tumoral.

En effet, le transfert adoptif de lymphocytes Th17 chez des souris porteuses de mélanome B16 permet de faire régresser les tumeurs, résultat attribuable en grande partie à la production d'IFN- $\gamma$  par des lymphocytes Th17 exprimant un phénotype mixte Th17/Th1<sup>271</sup>. Ceci est un exemple parmi plusieurs études sur les modèles tumoraux murins, et bien que ceux-ci démontrent tous un rôle anti-tumoral des cellules Th17, cet effet n'est pas toujours retrouvé lorsque ces cellules sont naturellement infiltrées dans les tumeurs humaines. Ainsi, une forte densité de lymphocytes Th17 infiltrant la tumeur a été corrélée avec de mauvais pronostics pour les cancers hépatocellulaires<sup>272</sup>, du colon<sup>273</sup>, et du pancréas<sup>274</sup>, en revanche, la survie de patientes présentant des carcinomes ovariens est meilleure chez les patientes avec de hautes densités de lymphocytes Th17 dans les ascites associées aux tumeurs<sup>275</sup>.

Les cellules Th17 infiltrant les tumeurs démontrent donc deux rôles opposés sur la croissance tumorale. D'une première part, plusieurs études ont montré que les Th17 pouvaient, par leur production d'IL-21, augmenter les fonctions anti-tumorales des cellules NK et des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, ainsi que la production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , entre autres. La présence de Th17 augmenterait le recrutement de lymphocytes T CD4+ dans la tumeur et s'accompagnerait d'une diminution de la croissance tumorale<sup>275</sup>.

D'autre part les lymphocytes Th17 peuvent, de par leur forte production d'IL-17A, promouvoir la néoangiogénèse et la lymphangiogénèse, et inhiber l'immunosuppression.

## **2-Fonctions immunologiques de l'interleukine-17**

L'IL-17 a plusieurs activités biologiques pléiotropiques, essentiellement en induisant ou en surexprimant plusieurs gènes. IL-17A cible des gènes de cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, enzymes, MMP et molécules anti-microbiennes<sup>276,277</sup>, et régule, via ces molécules, plusieurs réponses immunitaires de l'hôte.

### **a) Granulopoïèse/Inflammation**

Cette cytokine joue un rôle important dans la granulopoïèse. En effet, l'IL-17A induit la production de G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), permettant la différenciation terminale des granulocytes et leur survie, et de GM-CSF, soutenant la maturation des progéniteurs des neutrophiles, par les cellules stromales humaines telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales et épithéliales<sup>278</sup>. L'IL-17A peut aussi stimuler la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  par les monocytes, et augmenter la libération de chimiokines

attractantes de type CXC. Plus précisément, en présence d'IL-4, d'IL-13 et d'IFN- $\gamma$ , elle induit la production de CXCL8, qui permet le recrutement de neutrophiles. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'IL-17 favorise la granulopoïèse et le recrutement des neutrophiles à travers ces molécules<sup>278</sup>.

De plus, à travers l'induction d'autres chimiokines attractantes, telles que CXCL9, CXCL10 et CXCL11, IL-17A participe au recrutement de cellules Th1. L'IL-17A induit aussi l'expression de CCL20 dans les fibroblastes et cellules épithéliales, ce qui active le recrutement de cellules dendritiques immatures et de cellules T CCR6<sup>+</sup>. L'IL-17A crée ainsi une boucle de rétrocontrôle positive favorisant les cellules productrices d'IL-17 et finalement un environnement inflammatoire induisant son propre recrutement et sa séquestration<sup>279</sup>.

#### b) Défense immunitaire contre des pathogènes infectieux

Le rôle principal de l'IL-17 se joue dans la défense immunitaire, en particulier contre les infections bactériennes et fongiques. Cela a été démontré en neutralisant l'IL-17A ou son récepteur ce qui a augmenté la sensibilité à plusieurs pathogènes<sup>280</sup>.

#### c) Implication de l'IL-17 dans certaines maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes ont longtemps été associées à une réponse de type Th1 excessive et non contrôlée par le système immunitaire. Aujourd'hui, plusieurs études ont démontré que certaines maladies auto-immunes sont en fait le résultat d'une activation de la voie Th17<sup>281</sup>. C'est aussi le cas pour l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), une affection induite chez la souris et servant de modèle pour l'étude de la sclérose en plaques chez l'Homme. Pour étudier le rôle des cellules Th17 dans cette maladie, des souris invalidées, tant pour le gène de l'IL-17A que pour ceux de l'IL-23, l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-1, ont été utilisées. Les résultats ont montré que ces souris ne développaient pas l'EAE<sup>277</sup>. De plus, il a été prouvé que l'axe cytokinique IL-23/IL-17A, plutôt que l'IL-12/IFN- $\gamma$ , est crucial dans la pathogenèse de la maladie.

Cette étude a également montré que les souris déficientes pour l'IL-23 ou pour l'IL-12 sont aussi résistantes à l'induction de l'arthrite rhumatoïde par le collagène, une autre maladie auto-immune<sup>282</sup>.

Un rôle de l'IL-17A a aussi été démontré dans les modèles murins expérimentaux de plusieurs pathologies auto-immunes telles que le psoriasis et l'asthme non atopique, et dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales telles que la maladie de Crohn. De plus, de

manière importante et générale, les taux d'IL-17A, dans les différents organes concernés ou dans le sang, sont élevés dans ces différentes pathologies auto-immunes<sup>283</sup>.

#### d) IL-17 et cancer

L'association entre les conditions d'inflammation chronique et le développement tumoral n'est plus à démontrer, les cytokines pro-inflammatoires incluant IL-6 et IL-23 contribuent à la carcinogénèse et à la croissance tumorale directement ou indirectement via la voie STAT3<sup>284</sup>. Ces cytokines induisent la différenciation de cellules T CD4<sup>+</sup> en cellules Th17, qui sont alors une population importante au sein des lymphocytes T infiltrant la tumeur<sup>285</sup>, ainsi que le recrutement d'autres cellules productrices d'IL-17.

Ainsi, des niveaux d'IL-17 augmentés ont été trouvés dans les cancers du sein<sup>286</sup>, du côlon<sup>287</sup>, de l'ovaire<sup>288</sup>, du foie<sup>289</sup>, de l'œsophage<sup>290</sup>, du poumon<sup>291</sup>, et dans le glioblastome<sup>292</sup>. IL-17 y induit alors divers effets pro-inflammatoires tels que l'induction de GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23, et la production de MMP et diverses chimiokines<sup>293</sup> et joue un rôle pro-tumoral détaillé ci-dessous à travers les différentes phases du développement tumoral.

#### **- Carcinogénèse**

La surexpression d'IL-17A dans le microenvironnement tumoral démontre son rôle dans les débuts de la formation tumorale. Le rôle de l'IL-17A dans l'inflammation chronique est désormais évident<sup>294</sup> et est lié à la vaste accumulation de cellules Foxp3<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-17A dans le microenvironnement. L'augmentation d'IL-17A due à l'inflammation chronique peut alors provoquer la sécrétion de diverses cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6, ce qui va activer la voie de signalisation STAT3 et donc celle de NF- $\kappa$ B qui est associée à la production de cytokines pro-inflammatoires. De plus, il a aussi été montré que l'IL-17 active NF- $\kappa$ B en combinaison avec TNF- $\alpha$ , via le récepteur à l'IL-17B<sup>295</sup>.

Les cellules tumorales sont également capables de perpétuer l'inflammation locale grâce à l'expression de ligands de chimiokines tels que CCL2 qui stimule l'entrée de monocytes exprimant IL-17A et qui contribuent à la réaction inflammatoire locale<sup>296</sup>.

#### **- Prolifération et survie des cellules tumorales**

Le rôle d'IL-17A dans l'établissement du cancer n'est pas seulement lié à l'établissement d'un environnement parfait pour la carcinogénèse. Selon le type de tumeur, cette cytokine peut également directement favoriser l'activation de la voie mTOR via la voie NF- $\kappa$ B ou de la production de dérivés réactifs de l'oxygène qui active la voie MEK-ERK, et ainsi favoriser la prolifération des cellules tumorales<sup>297</sup>. L'IL-17A peut aussi directement

favoriser la prolifération de cellules tumorales en activant les voies STAT3 et NF- $\kappa$ B, ou leur résistance à l'apoptose via l'expression de gènes anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, A1 ou Mcl1<sup>297</sup>.

#### **- Angiogenèse/lymphangiogenèse tumorale**

L'IL-17A augmente la production de VEGF et d'autres facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales et les fibroblastes, permettant la création de nouveaux vaisseaux sanguins pour alimenter la tumeur<sup>298</sup>. Un net effet angiogénique a également été démontré via la production d'IL-8 (ou CXCL-8) et de son interaction avec son récepteur CXCR-2. CXCL-8 est en effet maintenant reconnu comme un stimulateur puissant de l'angiogenèse et de croissance tumorale<sup>299</sup>.

L'IL-17A promeut également la lymphangiogenèse qui concourt à la colonisation des ganglions lymphatiques par les cellules métastatiques<sup>300</sup>.

#### **- Métastases**

L'association de métastases avec des niveaux élevés d'IL-17A a été démontrée et est liée à l'activation de la néo-angiogenèse dépendante de CXCR-2<sup>301</sup>. De plus, l'étude de Li et al.<sup>291</sup> a montré que l'IL-17A induisait des métastases en activant et en surexprimant la voie de signalisation de l'IL-6.

#### **- Cas particulier du rôle d'IL-17 dans le cancer du sein**

Comme cité plus haut, des niveaux d'IL-17A augmentés ont été trouvés dans de nombreux types de cancers, et les niveaux d'IL-17A et de cellules productrices d'IL-17A sont notamment augmentés dans les cancers du sein, en comparaison aux niveaux trouvés dans les tissus sains<sup>302,303</sup>. Ces résultats sont retrouvés dans la cohorte de Chen et al.<sup>286</sup> où l'infiltration des cancers par les cellules productrices d'IL-17 est corrélée avec un mauvais pronostic.

Mes travaux ont porté sur le rôle particulier de l'IL-17 sur le cancer du sein. Or, dans ce cancer, il a déjà été démontré que l'IL-17A peut favoriser la dissémination de cellules tumorales<sup>302</sup> et est nécessaire pour la croissance d'une lignée cellulaire tumorale murine *in vivo*<sup>304</sup>. Ces résultats ont été confortés par l'étude de Cochaud et al.<sup>201</sup> qui confirme que l'IL-17A produit par les lymphocytes T infiltrant la tumeur stimule la migration et l'invasion des cellules tumorales ainsi que la prolifération de plusieurs lignées cellulaires tumorales humaines. Cette étude démontre également que cette prolifération est favorisée par l'IL-17A via l'activation de la voie de signalisation ERK, qui est une voie importante pour la survie des

cellules tumorales. Selon les travaux de cette même équipe la voie ERK est également un médiateur important dans la résistance au docétaxel induite par l'IL-17A, la cytokine influencerait donc la réponse aux traitements chimiothérapeutiques. En effet, bien que l'IL-17A ne soit pas statistiquement associée à cette réponse, sa présence ou absence influence drastiquement la survie sans rechute des patientes sous chimiothérapie ( $p < 0,01$ ) puisque la SSR à 5 ans passe de 81,5% pour les patientes IL-17A<sup>-</sup> à 38,5% pour les IL-17A<sup>+</sup> ce qui mène à penser que l'IL-17A a un impact important dans le groupe des patientes présentant une tumeur localement avancée et traitées par chimiothérapie <sup>201</sup>.

### 3-IL-17 : Cible thérapeutique

Etant donné les rôles pathogéniques conférés à l'IL-17A, différents essais cliniques visant à inhiber le développement des lymphocytes Th17 ou à neutraliser directement l'IL-17A ou son récepteur ont été lancés.

#### a) Contre les maladies auto-immunes

Récemment, des équipes travaillant sur le traitement du psoriasis ont publié des résultats très prometteurs. Deux anticorps anti-IL-17A (Ixekizumab et Secukinumab) ainsi qu'un anticorps dirigé contre le récepteur de l'IL-17A (Brodalumab) ont été développés et testés. Les résultats des essais cliniques montrent de réelles améliorations concernant la sévérité de la maladie chez des patients atteints de psoriasis modéré à sévère de par l'utilisation de ces trois anticorps, qui bloquent l'action pro-inflammatoire de l'IL-17A. Des essais plus importants et plus longs sont attendus pour déterminer l'efficacité et la tolérance de ces agents biologiques, cependant les résultats sont très prometteurs <sup>305</sup>.

Des essais cliniques à partir des mêmes anticorps neutralisants l'IL-17A ou son récepteur sur des patients atteints de sclérose en plaques ont, de la même manière, apporté des résultats très encourageants pour le traitement de la maladie <sup>306</sup>.

Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde et de la maladie de Crohn, des anticorps monoclonaux anti-récepteur à l'IL-6 ou un antagoniste du récepteur de l'IL-1 $\beta$  ont constitué une approche très intéressante <sup>307,308</sup>. Même si les mécanismes d'actions précis de ces molécules ne sont pas connus, il est possible que les effets thérapeutiques observés soient dus, en partie, à l'inhibition de la différenciation des lymphocytes Th17.

Plus récemment, un inhibiteur de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B a été utilisé comme traitement des maladies inflammatoires intestinales <sup>309</sup>. L'inhibition de cette voie de

signalisation entraîne une réduction de l'expression des ARNm de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-17A, mais aussi l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$ , et réduit de ce fait les symptômes de la maladie.

D'autre part, un anticorps monoclonal anti-IL-17A (CMA17Aab) a été testé chez des souris et montre des effets bénéfiques en regard de paramètres histologiques et cliniques, cet anticorps est donc un régulateur important de la polyarthrite rhumatoïde et pourrait représenter un nouvel agent thérapeutique utile dans le traitement de cette maladie <sup>310</sup>.

Ainsi, les ciblage de l'IL-17A, du récepteur de l'IL-17A, de la voie de signalisation induisant la production de l'IL-17A ou encore la voie de signalisation médiée par l'IL-17A peuvent être considérés comme des moyens de traitement thérapeutiques de différentes maladies auto-immunes.

#### b) Contre le cancer

Des anticorps bloquant l'IL-17A ont également été développés pour l'étude de mécanismes de tumorigénèse. Ainsi Wu et al. voulant comprendre le rôle de la bactérie ETBF (enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*) dans le développement de tumeurs du colon ont bloqué IL-17A et le récepteur d'IL-23 qui est une cytokine clé pour l'amplification des réponses Th17 par des anticorps, ce qui a bloqué la formation tumorale.

#### **- Cas particulier du cancer du sein**

La corrélation entre l'infiltration des cancers par les cellules productrices d'IL-17A et un mauvais pronostic <sup>286</sup> est un premier pas vers l'établissement d'IL-17A comme cible thérapeutique.

La neutralisation spécifique de l'IL-17A a ensuite été testée à l'aide d'anticorps monoclonaux OREG-203 et OREG-210 <sup>201</sup>, qui a abouti à une inhibition de la prolifération, de la chimiorésistance et de la migration/invasion des cellules tumorales. En résumé les anticorps neutralisant l'IL-17A ont annulé les effets pro-oncogéniques de l'IL-17A sécrétée par les lymphocytes T infiltrant la tumeur. La modulation de la sensibilité des cellules tumorales aux chimiothérapies par l'IL-17A est un axe important de l'étude de Cochaud et al. <sup>201</sup> qui révèle que cette cytokine pourrait être une source de résistance thérapeutique trouvée dans le cancer du sein et donc reflète l'importance clinique de l'IL-17A. Cela suggère l'opportunité thérapeutique intéressante des anticorps anti-IL-17 qui pourraient bloquer les effets pro-tumoraux et pro-métastatiques de l'IL-17A tout en permettant l'éradication tumorale jouée par les cellules Th17 via la production d'IFN- $\gamma$ .

# ***RESULTATS***

## **A) Recherche clinique : Stratégie néoadjuvante des cancers du sein opérables, étude des facteurs pronostiques**

### **1- Synthèse**

Dans cet article nous analysons l'intérêt pronostic de la CTNA du cancer du sein opérable au-delà de l'objectif principal mais réducteur d'augmenter le taux de chirurgies conservatrices. En effet, cette pratique thérapeutique constitue un modèle individuel de chimiosensibilité in vivo qui permet la détermination de nouveaux facteurs pronostics dans le but de nous conduire vers une approche thérapeutique de plus en plus personnalisée.

Une étude monocentrique rétrospective de 319 patientes présentant un cancer du sein invasif primaire et traitées entre les années 2000 et 2012 a été conduite afin d'analyser les facteurs pronostics d'une population traitée de manière homogène. En effet les patientes sont toutes traitées par une médiane de 6 cycles de CTNA: à base d'anthracyclines, selon le protocole FEC 100 (31,1%) ou séquentielle anthracyclines + taxanes, très majoritairement docétaxel (53,3%), et avec addition de trastuzumab si indiquée (15,4%).

Notre analyse univariée a alors démontré que l'index RDBN (Residual Disease in Breast and Nodes) est le plus significatif des facteurs pronostics des survies globale ( $p=0.0082$ ) et sans rechute à 10 ans ( $p=0.0022$ ). Quant à l'analyse multivariée, dans laquelle nous ne pouvons pas insérer l'index RDBN puisqu'il est par description associé aux différents facteurs histopathologiques, elle a principalement révélé la taille tumorale résiduelle, le nombre de ganglions envahis résiduels et le grade SBR évalué après la CTNA; facteurs qui constituent l'index RDBN.

Les sous-types moléculaires de cancers du sein étant de plus en plus présents dans la pratique des oncologues, nous nous sommes également interrogés sur la capacité de cet index à conserver sa valeur pronostic dans chaque sous-type. Bien que nous ayons manqué d'effectif pour conclure sur le sous-groupe des tumeurs HER2-positives ( $p>5\%$ ), nous avons déjà pu démontrer la valeur pronostique de RDBN pour les tumeurs TN (SG:  $p=0,0064$  / SSR:  $p=0,013$ ) et une bonne discrimination pour les taux de SSR des tumeurs luminales ( $p=0,0031$ ). Nous avons également prouvé la supériorité de l'index RDBN face à la

classification de Chevallier lorsqu'il s'agit de prédire les taux de survie des différents sous-types de cancers du sein.

L'analyse de cette série de patientes traitées avec les drogues majeures du cancer du sein disponibles à l'heure actuelle, nous a donc permis de souligner un intérêt important de la CTNA, qui est d'apporter de nouveaux facteurs pronostics, ainsi que de confirmer la valeur pronostique de l'index RDBN. Zhang et al.<sup>311</sup> a dit "Avec la classification des sous-types moléculaires et les stratégies thérapeutiques orientées, le cancer du sein n'est plus vu comme une seule maladie. L'évaluation des facteurs pronostiques devrait désormais prendre en compte les sous-types et les traitements." En accord avec cela, nous suggérons que l'index RDBN est l'index le plus approprié pour la classification de la maladie résiduelle et donc pour prédire les taux de survie après CTNA, il pourrait alors être calculé en routine afin d'aider les cliniciens à ajuster leur stratégie thérapeutique adjuvante.

**Prognostic factors in Operable Breast Cancer treated by  
Neoadjuvant Chemotherapy (NACT): towards a quantification of the  
residual disease.**

Sarah Mombelli<sup>1,\*</sup>, Fabrice Kwiatkowski<sup>2</sup>, Catherine Abrial<sup>2</sup>, Qian Wang-Lopez<sup>2</sup>, Paul de Boissieu<sup>3</sup>, Christian Garbar<sup>1</sup>, Armand Bensussan<sup>1,4</sup>, Hervé Curé<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Jean Godinot Institute, 51726 Reims, France

<sup>2</sup> Jean Perrin Comprehensive Cancer Center, BP 392, 63011 Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup> Reims University Hospital, 51100 Reims, France

<sup>4</sup> Inserm UMR 976, 75475 Paris, France

Short title: Prognostic factors in Operable Breast Cancer treated by Neoadjuvant Chemotherapy

\* Corresponding author: Jean Godinot Institute, Departement of clinical research, 1 rue Général Koenig, CS 80014, 51723 Reims, France. Tel.: +33 32650 4295. Fax: +33 32650 4489  
E-mail address: sarah.mombelli@reims.unicancer.fr

## **ABSTRACT**

Objective: NACT allows a more frequent conservative surgery; it is also an in vivo model of individual tumor sensitivity which permits to determine new prognostic factors to personalize the therapeutic approach.

Methods: Between 2000 and 2012, 318 patients with primary invasive breast cancer were treated with a median of 6 cycles of NACT: anthracycline-based in FEC 100 protocol (31.1%) or anthracyclines + taxanes (53.5%), with trastuzumab if indicated (15.4%).

Results: With a median follow-up of 44.2 months, pCR according to Chevallier's classification was 19.3% and overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) at 10 years were 60.2% and 69.6% respectively.

Univariate analyses demonstrated that "Residual Disease in Breast and Nodes" index was the most significant prognostic factor of OS ( $p=0.0082$ ) and DFS ( $p=0.0022$ ) and multivariate analyses mainly revealed residual tumor size, residual involved node number and post-chemotherapy SBR grading.

Conclusions: In an homogeneously treated set of patients with all major drugs of BC, we underlined an important interest of NACT, which is to bring additional prognostic factors, and we confirmed the RDBN index. According to the fact that it also permitted to predict survivals of different breast cancer subtype, we suggested that it should be calculated routinely to help clinicians to select patients who need adjuvant treatments.

*Key words:* Operable breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, prognostic factors, residual disease in breast and nodes

## INTRODUCTION

Neoadjuvant chemotherapy (NACT) is now a gold-standard for locally advanced breast cancer and inflammatory breast cancer. This treatment has been more extensively used in patients with operable smaller tumors, and several studies have effectively demonstrated its feasibility and efficacy [1-2]. Even if multiple randomized clinical trials have demonstrated that NACT is associated with OS and DFS comparable to the administration of the same therapy in the adjuvant setting [3], its use presents with great advantages: the first goal is to enhance breast conservation surgery rate in reducing tumor size. NACT also permits early treatment of micro-metastatic disease and over all allows the precise analysis of *in vivo* sensitivity of tumor, directly on surgical piece.

It has been shown that prognostic factors are frequently modified on the residual disease in comparison with the initial sampling [4-6]. Tumor size, histologic grade, node involvement are classic factors which have been described at primary surgery, but much less after primary CT. So, in order to clarify the prognostic value of tumor response, we investigated factors obtained at surgery after NACT in patients with operable breast cancer (OBC) .For the future, using a quantitation method to evaluate the impact of residual disease in breast and nodes is a proposed approach to progress towards an objective basis for improvement of efficacy throughout adjuvant therapy.

## **PATIENTS & METHODS**

### *Study design and patients*

This study is a retrospective monocentric analysis of all women over 18 who had undergone NACT for previously untreated primary invasive breast carcinoma at the Institute Jean Godinot (Reims - FRANCE), from January 1<sup>st</sup>, 2000 to December 31<sup>th</sup>, 2012. It represents 318 operable patients without or only with axillary lymph node(s) invasion (N0 or N1/N2). Patients with primary inflammatory carcinoma or metastatic disease were excluded, as well as bilateral or multifocal carcinomas.

The baseline work-up included a complete history and clinical examination and breast ultrasound. The diagnosis of carcinoma was established through fine-needle aspiration or core biopsy of the primary tumor and palpable lymph nodes. The tumor was evaluated for Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading [7]; and hormone receptors (HR) and epidermal growth factor receptor-2 (HER2) were assessed by radioimmunology or immunohistochemistry. The absence of distant metastases was confirmed by chest X-ray, bone scan, and liver ultrasound or chest-abdomino-pelvic scan.

### *Treatment modalities*

Our 318 patients were all treated homogeneously, with a median of 6 cycles of NACT: 31.1% by anthracyclines (>98% by FEC 100 combination: 500 mg/m<sup>2</sup> Fluorouracil and cyclophosphamide, 100 mg/m<sup>2</sup> epirubicin), 53.5% by anthracyclines + taxanes (100 mg/m<sup>2</sup> docetaxel or 175 mg/m<sup>2</sup> paclitaxel). Then, 15.4% of patients had HER2-positive tumor and so received also neoadjuvant trastuzumab. This targeted therapy was given for one year, every three weeks (375 mg/m<sup>2</sup>/course - x18 courses).

After primary CT, patients underwent appropriate surgery according to the size of their residual tumor, 4-8 weeks after the completion of the last cycle of NACT. We have distinguished mastectomies (40.6%) and breast conservative surgeries (58.8%). Axillary lymph node dissection was performed in almost all patients (99.4%). Two patients didn't have surgery: one of them was dead before her surgery because of myocardial infarction, and one refused all treatment after NACT, these patients were excluded for post-operative analyses.

In case of significant residual disease patients could receive additional courses of adjuvant CT (10.7%) with non-cross-resistant cytotoxic drugs.

Radiotherapy was given (98.7%) in line with best practice standards and patients with HR-positive tumors received anti-hormone therapy (98.7%) for 5 years. Three HR-positive patients refused hormonotherapy (1.3%), because of pregnancy wish.

### *Subtype classification*

The 13<sup>th</sup> International Breast Cancer Conference held in St Gallen in 2013 [8] we have described 5 intrinsic subtypes in breast cancer. We have grouped luminal A-like, luminal B/HER2-negative-like and luminal B/HER2-positive-like tumors in luminals tumors and so classified BC as follow:

- Luminals tumors were estrogen receptor (ER) and/or progesterone receptor (PgR) positive.
- HER2-positive-like tumors were HER2 positive and HR negative.
- Triple-negative (TN) tumors were HR and HER2 negative.

### *Assessment of response*

Clinical and ultrasound measurements were recorded before and at the end of NACT, before surgery. These responses were evaluated by the decrease in tumor

and node volumes, and classified: complete response (CR) for total disappearance, partial response (PR) for >50% reduction, moderate response (MR) for <50% reduction, or no change (NC).

The pathological responses were evaluated after surgical resection of the remaining tumors and nodes. The pathological responses were classified according to Chevallier et al. [9]; the complete pathological response (pCR) was considered as the sum of classes I and II.

We have also evaluated the pathological response by means of a new proposed classification for residual disease by Chollet et al., called RDBN [10]. The pathological staging after neoadjuvant chemotherapy classifies patients as follows:

Level 1: pCR in breast and nodes, without or with in situ carcinoma, Index = 0

Level 2-4: residual disease in 3 different amounts, calculated as  $0.2 \times (\text{residual breast tumor size in cm}) + \text{index of involved nodes (0 for no positive node, 1 for 1-4 nodes, 2 for 5-7 nodes, 3 for } \geq 8 \text{ nodes)} + \text{final SBR grade (1, 2 or 3)}$ .

- Level 2 is an index between 0.1 and 2.9
- Level 3 is an index between 3.0 and 4.3
- Level 4 is an index  $\geq 4.4$

### *Statistical analyses*

The primary endpoint was to evaluate prognostic factors of OS and DFS. Secondary outcomes were OS and DFS, clinical, paraclinical and pathological response rates, pathological report of residual disease (tumor and nodes), and breast conservation rate.

The Chi-square test was used to compare the distribution of baseline characteristics, and the Wilcoxon test for continuous variables. A 5% significance level was used and all  $p$  values were two sided.

Results were last updated in September 2013. DFS was defined as the time elapsed between diagnosis and date of first time relapse. OS was the time between the date of diagnosis and date of last status report, with the patient being alive or dead. Survival curves were established according to the Kaplan and Meier method [11].

A stepwise Cox regression procedure was carried out to determine which factors were prognostic for OS and DFS. First factors selected for inclusion in the Cox model were evaluated at diagnosis: SBR grading and stage, we've always kept it because it was the base of which we wanted to compare with factors evaluated on residual tumor after NACT. Tumor size at diagnosis and initial axillary nodal status were not included because they are strongly correlated with stage. Then, second factors selected for inclusion in the model were residual tumor size and nodes number, post-CT SBR grading and Chevallier's classification.

## RESULTS

### *Population characteristics and responses*

The median age was 51 years (range, 25-80) and 166 of the 318 patients were menopausal. Patient's clinicopathological characteristics are detailed in table 1. 7.5% of initial tumor size measured less or equal than 2 cm, 71.1% more than 2 cm and 19.8% more than 5 cm. Besides, 49.1% of patients were classified N0, 48.4% N1, and 2.5% N2; so we found 80.8% stage I and II, and 19.2% stage III tumors. SBR grading at diagnosis, available in 284 patients, was I in 10%, II in 49.8% and III in 40.2% of tumors. There were 70.4% HR-positive tumors, and HER2 status was positive for 16.4% of patients.

The observed intrinsic subtypes were as follows: 70.1% luminals, 6% HER2-positive-like tumors and 23% TN tumors.

Clinical, ultrasound and pathological responses of tumors are listed in Table 2; CR and PR were grouped on objective responses (OR), and MR and NC as non-responders. NACT resulted in a clinical OR rate of 67.3%, this response was significantly different according to the regimen used ( $p = 0.0037$ ); patients treated with trastuzumab added to NACT presented the highest rate: OR = 83.7%.

Concerning ultrasound response, the global OR rate was of 70.4% after NACT but there was no significant difference in between treatments ( $p = 0.29$ ).

Moreover, according to Chevallier's classification, a pCR rate on breast tumor and axilla was confirmed in 19.3% of operated patients, with a significantly higher rate for patients treated with trastuzumab plus NACT (40.8% -  $p < 0,005$ ).

Table 1. Characteristics of patients treated with NACT

<b>Characteristics</b> (n=318)	n (%)
<b>Median age (years)</b>	51 (25 - 80)
<b>Menopausal status</b>	
Pre-menopausal	150 (47.2)
Menopausal	166 (52.2)
ND	2 (0.6)
<b>Initial clinical tumor size (cm)</b>	
≤ 2	24 (7.5)
> 2, ≤ 5	226 (71.1)
> 5	63 (19.8)
ND	5 (1.6)
<b>Initial axillary nodal status</b>	
N0	156 (49.1)
N1	154 (48.4)
N2	8 (2.5)
<b>Stage</b>	
I	7 (2.2)
II	250 (78.6)
III	61 (19.2)
<b>SBR grading</b>	
I	29 (9.1)
II	145 (45.6)
III	117 (36.8)
ND	27 (8.5)
<b>Hormonal receptors</b>	
Positive	224 (70.4)
Negative	94 (29.6)
<b>HER2</b>	
Positive	52 (16.4)
Negative	263 (82.7)
ND	3 (0.9)
<b>Intrinsic subtype</b>	
Luminals	223 (70.1)
HER2-positive-like tumors	19 (6.0)
Triple Negative tumors	73 (23.0)
ND	3 (0.9)
<b>Surgery</b>	
Conservative	187 (58.8)
Mastectomy	129 (40.6)
No surgery	2 (0.6)
<b>Adjuvant treatment</b> (n=308)	
Chemotherapy	34 (10.7)
Radiotherapy	312 (98.1)
Hormonotherapy	223 (70.1)

ND = not done: missing data

Table 2. Responses after NACT

<b>Responses</b>	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Evaluated before surgery</b>	Overall (n=318)	A (n=99)	A+T (n=170)	H (n=49)
<b>Clinical responses</b>				
Objective (CR + PR)	214 (67.3)	69 (69.7)	104 (61.2)	41 (83.7)
Non-responders (MR+NC)	100 (31.4)	30 (30.3)	62 (36.5)	8 (16.3)
ND	4 (1.3)	0	4 (2.6)	0
Chi2 (%) - p = 0.0037				
<b>Ultrasound responses</b>				
Objective (CR + PR)	224 (70.4)	76 (76.8)	113 (66.5)	35 (71.4)
Non-responders (MR+NC)	92 (28.9)	23 (23.2)	56 (32.9)	13 (26.5)
ND	2 (0.6)	0	1 (0.6)	1 (2.0)
Chi2 (%) - p = 0,29 (NS)				
<b>Evaluated before surgery</b>	Overall (n=316)	A (n=99)	A+T (n=168)	H (n=49)
<b>Pathological responses</b>				
Classes I & II	61 (19.3)	17 (17.2)	24 (14.3)	20 (40.8)
Classes III & IV	255 (80.7)	82 (82.8)	144 (85.7)	29 (59.2)
Chi2 (%) - p = 0.000019				

### *Prognostic factors & univariate analyses*

The median follow-up for survival analyses was 44.2 months (range, 27-66 months). OS and DFS curves are shown in Figure 1; probability of OS at 10 years was 60.2% and DFS at 10 years of 69.6% (p = 0.011).

First, survivals were analyzed as a function of characteristics evaluated at diagnosis (Table 3, Figure 2); it showed that age and menopausal status were not significant prognostic factors (p > 0.05), initial tumor size seemed to have a prognostic influence only on OS (p = 0.036), conversely to initial axillary node status and stage which retained a prognostic influence on OS and DFS (p < 0.05). Patients N0 had a better prognostic than N1/N2 ones, as well as patients with low-stage tumors (stage I) *versus* stage II/III (Fig. 2a and b). Similarly, patients with low-grade tumors (SBR I) at

diagnosis had a better prognostic than SBR II and III grades (Fig. 2c), but prognostic influence of SBR grading at diagnosis was significant only for DFS ( $p = 0.025$ ). Estrogen and progesterone receptors, grouped in HR, as well as HER2, evaluated at diagnosis, had no significant influence on OS and DFS ( $p > 0.05$ ). Then, after NACT but before surgery, clinical and ultrasound responses were evaluated and had neither significant influence on OS and DFS ( $p > 0.05$ ).

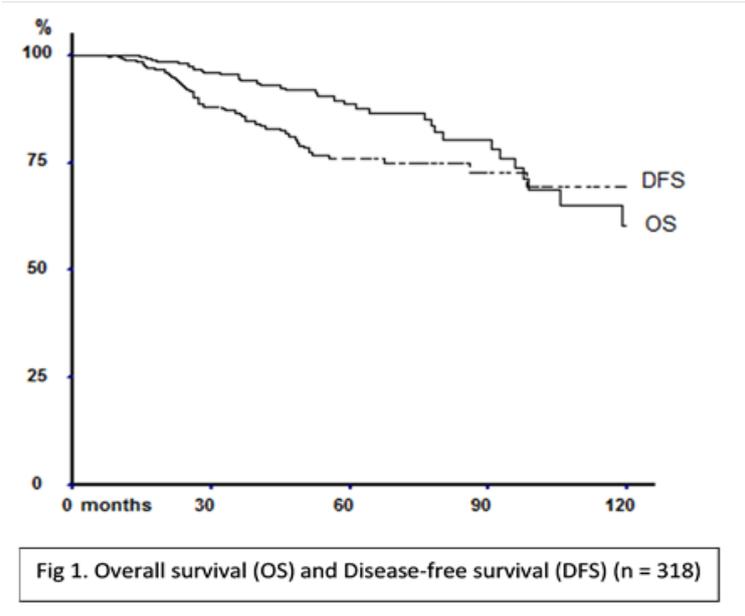
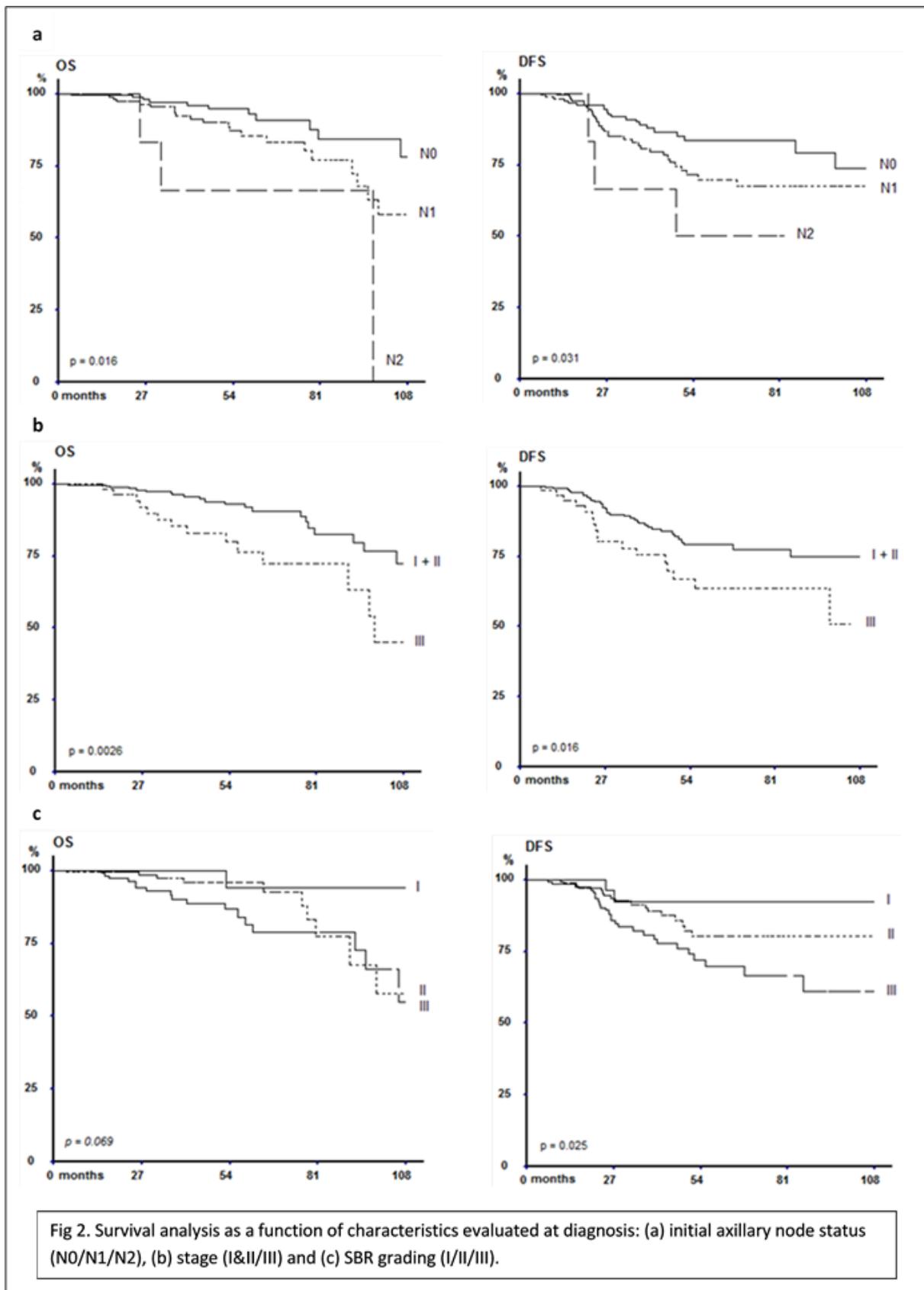


Table 3. Analysis of prognostic factors before (diagnosis) and after NACT (post NACT & post-op)

Characteristics (n=310)	n (%)	Overall Survival (OS)			Disease-free survival (DFS)		
		p Value	5-years (%)	9-years (%)	p Value	5-years (%)	9-years (%)
<i>Diagnosis</i>							
<b>Age (years)</b>		0.35			0.39		
< 50	139 (43.7)		91.3	47.3		73.4	67.1
≥ 50	179 (56.3)		86.1	82.5		77.9	72.7
<b>Menopausal status</b>		0.38			0.89		
Pre-menopausal	150 (47.2)		89.3	52.8		74.6	69.3
Menopausal	166 (52.2)		87.5	82.9		77.6	70.6
ND	2 (0.6)						
<b>Initial tumor size (cm)</b>		<b>0.036</b>			0.22		
≤ 2	24 (7.5)		100	-		81.7	-
> 2, ≤ 5	226 (71.1)		91.3	66.6		77.6	68.5
> 5	63 (19.8)		76.9	58.3		67.7	67.7
ND	5 (1.6)						
<b>Initial axillary nodal status</b>		<b>0.016</b>			<b>0.031</b>		
N0	156 (49.1)		92.8	78.2		83.5	73.7
N1	154 (48.4)		85.3	58.0		69.7	67.5
N2	8 (2.5)		66.7	-		50.5	-
<b>Stage</b>		<b>0.0026</b>			<b>0.016</b>		
I & II	257 (80.8)		91.7	72.5		79.1	74.8
III	61 (19.2)		76.3	45.3		63.5	-
<b>SBR grading (n=291)</b>		<b>0.069</b>			<b>0.025</b>		
I	29 (10.0)		94.1	94.1		92.1	92.1
II	145 (49.8)		96.0	57.9		80.2	80.2
III	117 (40.2)		81.4	55.1		69.6	60.9
<b>Hormonal receptors</b>		0.55			0.21		
Positive	224 (70.4)		90.4	60.6		77.5	68.0
Negative	94 (29.6)		84.4	72.0		72.2	72.2
<b>HER2</b>		0.14			0.15		
Positive	52 (16.4)		83.7	24.8		55.6	55.6
Negative	263 (82.7)		88.9	68.7		78.8	71.0
ND	3 (0.9)						
<i>Post NACT</i>							
<b>Clinical responses</b>		0.46			0.69		
Objective (CR + PR)	214 (67.3)		92.3	65.0		76.2	72.0
Non-responders (MR+NC)	100 (31.4)		82.7	67.5		75.9	65.7
ND	4 (1.3)						
<b>Ultrasound responses</b>		0.52			0.43		
Objective (CR + PR)	224 (70.4)		89.5	59.6		73.5	63.4
Non-responders (MR+NC)	92 (28.9)		87.4	75.7		80.2	76.8
ND	2 (0.7)						
<i>Post-Op (n=316)</i>							
<b>Residual tumor size</b>		<b>0.028</b>			<b>0.011</b>		
0	60 (19.0)		98.3	98.3		90.9	90.9
<2	93 (29.4)		93.3	48.6		77.9	70.1
≥2	161 (50.9)		84.0	65.2		70.1	62.6
ND	2 (0.6)						
<b>Residual nodes number</b>		0.079			<b>0.011</b>		
0	167 (54.2)		91.9	76.1		86.0	82.4
1 à 3	78 (25.3)		94.7	49.5		70.3	65.6
>3	63 (20.5)		78.3	53.3		60.8	48.7
ND	2 (0.6)						
<b>SBR grading (n=242)</b>		0.19			<b>0.0032</b>		
I	30 (12.4)		94.7	-		100	-
II	157 (64.9)		88.4	54.8		74.3	60.0
III	55 (22.7)		84.2	51.9		60.5	54.4
<b>Pathological response</b>		<b>0.016</b>			<b>0.0060</b>		
Classes I & II	61 (19.3)		98.3	98.3		91.5	91.5
Classes III & IV	255 (80.7)		87.1	58.9		72.6	65.0
<b>RDBN classification (n=294)</b>		<b>0.0082</b>			<b>0.0022</b>		
Level 1	53 (18.0)		98.1	98.1		95.3	95.3
Level 2	72 (24.5)		89.8	78.6		82.6	82.6
Level 3	111 (37.8)		92.4	56.7		77.1	69.4
Level 4	58 (19.7)		79.0	33.0		59.2	27.1



Second, survivals were analyzed as a function of characteristics evaluated after NACT and surgery (Table 3, Figure 3); 19% of operated patients had no residual

tumor left in breast, 54.2% of operated patients had no residual tumor in nodes. 29.4% of patients had smaller than 2 cm residues and 25.3% had less or equal than three invaded nodes. Due to disappearance of tumors after NACT we had 256 residues, and post-surgical SBR grading was available in 242 of them (94.5%); SBR grade classes were: 12.4% grade I, 64.9% grade II and 22.7% grade III.

Residual tumor size was a significant prognostic factor of OS and DFS. The smaller the residue, the better was the DFS (Fig. 3a), but it was not exactly the same on the OS curves, where the 9-years OS was 48.5% for patients with a residue from 0 to 2 cm, while the 9-years OS was 65.2% for patients with bigger residue. Concerning residual nodes number and SBR grading after surgery, they had only a significant correlation for DFS ( $p = 0,011$  and  $p= 0.0032$ , respectively), with a better survival for N0 and low-grade tumors (Fig.3b and c).

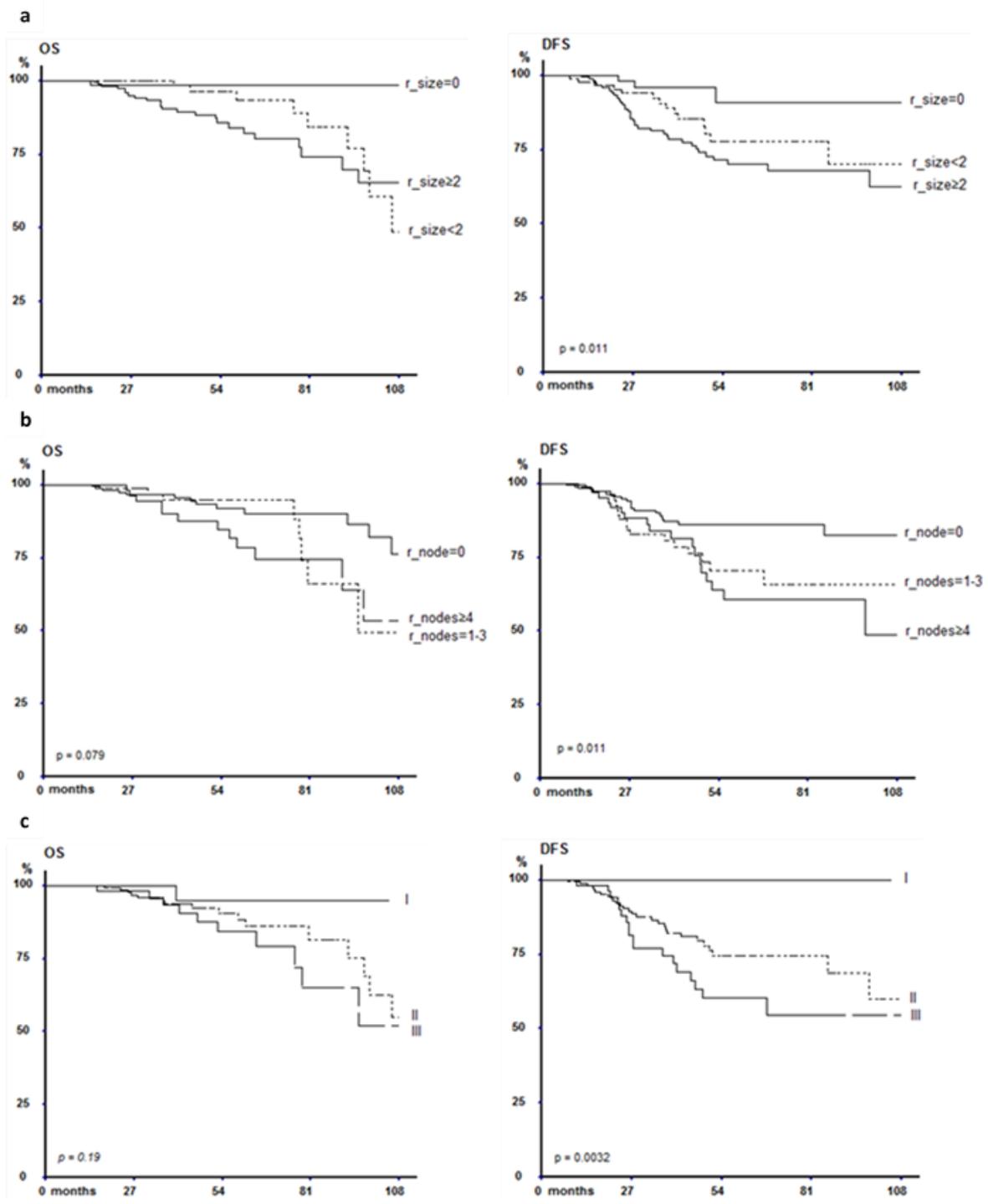


Fig 3. Survival analysis as a function of characteristics evaluated after NACT (post-op) : (a) residual tumor size(0/<2/≥2), (b) residual nodes number (0/1-3/≥4) and (c) SBR grading(I/II/III).

Finally, OS and DFS were analyzed as a function of pathological response (Table 3, Figure 4); patients with pCR according to Chevallier's classification had improved 9-years OS and DFS, with 98.1 and 95.3%, respectively, compared with patients who obtained an incomplete response (Fig. 4a). Pathological response was also expressed with RDBN index (evaluated in 294 i.e. 93% of operated patients); level 1, was attended by 18% of evaluated patients, 24,5% reached a level 2, 37.8% a level 3 and 19.7% a level 4. Most interesting, univariate analysis showed that RDBN index was a significant prognostic factor for OS ( $p = 0.0082$ ) and DFS ( $p = 0.0022$ ), the smaller the index, the better was the survival (Fig. 4b).

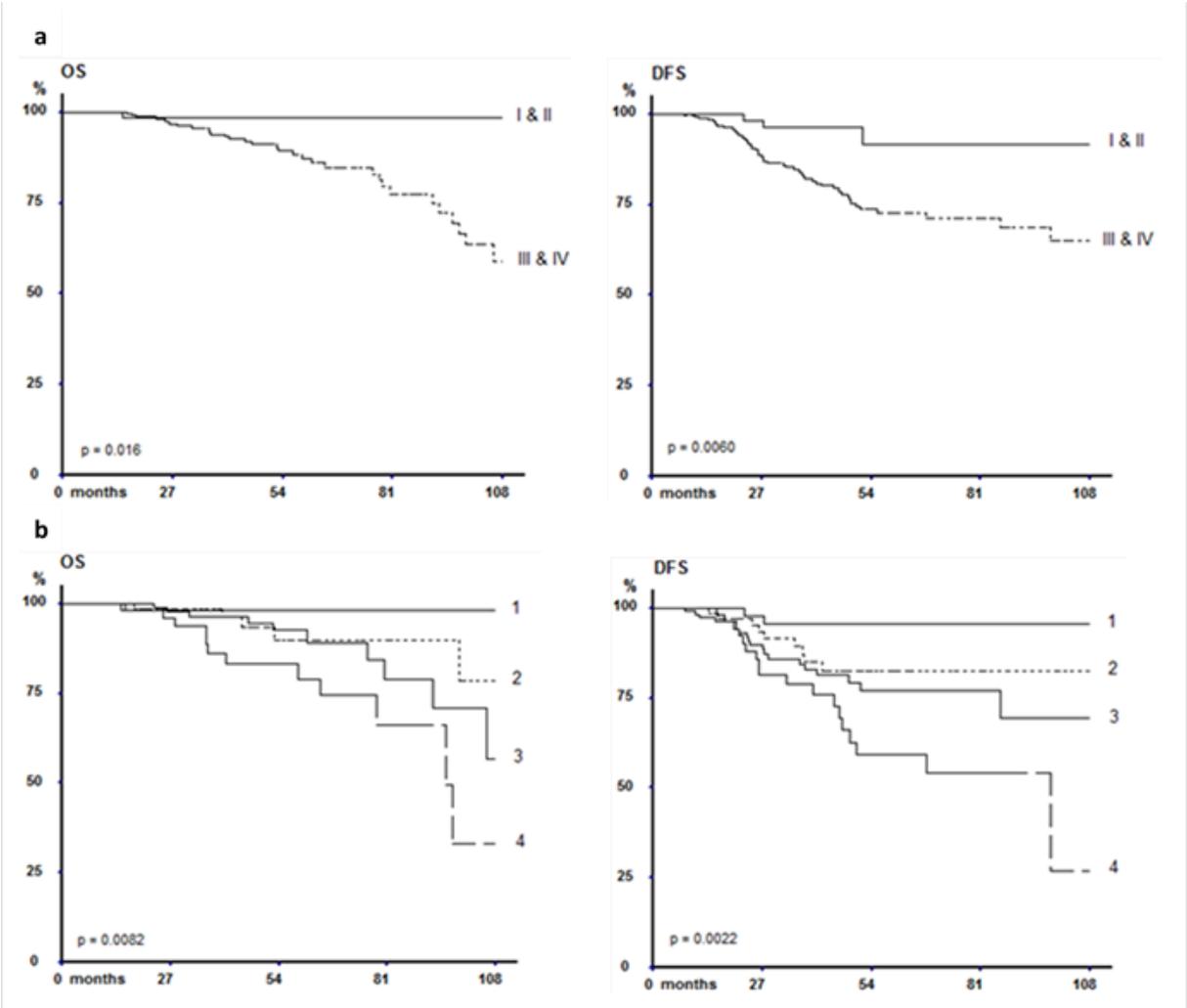


Fig 4. Survival analysis as a function of the pathological response, evaluated by the Chevallier's classification (classes I & II versus III & IV) and by the RDBN Index (1/2/3/4), after NACT.

### *Multivariate analyses*

The stepwise Cox regression procedure revealed that prognostic factors of OS were SBR grading at diagnosis ( $p = 0.0033$ ), followed by residual tumor size ( $p = 0.017$ ), and tumor stage at diagnosis ( $p = 0.012$ ).

DFS was significantly related with SBR grading at diagnosis ( $p = 0.0001$ ), followed by residual tumor size ( $p = 0.0051$ ), and residual nodes number ( $p = 0.0039$ ).

To observe the significance on prognostic factors based on surgical sampling we have also followed a stepwise Cox regression procedure on patients with residual tumor after NACT, which revealed SBR grading at diagnosis ( $p = 0.0064$ ) and residual nodes number ( $p = 0.03$ ) as prognostic factors of OS, and DFS was significantly related with post-CT SBR grading ( $p=0.00033$ ), followed by and Chevallier's classification ( $p = 0.012$ ), and residual nodes number ( $p = 0.036$ ).

### *Prognostic significance of Chevallier's classification versus RDBN index in subtypes of BC*

To compare survival curves they were designed with level 1 *versus* 2, *versus* 3, *versus* 4 for RDBN Index and with class I *versus* II, *versus* III, *versus* IV for Chevallier's classification; prognostic significance of these index were evaluated in each subtype and "p" values were reported in table 4. Chevallier's classification revealed to be significant prognostic factor for OS and DFS, on global population and for TN tumors. On the other hand, RDBN index was very significant for OS and DFS, on global population and for TN tumors, but also for DFS of luminals tumors.

Table 4. Univariate analysis of prognostic significance of RDBN index and Chevallier's classification after NACT

Subtypes	RDBN Index (Levels 1 / 2 / 3 / 4)		Chevallier classification (Classes I / II / III / IV)	
	p value		p value	
	OS	DFS	OS	DFS
Global population	<b>0.0082</b>	<b>0.0022</b>	<b>0.041</b>	<b>0.0044</b>
Luminals	0.14	<b>0.0031</b>	0.56	0.15
TN	<b>0.0064</b>	<b>0.013</b>	<b>0.0097</b>	<b>0.003</b>
HER2-positive	0.92	0.2	0.95	0.3

## DISCUSSION

Going towards a quantification of the residual disease means not taking only quantity, i.e. residual tumor size into account anymore but also quality, i.e. intrinsic factors of tumor.

We began our investigation in 2000, when trastuzumab became available for patients in France, completing the other all current major drugs of breast cancer. This monocentric and retrospective study deals with a homogeneous set of patients who had undergone a strict design NACT gathering the 3 actual major drugs, for primary invasive breast carcinoma.

First, anthracycline- and taxane-based therapy is recommended by consensus opinion for preoperative CT because of several prospective trials which demonstrated that this NACT was associated with the highest response rates [12-13]. Effectively Abrial et al. [14] have described a first jump from 3.9% to 16.4% after 1990, which

was probably due to the arrival of taxanes. We found here comparable pCR rates for patients treated by anthracyclines-based (pCR=17.2%) or by anthracycline- and taxane-based therapy (pCR=14.3%), but surprisingly we found no significant difference between these two groups.

Second, a new jump in pCR was observed after 2000's, to go near to 20%, and due to the arrival of trastuzumab since pCR rate is 40.8% for the 15.4% of our population which was HER2-positive. These results have already been confirmed in several phase III trials [15-21]. So it is evident that the addition of trastuzumab to CT has led to a considerable reduction in both recurrence and death from BC.

Then the addition of these 3 drugs gave us a comfortable global pCR rate of 19.3%, and achieving pCR is a goal of NACT since it correlates with improved DFS and OS [22]. In this way we obtained 10-years OS and DFS of 60.2% and 69.6%.

But the first objective of NACT was to improve breast conservation surgery, and this one is achieved! Indeed the fact that it improves opportunities to apply breast conservation surgery without compromising outcomes is admitted [23], and we again proved it with a rate of 58.8% of breast conservation on our population.

Prognostic factors are measurements available at diagnosis or time of surgery that, in absence of adjuvant therapy, are associated with recurrence rate, death rate, or other clinical outcome [24].

On the one hand, factors evaluated at diagnosis: SBR grading and stage, which includes initial tumor size and initial axillary node status are accepted prognostic factors and remained effectively significant prognostic factors of OS and DFS in our univariate and multivariate analyses.

In recent years, HER2 has become an important predictive marker in BC, according to literature it's overexpressed in 20-25% of invasive BC and associated with poor prognosis features. In the same way hormonal receptors status is well-established prognostic marker in BC management. However we haven't found any prognostic significance for our biological markers HR and HER2. We suggest that it may be the result of agents which specifically target these markers, as adjuvant endocrine therapy and neoadjuvant trastuzumab added to NACT [25]. One pitfall in this retrospective study was that we didn't have data on evaluation of these biological markers after NACT even though several studies have suggested that they may be altered after NACT and that could affect predictive or prognostic factors [26-27].

In the same manner we miss data about the immunohistochemical marker Ki-67 which could have helped us to capture cell proliferation and so classify molecular subtypes of BC because it was not routinely assessed in our center until now. This proliferation index could have been a prognostic factor, so it could be interesting to investigate this index in a few years.

Taking together, these factors permit to divide BC in 5 intrinsic subtypes, it is more and more evident that this classification is important as the relation between pCR and survival strongly depended on it [28].

On the other hand, factors evaluating tumor response to NACT: residual tumor size and residual lymph node number were significant prognostic factor of OS and DFS in univariate and multivariate analyses. So, even if preoperative treatment were sometimes controversial because it has been demonstrated that NACT can eliminate axillary lymph node metastases in BC and the post-operative pathological lymph node classification is the single most important prognostic factor widely used in the

indication of adjuvant CT, now we have proved that the number of involved nodes after NACT has also a prognostic value.

Moreover, NACT permits to evaluate SBR grading on the residue. Among accepted prognostic factors is SBR grading evaluated at diagnosis, moreover the predictive significance of this biological marker on clinical and pathological responses to NACT and the evolution of SBR grade during it have been demonstrated [5]. But nothing has been found about the prognostic significance of SBR grading evaluated after NACT, and yet our univariate analysis revealed it as a really significant prognostic factor of DFS which remained significant for DFS in multivariate analysis on people who had a residue.

Added to these parameters, several classifications exist to appreciate residual disease, in Europe Chevallier's [9] and Sataloff's [29] classifications are mostly used. The Sataloff one only retains complete and subcomplete pCR, but last recommendations stressed that ductal *in situ* should be analyzed separately [30] so we wanted more precision and only investigated Chevallier's one which is a simple classification with clear-cut boundaries. Its prognostic influence doesn't need to be proven anymore and was found again in our univariate and multivariate analysis, but it only takes into account size of residue and if it is *in situ* tumor. So we were interested in a more complete index: RDBN [10], this one takes into account all factors post-CT evaluated: residual tumor size, SBR grading and residual node numbers. When we tested it in univariate analysis, this index appeared as a very significant prognostic factors, we hadn't been able to test it in multivariate analysis because it was clear that it was too correlated with other parameters, but Corben et al. [31] had already shown the association with DFS by multivariate analysis.

As we had good results we wanted to go further, so we investigated RDBN index prognostic value in each subtypes. For luminals subgroup: we obtained a good prognostic discrimination by RDBN for DFS; for HER2-positive subgroup we couldn't conclude because of an insufficient patients number and for TN subgroup we validated the prognostic significance of RDBN in spite of a reduced patient number. Then we guessed if Chevallier's classification was able of such a prognostic value, and we saw that it was a prognostic factor of OS and DFS only for TN, so it didn't succeed to keep a prognostic value for each subtypes. As Zhang et al., 2013 [32] said "because of receptors status-based subtype stratification and subtype-oriented therapeutic strategies, BC is no longer viewed as a single disease. Evaluation of any prognostic factor should therefore take subtypes and treatments into account.", as we agreed that, we suggested that RDBN index is the most appropriated index for classification of residual disease and so to predict survivals after NACT.

To conclude, added to increasing breast conservation rate and pCR, NACT also permits an earlier systemic treatment and the main interest is allowing a precise and individual analysis of response to CT, so that it could be used as a guide for further local and systemic treatment, and brings to the clinicians additional prognostic factors of survival, allowing characterizing subgroups of patients.

In effect the goal is to select patients with a notable or important residual disease for a non-resistant adjuvant therapy whilst minimizing toxicity for those women who will not suffer relapse after selection by NACT.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Wolmark, N., Wang, J., Mamounas, E., Bryant, J., & Fisher, B. (2001). **Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18.** *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 15212(30), 96–102.
2. Van der Hage, J. a, van de Velde, C. J., Julien, J. P., Tubiana-Hulin, M., Vandervelden, C., & Duchateau, L. (2001). **Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902.** *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(22), 4224–37.
3. Mauri, D., Pavlidis, N., & Ioannidis, J. P. a. (2005). **Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis.** *Journal of the National Cancer Institute*, 97(3), 188–94. doi:10.1093/jnci/dji021
4. Curé H, Amat S, Penault-Llorca F, le Bouëdec G, Ferrière JP, Mouret-Reynier MA, Kwiatkowski F, Feillel V, Dauplat J, Chollet P. (2002). **Prognostic value of residual node involvement in operable breast cancer after induction chemotherapy.** *Breast Cancer Res Treat.*, 76(1):37-45.
5. Amat S, Penault-Llorca F, Cure H, Le Bouedec G, Achard JL, Van Praagh I, Feillel V, Mouret-Reynier MA, Dauplat J, Chollet P. (2005). **Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy.** *Int J Oncol.*, 20(4):791-6.
6. Tacca, O., Penault-Llorca, F., Abrial, C., Mouret-Reynier, M.-A., Raelfils, I., Durando, X., ... Chollet, P. (2007). **Changes in and prognostic value of hormone receptor status in a series of operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy.** *The Oncologist*, 12(6), 636–43. doi:10.1634/theoncologist.12-6-636
7. Bloom, H. J., & Richardson, W. W. (1957). **Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years.** *British Journal of Cancer*, 11(3), 359–77.
8. Goldhirsch, a, Winer, E. P., Coates, a S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2013). **Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013.** *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 24(9), 2206–23. doi:10.1093/annonc/mdt303
9. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurteloup P. **Inflammatory breast cancer: pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate.** *Am J Clin Oncol.* 1993;16:223–228.
10. Chollet, P., Abrial, C., Durando, X., Thivat, E., Tacca, O., Leheurteur, M., ... Dauplat, J. (2008). **A New Prognostic Classification After Primary Chemotherapy for Breast Cancer : Residual Disease in Breast**, 14(2), 1–3.
11. Kaplan EL, Meier P. **Non parametric estimation from incomplete observation.** *J Am Stat Assoc* 1957;53:457-471.
12. Bear, H. D., Anderson, S., Brown, A., Smith, R., Mamounas, E. P., Fisher, B., ... Wolmark, N. (2003). **The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27.** *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(22), 4165–74. doi:10.1200/JCO.2003.12.005
13. Smith, I. E., Dowsett, M., Ebbs, S. R., Dixon, J. M., Skene, A., Blohmer, J.-U., ... Walsh, G. (2005). **Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial.** *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(22), 5108–16. doi:10.1200/JCO.2005.04.005

14. Abrial, C., Mouret-Reynier, M. a, Amat, S., Sillet-Bach, I., Bougnoux, P., Delva, R., ... Chollet, P. (2005). **Tumor parameters, clinical and pathological responses, medical management, and survival through time on 710 operable breast cancers.** *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 22(3), 233–40. doi:10.1385/MO:22:3:233
15. Burstein, H. J. (2003). **Preoperative Therapy With Trastuzumab and Paclitaxel Followed by Sequential Adjuvant Doxorubicin/Cyclophosphamide for HER2 Overexpressing Stage II or III Breast Cancer: A Pilot Study.** *Journal of Clinical Oncology*, 21(1), 46–53. doi:10.1200/JCO.2003.03.124
16. Buzdar, A. U., Ibrahim, N. K., Francis, D., Booser, D. J., Thomas, E. S., Theriault, R. L., ... Hortobagyi, G. N. (2005). **Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(16), 3676–85. doi:10.1200/JCO.2005.07.032
17. Von Minckwitz, G., Rezai, M., Loibl, S., Fasching, P. a, Huober, J., Tesch, H., ... Untch, M. (2010). **Capecitabine in addition to anthracycline- and taxane-based neoadjuvant treatment in patients with primary breast cancer: phase III GeparQuattro study.** *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(12), 2015–23. doi:10.1200/JCO.2009.23.8303
18. Gianni, L., Eiermann, W., Semiglazov, V., Manikhas, A., Lluch, A., Tjulandin, S., ... Baselga, J. (2010). **Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER.** *Lancet*, 375(9712), 377–84. doi:10.1016/S0140-6736(09)61964-4
19. Gianni, L., Dafni, U., Gelber, R. D., Azambuja, E., Muehlbauer, S., Goldhirsch, A., ... Bell, R. (2011). **Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial.** *The Lancet Oncology*, 12(3), 236–44. doi:10.1016/S1470-2045(11)70033-X
20. Untch, M., Rezai, M., Loibl, S., Fasching, P. a, Huober, J., Tesch, H., ... von Minckwitz, G. (2010). **Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study.** *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(12), 2024–31. doi:10.1200/JCO.2009.23.8451
21. Untch, M., Loibl, S., Bischoff, J., Eidtmann, H., Kaufmann, M., Blohmer, J.-U., ... von Minckwitz, G. (2012). **Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial.** *The Lancet Oncology*, 13(2), 135–44. doi:10.1016/S1470-2045(11)70397-7
22. Chavez-MacGregor, M., & Gonzalez-Angulo, A. M. (2013). **Breast cancer in 2012: New drugs, new knowledge, new targets.** *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 10(2), 75–6. doi:10.1038/nrclinonc.2012.236
23. Cho JH, Park JM, Park HS, Park S, Kim SI, Park BW. (2013). **Oncologic safety of breast-conserving surgery compared to mastectomy in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer.** *J Surg Oncol.*, 108(8):531-6. doi: 10.1002/jso.23439. Epub 2013 Sep 30.
24. **Adjuvant Therapy for Breast Cancer: NIH Consensus Statement 17: 1-35, 2000.**
25. Goldhirsch, a, Ingle, J. N., Gelber, R. D., Coates, a S., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2009). **Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009.** *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 20(8), 1319–29. doi:10.1093/annonc/mdp322
26. Zhang, N., Moran, M. S., Huo, Q., Haffty, B. G., & Yang, Q. (2011). **The hormonal receptor status in breast cancer can be altered by neoadjuvant chemotherapy: a meta-analysis.** *Cancer Investigation*, 29(9), 594–8. doi:10.3109/07357907.2011.621913

27. Dede DS, Gumuskaya B, Guler G, Onat D, Altundag K, Ozisik Y. (2013). **Evaluation of changes in biologic markers ER, PR, HER 2 and Ki-67 index in breast cancer with administration of neoadjuvant dose dense doxorubicin, cyclophosphamide followed by paclitaxel chemotherapy.** *J BUON.*, 18(2):366-71.
28. Costa SD, Von Minckwitz G, Raab G, et al. **The role of docetaxe (Taxotere) in neoadjuvant chemotherapy of breast cancer.** *Semin Onco*1999;3(Suppl 9):24-31.
29. Sataloff DM, Manson BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. (1995). **Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome.** *J Am Coll Surg.*, 180(3):297-306.
30. Kaufmann, M., von Minckwitz, G., Mamounas, E. P., Cameron, D., Carey, L. a, Cristofanilli, M., ... Puzstai, L. (2012). **Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer.** *Annals of Surgical Oncology*, 19(5), 1508–16. doi:10.1245/s10434-011-2108-2
31. Corben, A. D., Abi-Raad, R., Popa, I., Teo, C. H. Y., Macklin, E. a, Koerner, F. C., ... Brachtel, E. F. (2013). **Pathologic response and long-term follow-up in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy: a comparison between classifications and their practical application.** *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 137(8), 1074–82. doi:10.5858/arpa.2012-0290-OA
32. Zhang, G. C., Zhang, Y. F., Xu, F. P., Qian, X. K., Guo, Z. B., Ren, C. Y., & Yao, M. (2013). **Axillary lymph node status, adjusted for pathologic complete response in breast and axilla after neoadjuvant chemotherapy, predicts differential disease-free survival in breast cancer.** *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 20(3), e180–92. doi:10.3747/co.20.1294

## **B) Recherche expérimentale : Etude moléculaire d'un mécanisme d'échappement tumoral. Rôles des IL-17A et E dans la progression tumorale et l'invasion des cancers du sein**

### **1- Synthèse**

La famille des cytokines IL-17 est composée de 6 membres, dont l'IL-17A (appelée aussi IL-17), est le premier membre et le mieux caractérisé de cette famille de cytokines. Ces cytokines sont reconnues par une famille des récepteurs multimériques dont les sous unités proviennent d'une famille comprenant 5 membres<sup>269</sup>. L'IL-17A a d'abord été décrite pour son rôle dans le développement d'allergies et de maladies autoimmunes ainsi que pour son rôle dans des mécanismes de défense contre des infections fongiques et bactériennes. Des données s'accumulent désormais prouvant l'implication de cette cytokine dans la carcinogénèse et particulièrement dans le cancer du sein.

Ainsi plusieurs études ont démontré que l'IL-17A et l'IL-17B jouent un rôle pro-tumoral. A l'inverse l'IL-17E a été décrite pour son rôle anti-tumoral par Furuta et al.<sup>321</sup>. Leurs résultats démontrent que l'IL-17E serait produite par les cellules mammaires épithéliales non transformées et induirait l'apoptose des cellules tumorales qui surexpriment l'IL-17RB, un des co-récepteurs de l'IL-17E.

Nous nous sommes donc intéressés à l'IL-17E, et avons étudié les voies de signalisation recrutées par cette cytokine, dans les cellules cancéreuses mammaires.

Dans un premier temps nous avons évalué l'expression de l'IL-17E et de l'IL-17A et de leur récepteur dans des tissus mammaires humains sains et tumoraux par RT-qPCR. Les transcrits de ces cytokines sont présents dans les biopsies tumorales et leur niveau d'expression est bien plus élevé que dans les tissus sains. En particulier, l'IL-17E est indétectable dans la plupart des tissus normaux testés, ce qui exclue la possibilité que cette cytokine soit sécrétée par les cellules épithéliales saines. De la même manière, les transcrits des trois sous-unités de leur récepteur: IL-17RA, IL-17RB et IL-17RC, sont surexprimées par les tissus tumoraux en comparaison aux tissus sains.

Des études supplémentaires sur lignées cellulaires tumorales et non-transformées ont ensuite permis de démontrer l'expression des récepteurs IL-17RA et IL-17RC sur l'ensemble des cellules testées, tandis que l'IL-17RB n'est exprimé que par les cellules tumorales. De plus

nous ne détectons pas d'expression d'IL-17A, ni d'IL-17E par les cellules saines ou tumorales; ce qui laisse suggérer que cette dernière puisse être produite par le microenvironnement tumoral ou que celui-ci induise son expression par les cellules tumorales.

La surexpression d'IL-17E dans les tissus tumoraux et l'expression d'IL-17RB uniquement par les cellules tumorales semblent suggérer que l'IL-17E puisse jouer un rôle pro-oncogénique, en opposition avec les résultats de Furuta et al. C'est pourquoi nous avons voulu vérifier la capacité de l'IL-17E à induire l'apoptose de lignées cellulaires tumorales, et avons démontré que, contrairement au Docetaxel utilisé comme témoin, ni l'IL-17A, ni l'IL-17E ne conduisent au clivage de PARP. Des mesures de mort cellulaire dans plusieurs lignées tumorales après ajout des cytokines IL-17A et IL-17E confirment que ces cytokines n'induisent pas la mort des cellules tumorales.

Nous avons de plus démontré que la stimulation des cellules tumorales par l'IL-17E diminue leur sensibilité au Docetaxel, comme cela avait déjà été démontré par notre équipe avec l'IL-17A<sup>201</sup>. Afin d'identifier les kinases impliquées dans cette chimiorésistance, nous avons étudié la phosphorylation des protéines jouant un rôle dans les voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale. Nous avons ainsi montré que c-RAF et la kinase S6 sont phosphorylées après activation avec les cytokines IL-17A et IL-17E. La phosphorylation de c-RAF reflète l'activation de la voie MAP kinase, et la kinase S6 phosphorylée est une des cibles de la voie mTOR.

Puisque la prolifération tumorale est augmentée par les cytokines IL-17A et IL-17E, nous avons recherché l'expression de la cycline E dans des lignées tumorales et non-transformées. La cycline E est une sous-unité régulatrice de CDK2, qui contribue à la transition des phases G1 à S. Il existe des formes courtes : les LMW-E (low molecular weight-E), auxquelles il manque le domaine régulateur, et qui ne peuvent donc pas être inhibées par les protéines p21 et p27, ce qui augmente fortement l'activité de CDK2 et donc la prolifération cellulaire. Les formes courtes de la cycline E sont ainsi connues pour leur association à un mauvais pronostic dans le cancer du sein depuis ces 10 dernières années.

Nous montrons dans cette étude, et ce pour la première fois, que l'IL-17A et l'IL-17E augmentent la génération de LMW-E dans les lignées tumorales, et non dans les cellules non-transformées qui expriment pourtant les récepteurs IL-17RA et RC. Nous démontrons ainsi une relation entre l'expression d'IL-17RB et celle des formes LMW-E dans les cancers du sein, et non dans les cellules épithéliales saines.

Associé à la surexpression des cytokines IL-17A et IL-17E par les tissus tumoraux, nous avons confirmé la surexpression d'IL-17RB dans ces tissus. Contrairement aux données de Furuta et al.<sup>321</sup> nos résultats suggèrent le rôle pro-oncogénique de l'IL-17E, similaire à celui décrit et publié de l'IL-17A<sup>201</sup>. De plus, le traitement par ces cytokines ne conduit à la mort des cellules tumorales mais diminue au contraire leur chimiosensibilité.

**IL-17A and its homologs IL-25/IL-17E recruit the c-RAF/S6 kinase pathway and the generation of pro-oncogenic low molecular forms of cyclin E (LMW-E) in breast cancer cells**

**Sarah Mombelli<sup>1,2,3,4</sup>, , Stéphanie Cochaud<sup>1,2,5†</sup>, Yacine Merrouche<sup>3,4</sup>, Christian Garbar<sup>3,4</sup>, Frank Antonicelli<sup>4</sup>, Gilles Alberici<sup>5</sup>, Nathalie Bonnefoy<sup>6</sup>, Jean-François Eliaou<sup>6,7</sup>, Jérémy Bastid<sup>5</sup>, Armand Bensussan<sup>1,2#\*</sup>, Jérôme Giustiniani<sup>1,2,3,4#</sup>.**

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U976, Hôpital Saint Louis, 75010 Paris, France

<sup>2</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire Immunologie Dermatologie & Oncologie, UMR-S 976, F-75475, Paris, France

<sup>3</sup>Institut Jean Godinot, Unicancer, F- 51726 Reims, France

<sup>4</sup>Université Reims-Champagne-Ardenne, DERM-I-C, EA7319, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 **Reims** Cedex, France

<sup>5</sup>OREGA Biotech, F-69130 Ecully, France

<sup>6</sup>IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier ; INSERM, U896 ; Université Montpellier 1 ; CRLC Val d'Aurelle Paul Lamarque, Montpellier, F-34298, France.

<sup>7</sup>Département d'Immunologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier et Faculté de Médecine Université Montpellier 1, Montpellier, France.

#Contributed equally

\*Corresponding author: [armand.bensussan@inserm.fr](mailto:armand.bensussan@inserm.fr)

## Summary

Pro-inflammatory IL-17 cytokines were initially described for their pathogenic role in chronic inflammatory diseases and subsequent accumulating evidence indicated their involvement in carcinogenesis. In the present study we report that IL-17A and IL-17E as well as their receptors are present in breast cancer. We studied the molecular signaling recruited following the stimulation of human breast cancer cell lines with IL-17A and IL-17E. We found that IL-17A and IL-17E induced the phosphorylation of c-RAF, ERK1/2 and p70S6K phosphorylation, a pathway involved in the proliferation and survival of tumor cells. Accordingly, both cytokines promoted resistance to docetaxel but, in contrast to a previous report, failed to induce apoptosis. Interestingly, we also reveal that both cytokines induced the generation of tumorigenic low molecular weight forms of cyclin E (LMW-E), which are detected in patients with breast cancers and where their high levels correlated strongly with a poor survival. These results show for the first time some of the molecular pathways activated by IL-17A and IL-17E that may participate to their pro-oncogenic activity in breast cancers.

## Introduction

The IL-17 cytokine family is composed of six members, IL-17A to IL-17F with IL-17A as the prototypic one [1]. A total of five receptors have been described, IL-17RA to IL-17RE. IL-17A binds and signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex whereas IL-25/IL-17E is a ligand for the IL-17RA/RB heterodimer [2]. IL-17A is mainly produced by T helper 17 (TH17) cell subset and by innate immunity cells including TCR- $\gamma\delta^+$  T cell, iNKT, lymphoid tissue inducer (LTi) cells, CD3<sup>-</sup> NKp46<sup>+</sup> lymphocytes or neutrophils that are potentially responsible for initiating pathogenic TH17 cells proliferation [1, 3-5]. A growing body of evidence indicated important roles for this cytokine and TH17 cells in the development of allergic and autoimmune diseases as well as in protective mechanisms against bacterial and fungal infections [6] and gained prominence in cancer, particularly in breast carcinomas [7, 8]. Mouse models of breast cancers revealed that IL-17A promotes tumor growth and angiogenesis [9, 10]. Recently, we have shown that IL-17A produced by tumor infiltrating lymphocytes promotes breast cancer cell chemoresistance and proliferation through activation of ERK1/2 pathway [11]. In addition, it has been reported that IL-17B produced by malignant cells could drive breast tumor growth in an autocrine manner [12]. Surprisingly however, IL-25 was reported to be produced by normal mammary epithelial cells and, through the binding to IL-17RA-IL-17RB complex, induce breast cancer cell apoptosis [13]. It was suggested that IL-17E expression by the normal epithelium may prevent the emergence of transformed epithelial cells by inducing apoptosis, while expression of IL-17B by transformed cells displaced IL-17E from the IL-17RB and promote cancer cell survival through activation of NF $\kappa$ B [12, 13].

In the present study, we aimed to identify in breast cancer cells the signaling pathways recruited following IL-17A and IL-17E cytokine stimulation. The results

reveal that both cytokine activate similar oncogenic pathways in breast malignant cell lines leading to docetaxel resistance and generation of LMW cyclin E. In contrast to previous report, IL17E was not expressed by non-transformed epithelial cells and failed to induce breast cancer cell apoptosis. These results shed new light on the potential role of IL-17A and IL-17E in breast cancer and further studies should be led to understand whether they could be potential therapeutic targets. Furthermore, they question the role of IL17E as a potential tumor suppressor.

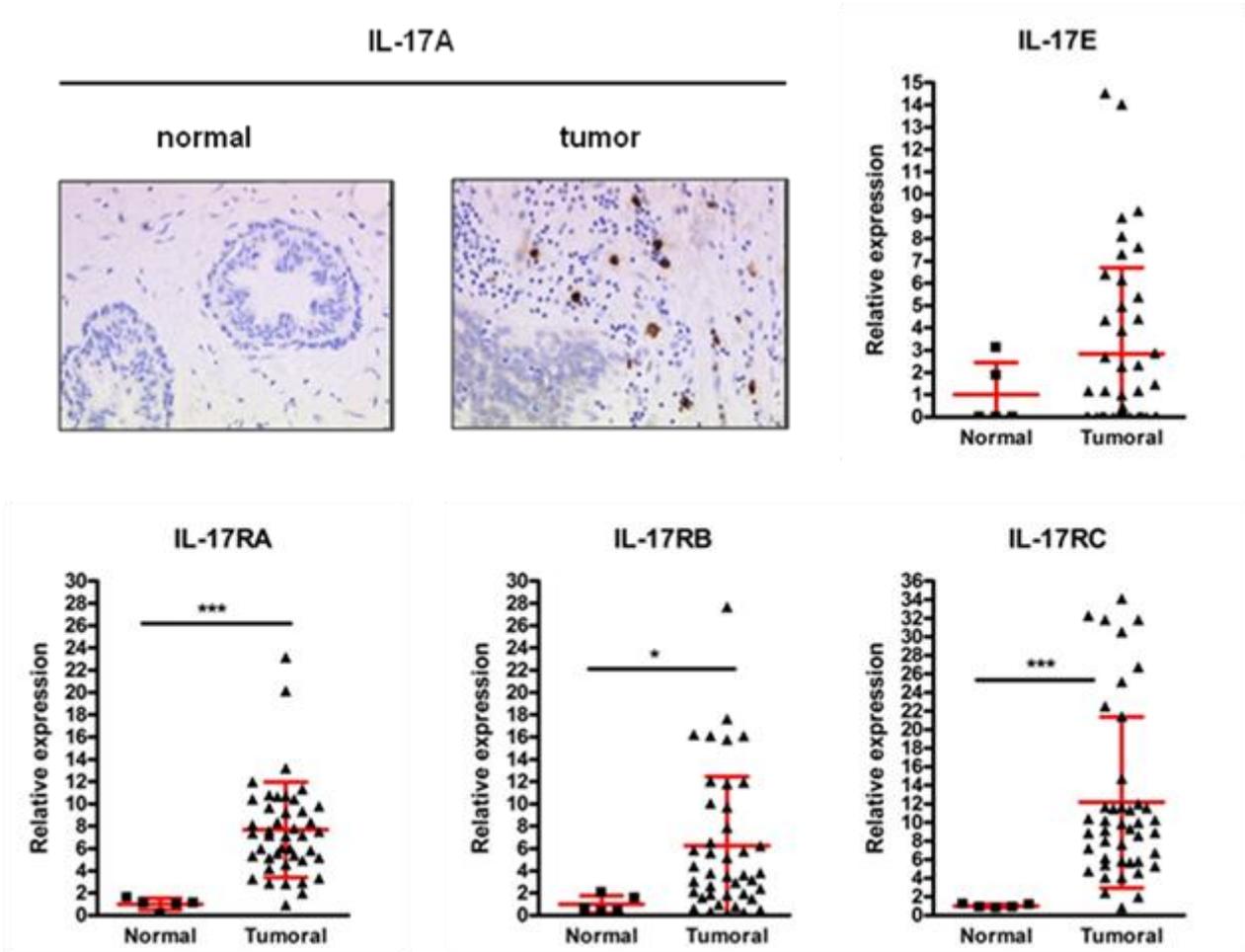
## **Results**

### **Expression of IL-17A, IL-17E and their receptors in breast cancer biopsies and cell lines**

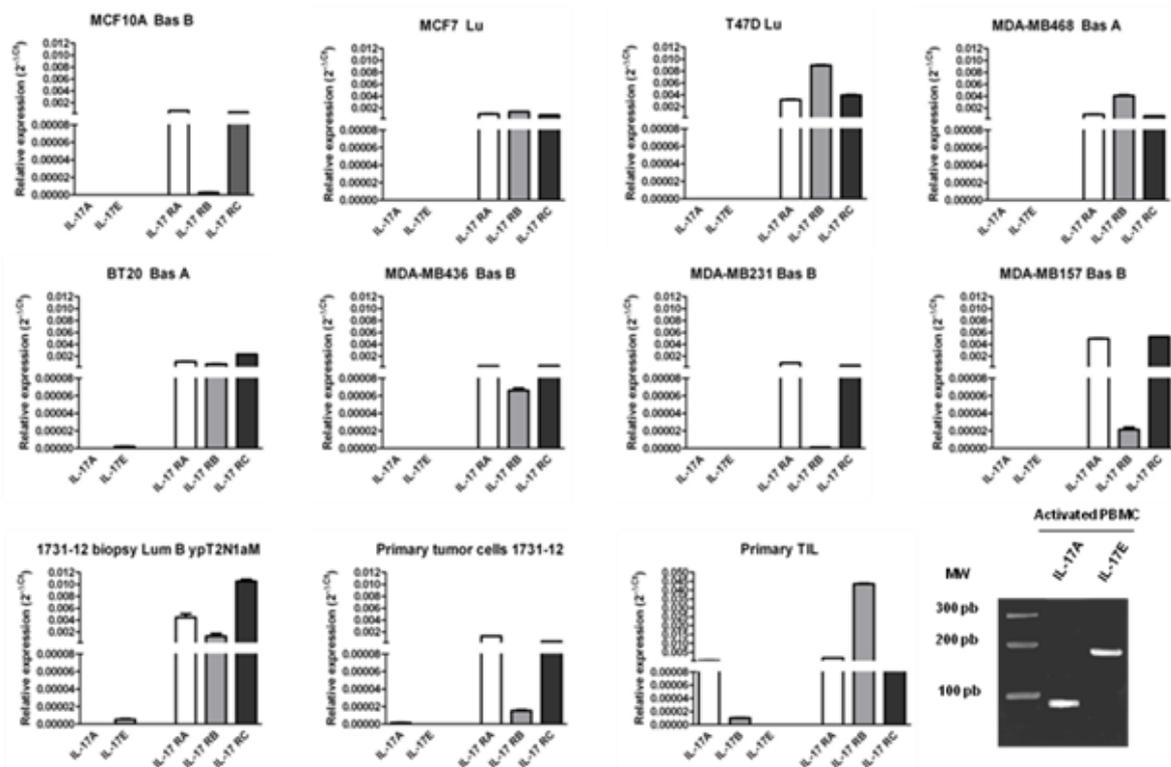
To elucidate the potential role of IL17A and IL-17E in breast cancer, we first assessed the expression of the two cytokines and their functional receptors in human normal and cancer breast tissues. IL-17A expression was assessed using IHC, whereas IL-17E, IL-17RA, IL-17RC and IL-17RB were assessed using RT-qPCR. As illustrated in Figure 1, both IL-17A and IL-17E are present in breast cancer biopsies and their expression is higher in tumor tissues than in the normal breast. Furthermore, the three IL-17R subunits were highly up-regulated in tumor versus normal samples, suggesting that IL-17A and IL-17E signaling are active in human breast cancer.

We then asked whether the cytokines and their receptors are expressed by the tumor cells or other cells from the tumor microenvironment. To address this question, we assessed the expression of IL-17A, IL-17E, IL-17RA, IL-17RC and IL-17RB in various human breast cancer cell lines as well as in non-transformed mammary epithelial cells MCF10A, in primary tumor cells (1731-12) derived *ex vivo* from an ER-negative breast cancer biopsy, and in TIL isolated from patient AL (75% of CD4 positive cells). As illustrated in Figure 2, the expression of the IL-17RA and IL-17RC receptor subunits was ubiquitous as all the primary cells and cell lines tested expressed high levels of IL-17RA and IL-17RC. In line with the results from biopsies (Fig. 1) and a report from Furuta et al., IL-17RB was undetectable in non-transformed MCF10A cells and significantly up-regulated in most breast cancer cell lines tested, suggested that up-regulated expression of IL17RB could be a malignant trait.

In contrast, the human cell lines and the primary tumor cells did not expressed IL-17A or IL-17E, suggesting that the production of these cytokine by tumor cells is unlikely and the cytokines are likely to be produced by the TME. In line with such speculation, IL-17A was for instance produced by primary TIL AL in culture. Although Furuta et al. reported that non-transformed MCF10A mammary epithelial cells express IL-17E; we were unable to detect IL-17E transcripts in this cell line.



**Figure 1: Expression of IL-17 cytokines and receptors in clinical samples.** The TissueScan Breast Tissue qPCR array was used to determine transcript levels of the IL-17 cytokines (IL-17A and IL-17E) and their receptors (IL-17 RA, IL-17 RB and IL-17 RC). The breast tissue scan contains 48 tissues covering 4 diseases stages and normal tissues. The target transcript levels were normalized to  $\beta$ -Actin and calibrated to the mean mRNA level (arbitrary value of 1) in normal tissue. Data were compared using student's *t* test (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )



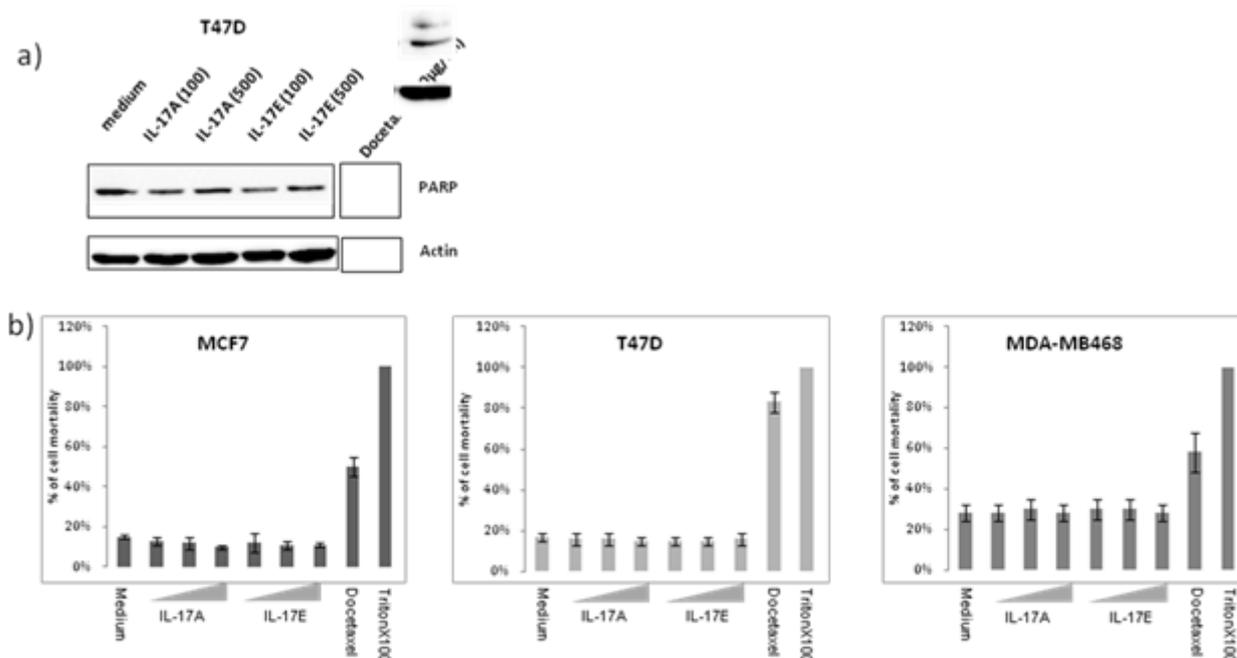
**Figure 2: expression of IL-17 cytokines and receptors in human breast cell lines.** Real-Time RT-PCR analysis of the IL-17 cytokines mRNA (IL-17A and IL-17E) and their receptors (IL-17 RA, IL-17 RB and IL-17 RC) in different human breast cell lines. Expression was normalized to the GAPDH mRNA expression. Data are the mean  $\pm$  SEM of one experiment performed in duplicate. IL2/PHA activated Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were used as positive control for IL-17A and -E mRNA detection.

## IL-17E failed to induce breast cancer cell apoptosis and promoted chemoresistance

Furuta et al. reported that non-transformed mammary epithelial cells express IL-17E and low levels of IL-17RB and that IL-17E induced apoptosis of transformed breast cells (with up-regulated IL-17RB) but not non-transformed cells, thereby serving as a tumor suppressor. Although we confirmed here that IL-17RB is much higher in tumor cells than in non-transformed cells, we were unable to detect IL-17E mRNA in MCF10A cells and IL-17E was even expressed at higher levels in tumor biopsies than in normal breast. These expression data raised questions about the potential role of IL-17E as a tumor suppressor.

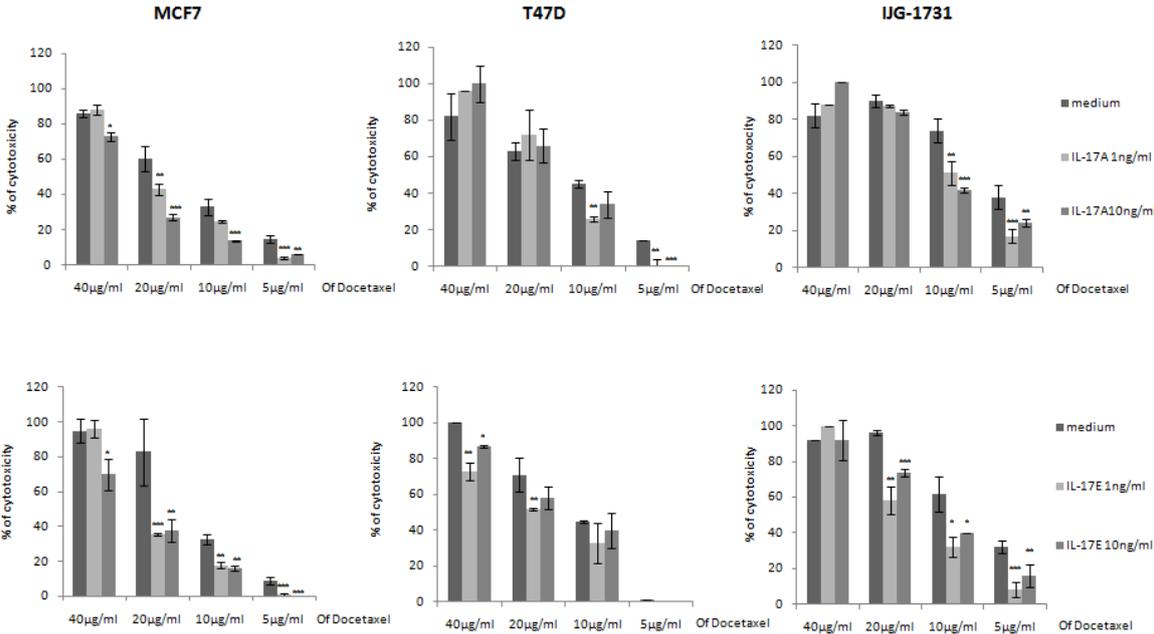
We therefore decided to test the ability of IL-17E to induce apoptosis of breast cancer cell lines. As illustrated Figure 3A, we analyzed PARP proteolysis in T47D cells treated with IL-17E or IL-17A at 100ng/ml or 500ng/ml. Treatment with Docetaxel at 10µg/ml was used as a control of apoptosis. The results clearly show that, in contrast to Docetaxel, neither IL-17A nor IL-17E induced PARP cleavage at indicated concentration. Similar results were obtained with MCF-7 cells treated with both cytokines (data not shown).

Next, to further confirm the lack of apoptosis induced by IL-17A and IL-17E, we measured the level of cell death of MCF7, T47D and MDA-MB468 cells cultured in the presence of 20ng to 500ng/ml of recombinant IL-17A or IL-17E. Docetaxel at 10µg/ml and 1% TritonX100 were used as positive controls. Results presented Figure 3B show that IL17A and IL-17E did not induce the cell death of MCF-7, T47Dor MDA-MB468.



**Figure 3: IL-17A and IL-17E do not induce apoptosis.** Cell apoptosis was analyzed by detection of PARP proteolysis (a) or measurement of LDH released into cell supernatants (b) to this aim; cells were treated 24h in a serum free medium with different concentrations of IL-17A or IL-17E as indicated. As positive control for PARP cleavage or LDH detection we used Docetaxel at 10µg/ml.

Although IL-17E failed to mediate apoptosis of IL-17RB expressing breast cancer cells, we tested whether it could increase (or decrease) cell death induced by chemotherapy drugs. We previously reported that 1 to 10ng/ml of IL-17A was very potent at inhibiting docetaxel induced cell death in various human breast cancer cell lines [11]. The results shown in figure 4 indicate that MCF-7, T47D or primary tumor cells IJG-1731 stimulated with 1 to 10 ng/ml of IL-17E consistently result in decreased Docetaxel-induced cell death.

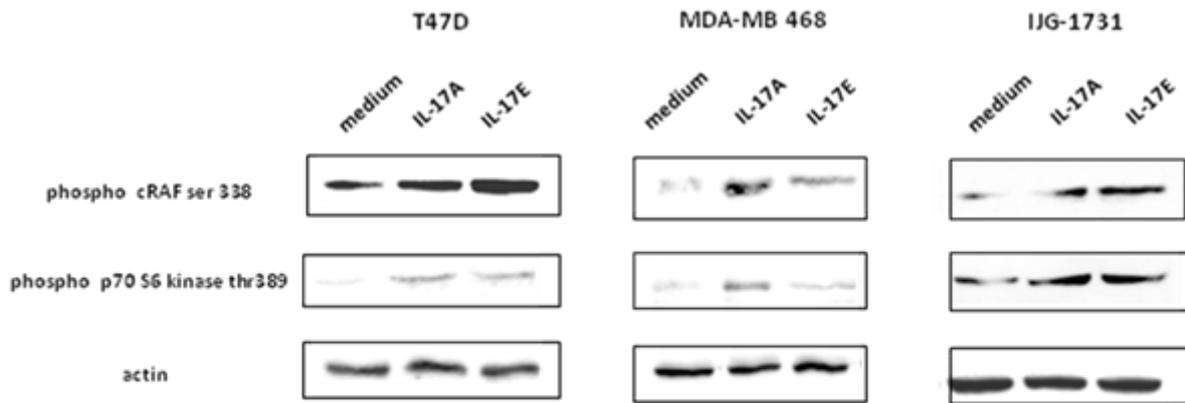


**Figure 4: IL-17E induces cell chemoresistance to Docetaxel.** Breast cancer cells were cultured in complete medium alone (medium) or supplemented with IL17-A or -E for 48 h. Cells were then switched in FCS-free medium supplemented with the respective cytokine for 24h before adding Docetaxel at various concentration for 7h at 37°C. The cytotoxicity was determined using the Cytotoxicity Detection Kit (Roche). Data shown are representative of 3 independent experiments. (\* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\*P<0.001)

## **IL-17A and IL-17E promote the phosphorylation of c-Raf, ERK and p70S6 kinase.**

In order to identify the kinases involved in chemoresistance after IL-17A and IL-17E pre-treatments, we explored the activation of cellular signaling pathways involved in cancer progression. To this aim, MCF-7, T47D, and primary tumor cells IJG-1731 cells were cultured in serum free culture medium overnight then treated with the cytokines. We analyzed their phosphorylation status within 20 min following the cytokine treatment. In cell lines tested, we observed an activation of the MAP kinases pathway through the phosphorylation of c-RAF on Serine 338 (p-cRAF) and p42/p44MAPK (data not shown, [11]). C-RAF serine 338 is phosphorylated by the p21 activated kinase [14] and corresponds to similar phosphorylated sites in A-Raf (Ser299) and B-Raf (Ser445) [15]. On untreated IJG-1731 and MDA-MB468 cells p-cRAF was almost undetectable and was highly induced after addition of cytokines. 120% up to 1000% increased signal was obtained, depending on the IL-17 cytokine used Figure 5.

Because the PI3K/mTOR/p70S6K axis is well known to play an important role in cell growth and survival and is described to be involved in breast cancer cell proliferation and chemoresistance [16], we looked at the activation of the p70S6K(p70<sup>S6K</sup>), which regulates cell cycle, inhibits the pro-apoptotic protein BAD and controls protein synthesis through the phosphorylation of the S6 protein of the 40S ribosomal subunit [17]. We measured the phosphorylation of Thr389, which closely correlates with p70 kinase activity *in vivo* [18] and the results show that incubation with IL-17A or IL-17E enhanced its phosphorylation (Fig. 5). We could not reproduce this result with MCF7 cell line due to the constitutive phosphorylation of the S6 kinase (data not shown).



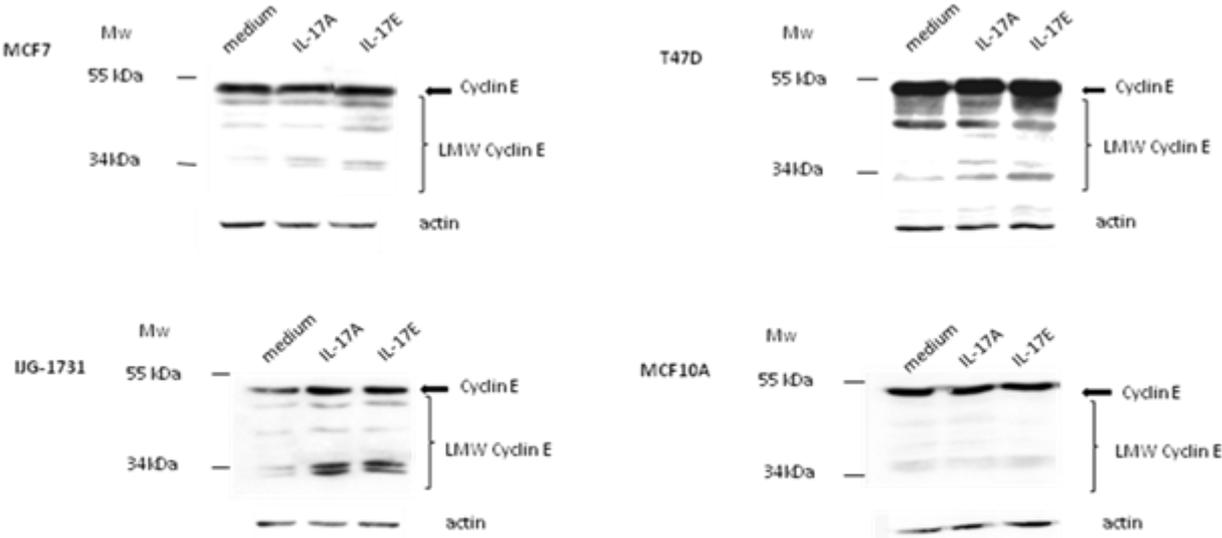
**Figure 5: IL-17A and IL-17E induce breast cancer cell survival through recruitment of c-Raf and p70S6 kinase.** Activation of c-Raf (pSer338) and p70S6 kinase (pThr 389) was analyzed by Western Blot on T47D, MDA-MB468 and IJG-1731 cell lines. Cells were treated with either IL-17A or IL-17E at 20ng/ml for 20 min before cell lysis. 70µg of protein were loaded for each condition and loading control was done with an anti β-actin mAb. For each cell line, data are representative of 3 independent experiments.

**IL-17A or IL-17E treatment enhance the generation of low molecular weight forms of cyclin E (LMW-E) in breast tumor cell line.**

As found that breast malignant cell proliferation is increased by IL-17A or IL-17E, we investigated the expression of the full length of cyclin E, which is a regulatory subunit of Cdk2 that contributes importantly in G<sub>1</sub>/S transition, and its LMW forms for which the regulator domain is missing [19, 20] .

Interestingly, we found that IL-17A or IL-17E did not increase their expression of full length of cyclin E, when compared to the control medium culture. However, with the exception of the primary breast cancer cell line IJG-1731 where a consistent increase of cyclin E is obtained when cultured with each of the IL-17 cytokines (Fig. 6). More importantly, we found that all breast cancer cell lines up-regulate the generation of LMW-E forms. Although some of LMW-cyclin E forms could be weakly present at basal level, we were able to detect almost all of the five published short forms [21] , ranging from 34 to 49kDa, after 72h of treatment with each of the cytokines. Cyclin E

proteolysis might be a tumor specific mechanism as IL-17A failed to up-regulate the generation of LMW-E forms in the non-transformed mammary epithelial cells although these cells express significant levels of IL-17RA and IL-17RC (Fig. 1) that potentially rendered them sensible to IL-17A cytokine. Of note, MCF10A cells lack IL-17RB and did not respond to IL-17E.



**Figure 6: IL-17A or IL-17E treatment enhance the generation of low molecular weight forms of cyclin E (LMW-E).** Almost all of the five published short forms ranging from 34 to 49 kDa, were induced after 72h of treatment with IL-17A or IL-17E at 20ng/ml. No induction was found for the nonmalignant MCF10A cell line suggesting a specific feature of tumor cells.

## **Discussion**

Our previous data as well as a recent report demonstrated that micro-environmental IL-17A produced by infiltrating lymphocytes induced tumor cell migration and invasion as well as resistance to chemotherapy through ERK recruitment [11] and to anti-angiogenic treatment [22] . Similar results were reported for the breast tumor cell secreted IL-17B which is found bind IL-17RB in breast cancer cells and promote tumorigenesis via the recruitment of NF- $\kappa$ B-mediated anti-apoptotic signaling [12]. Surprisingly, it was reported that IL-17E is produced by normal breast epithelial cells, competes for the binding to IL-17RB and promotes pro-apoptotic signaling in IL-17RB expressing breast cancer through displacing pro-tumoral IL-17B. It was therefore suggested that it serves as a tumor suppressor in the mammary gland. Here we investigated the expression and action of IL-17E and IL-17A on cell survival using human breast cancer cell lines and cancer primary tumor cell line established from an ER-negative breast cancer biopsy. We investigated cell signaling events induced by after recruitment of IL-17RA/IL-17RC or IL-17RA/IL-17RB heterodimer receptors.

We found that stimulation with either IL-17A or IL-17E down-modulates drug sensitivity. None of these cytokines induced breast cancer cell apoptosis. These findings are contradictory to those of Furuta et al showing a pro-apoptotic effect of IL-17E on breast cancer cell line expressing IL-17RB such as MDA-MB468 and are in agreement with Huang et al indicating that IL-17RB has an important role in breast tumorigenesis and that its high expression correlates with shorter survival.

During the last decade it was shown that high expression of low molecular form of cyclin E (LMW-E) corresponded to a poor disease free survival factor in breast cancers [23]. LMW-E forms, generated by proteolysis from the full length cyclin E, highly enhance CDK2 activity and are not inhibited by p21 and p27 proteins [20]. It was demonstrated using transgenic mice model with ectopic LMW-E expression

develop mammary carcinoma and metastasis compared to mice transfected with the full length cyclin E [23]. Here, we report a direct relationship between the expression of IL-17RB and LMW-E generation in breast cancers and not in normal mammary epithelial cells. For the first time we show that IL-17A and IL-17E up-regulate the generation of LMW-E forms and induce phosphorylation of p70S6K and c-RAF. Activation of c-RAF and b-RAF are interconnected and their heterodimerization increase the activity of both kinases [24, 25]. Thus, our data introduce a mechanistic point of view to previous findings demonstrating that b-RAF-ERK1/2-mTOR signaling is up-regulated in tumors with high expression of LMW-E forms [25] and suggest that several IL-17 family members present in the tumor breast cancer microenvironment may be a survival factors and may promote chemoresistance.

Further work focused on the expression of IL-17 receptors from metastatic breast cancer cells compared to primary tumor could be informative, especially for liver and lung metastasis where IL-17E is expressed [26, 27]. Whether IL-17E confers a growth advantage for the breast cancer cells, its impact on tumor immunity and cellular microenvironment remain to be determined. Breast cancer infiltrating lymphocytes is investigated as well as the consequences of the cytokine secretion and the anti-tumor cell cytotoxicity.

Taking together the findings reported here suggest that IL-17A and IL-17E are expressed and active in breast cancer and may participate to tumorigenesis. It was reported that IL-17A and IL-17B neutralizing antibody treatment led to decreased breast cancer growth in mice. It would therefore be interesting to test whether anti-IL-17A, IL-17B and/or IL-17E based therapies could affect tumor growth and sensitivity to chemotherapy and immunotherapy (anti-HER2) in animal models of cancer.

## **Materials and Methods**

### **Cell lines and culture conditions**

T47D (ATCC No. HTB-133) cells and MCF7 (ATCC No. HTB-22) and IJG-1731 cells were cultured in a complete RPMI-1640 media with L-glutamine, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and penicillin–streptomycin solution (100 µg/ml each) (Life technology). All cells were cultivated in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. Cells were grown for 4–5 days until confluency. Cells were harvested with 0.25% Trypsin–EDTA solution (Life technology) and then passed into new T-75 tissue culture flasks. Starvation medium did not contain FCS.

### **Generation of IJG-1731 cell line**

IJG-1731 cell line was obtained from a LumB tumor characterized as a ypT2N1aM tumor. Briefly, biopsy was cut and trypsinized to liberate tumor cells. Cell preparation obtained was then cultured in complete RPMI1640 medium. After several weeks of cell culture stabilization, cells were phenotyped as negative for eostrogen, progesterone and HER2 receptors, and positive for EGFR (HER1).

### **Tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) cultures.**

TILs from breast cancer biopsies were isolated and expanded according to the protocol adapted from Bagot M *et al.* Briefly, TILs from patients were obtained from surgical tumor fragments mechanically dispersed into single-cell suspensions and cultured in 12-well plates with culture medium consisting of RPMI 1640, 2 mmol/L L-glutamine, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), 10% heat-inactivated human serum (Life Technologies) and 100U/mL interleukin-2 (Peprotech). Cultures were then fed every 3 days with IL-2–containing culture medium and the growing

wells were expanded for 2 weeks. TILs were then washed and cultured in IL-2–containing medium with irradiated PBL (feeders) stimulated with PHA at 1µg/ml (Sigma-Aldrich). After 3 days the expanded TILs were extensively washed and fed with IL-2–containing medium for 6 days.

### **Antibodies**

Rabbit Anti-phospho Ser388 c-RAF (clone 56A6), mouse anti-phospho Thr389 P70 S6 kinase (clone 1A5), rabbit phospho Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E), rabbit Erk1/2 (137F5), mouse anti-Cyclin E (clone HE12), polyclonal rabbit anti-PARP/cPARP and rabbit anti-Actin (clone 13E5) were obtained from Cell Signaling Technology.

**IL-17A immunohistochemistry.** IL-17A staining on tissues arrays (SUPER BIO CHIPS, slide CBA3) was performed by a pathologist using a standard peroxidase method according to a protocol adapted from Coury *et al.* and validated on renal allograft paraffin sections from patient with chronic active rejection. Goat polyclonal anti-human IL-17A antibody (dilution 1:40, R&D Systems) was employed as the primary antibody followed by anti-goat antibody (LSAB kit, DAKO).

### **Proliferation assay (<sup>3</sup>H)**

400 cells per well (total volume of 200µl) were seeded in a 96 wells plate with medium alone or completed with cytokines at 20ng/ml during 72 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. After 72h of culture, cells were pulsed for 16h with 1 µCi of tritiated thymidine ([<sup>3</sup>H]-TdR) per well. [<sup>3</sup>H]-TdR uptake was measured using PerkinElmer MicroBeta2 plate counter (PerkinElmer). All conditions were done in triplicate.

### **Immunoblotting**

**c-RAF and S6 kinase:** To detect phosphorylation of c-RAF, and p70S6 kinase 3.10<sup>5</sup> cells per well (6 wells plate) are seeded in 2ml of starvation medium then cultured

overnight. Medium is removed and cells are activated with cytokine at 20ng/ml (1ml) in free FCS RPMI. After an incubation of 20 min at 37°C, the cells were lysed in 1% Triton X100 lysis buffer, incubated for 1h on ice and centrifuged at 4°C for 20 min at 10,000g. The supernatants were collected and protein concentration was determined using the Bradford Assay (Bio-Rad). Proteins (70 µg) were resolved in 8% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membrane. The membrane was blocked for 1h at room temperature, by using 5% nonfat milk in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) and incubated overnight at 4°C with an anti-phospho-c-RAF antibody (1:1,000), anti-phospho S6 kinase (1/1,000) or with an anti-Actin antibody (1:1,000) (Cell Signaling) used as a loading control, in blocking solution. After 3 washes, the membrane was incubated 1h at room temperature with goat anti-rabbit or goat anti-mouse secondary antibodies (1:10,000) (Jackson Immunoresearch) conjugated to horseradish peroxidase.

**Cyclin E:** To detect multiple forms of Cyclin E, cells were seeded in a 6 wells plate in 2ml of starvation medium then cultured overnight. Cells are activated with cytokines diluted at 20ng/ml in a 3% FCS medium for 72 hours. Cells are then treated as described above

**PARP/cleaved PARP:**  $3 \cdot 10^5$  cells per well (6 wells plate) are seeded in 2ml of starvation medium then cultured overnight. Medium is removed and cells are activated with cytokine at 20ng/ml (1ml) in free FCS RPMI. A positive control was performed by treating cells with Docetaxel at 10µg/ml. After 24h of culture, the medium is removed and cells are immediately lysed as described previously.

For each sample, 70 µg of protein were subjected to 8% SDS-PAGE under reducing conditions. Resolved proteins were transferred onto nitrocellulose membrane which was blocked in 5% milk/TBS Tween20 0.1% (TBS-T) solution for 1 h at RT. Primary antibodies were added overnight at 4°C in 5% Bovine Serum Albumin (BSA)/TBS-T

solution and extensively washed with TBS-T. Corresponding horseradish peroxidase conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Jackson Immuno Research) were used at dilution 1:10 000 for 1 h at RT before final wash with TBS-T and subsequent detection of protein bands using SuperSignal West Pico Chemoluminescent kit (Thermo Scientific). All experiments were performed in triplicates.

### **cDNA synthesis**

Total RNA was isolated using the GenElute™ Mammalian Total RNA kit (Sigma–Aldrich) following the manufacturer’s instructions. Total RNA (1 µg) was treated with 1 U/µg RNA of DNase I Amplification Grade (Life Technologies) according to the manufacturer’s instructions, and in the presence of 10 U/µg RNA of RNaseOUT (Life Technologies). After DNase inactivation, RNA was reverse transcribed using random nonamers (Sigma–Aldrich) and M-MLV Reverse Transcriptase H Minus (Promega) according to the manufacturer’s instruction.

### **Polymerase chain reaction of reverse transcribed mRNA**

The forward and reverse primers used in the PCR reaction were designed with Primer-BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), except for IL-17A [28] and GAPDH [29], and were listed in Table 1.

Real-time polymerase chain reaction quantification was carried out with the LightCycler 480 II System (Roche Diagnostics) using the SYBR Premix Ex Taq (TliRNaseH Plus) kit (Ozyme). The cycling conditions were as follows: 95 ° C for 1 min followed by 40 cycles of 95 ° C for 20 s, 60 ° C for 20 s and 72 ° C for 30 s. The sizes of the RT-PCR products were confirmed by agarose electrophoresis. At the end of the amplification, a melting temperature analysis of the amplified gene products was performed routinely for all cases; the PCR products were melted by gradually

increasing the temperature from 60 to 95 ° C in 0.3 ° C steps, and the dissociation curves were generated with the Melting Curve analysis tool of the LightCycler 480 software (Roche Diagnostics). We confirmed that only one product was consistently amplified in all PCR reactions. The negative water control showed no amplification. The relative expression of the genes of interest normalized to GAPDH was determined by the delta Ct method.

### **Tissue qPCR array**

The target genes expression was also analysed in normal and tumoral breast tissues using the TissueScan Breast Tissue qPCR array (BCRT502, OriGene Technologies). This tissue scan is a panel of normalized cDNA from 5-normal and 42 different stages of breast cancer tissues. A description in depth pathology report (including histology sections) for all of the RNA used in the panel can be viewed on OriGene's Website.

For this study, the real-time PCR was carried out with the ABI Prism 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems) using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The cycling conditions were as follow according to the manufacturer's instruction: 50°C for 2 min for the activation, 95°C for 5 min for the pre-soak followed by 42 cycles of 95°C for 15s, 60°C for 1 min and 72°C for 30s. As the LightCycler 480 II System, a melting temperature analysis of the amplified gene products was performed at the end of the amplification. The relative expression of the genes of interest normalized to  $\beta$ -Actin (provided by OriGene), was determined by the delta Ct method.

Gene and GenBank accession	Primer sequence	Product length
IL17-A # NM_002190.2	5'-ACTACAACCGATCCACCTCAC-3' 5'-ACTTTGCCTCCCAGATCACAG-3'	83 bp
IL-17E # NM_022789.3	5'-TCCCCCTGGAGATATGAGTTGGACA-3' 5'-GGCATGGCCGCCGGTAGAAG-3'	175 bp
IL17RA # NM_014339.5	5'-TGCCCCTGTGGGTGTA CTGGT-3' 5'-GCAGGCAGGCCATCGGTGTA-3'	151 bp
IL17RB # NM_018725.3	5'-TACCCCGAGAGCCGACCGTT-3' 5'-GGCATCTGCCCGGAGTACCCA-3'	182 bp
IL17RC # NM_153460.3	5'-GGCTTGGTTTCACGCGCAGC-3' 5'-CGGCCCTGCAAGAAGTCGGG-3'	192 bp
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCTGGAGTCA-3' 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'	199 bp
B-Actin	5'-CAGCCATGTACGTTGCTATCCAGG-3' 5'-AGGTCCAGACGCAGGATGGCATG-3'	151 bp

**Table 1 : Primer sequence and product length**

### **Cytotoxicity assay (LDH assay)**

MCF7, T47D (1000 cells/well), BT20, MDA-MB468 and MDA-MB157 cells (3,000 cells/well) were seeded in a 96 wells plate in adequate complete medium alone or treated with recombinant cytokines (1 or 10ng/ml). After 48h of culture, medium was changed to a FCS-free one supplemented with corresponding concentration of cytokines. After 24h, culture medium is then further supplemented with Docetaxel at 5, 10, 20 or 40µg/ml as indicated. Untreated cells (control medium) and Triton X100 treated cells (100% cell death) were used as controls. Each condition was performed in duplicates. The cytotoxicity was determined using the Cytotoxicity Detection Kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. To this aim, 50µl of supernatant from each well were collected into a 96 wells plate and incubated with 50µl of freshly

prepared Reaction Mixture for 30 minutes at room temperature. Optical density was then read at 490nm. The percentage of cytotoxicity is calculated as followed: % = 100 x (exp value - control medium value)/(Triton X100 treated cells value - control medium value)

## References

1. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S: **Functional specialization of interleukin-17 family members.** *Immunity*, **34**(2):149-162.
2. Gaffen SL: **Structure and signalling in the IL-17 receptor family.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**(8):556-567.
3. Cua DJ, Tato CM: **Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system.** *Nat Rev Immunol*, **10**(7):479-489.
4. Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL: **gammadelta T cells: an important source of IL-17.** *Curr Opin Immunol* 2008, **20**(3):353-357.
5. Onishi RM, Gaffen SL: **Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease.** *Immunology*, **129**(3):311-321.
6. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y: **The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation.** *Immunity* 2008, **28**(4):454-467.
7. Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA, Lee AH, Franks HA, Kilpatrick L, Yilmazer A, Paish EC, Ellis IO, Patel PM *et al*: **IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines.** *Breast Cancer Res* 2008, **10**(6):R95.
8. Chen WC, Lai YH, Chen HY, Guo HR, Su IJ, Chen HH: **Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor.** *Histopathology*, **63**(2):225-233.
9. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT: **Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth.** *Blood* 2003, **101**(7):2620-2627.
10. Nam JS, Terabe M, Kang MJ, Chae H, Voong N, Yang YA, Laurence A, Michalowska A, Mamura M, Lonning S *et al*: **Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17.** *Cancer Res* 2008, **68**(10):3915-3923.
11. Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C, Laprevotte E, Garbar C, Savoye AM, Cure H, Mascaux C, Alberici G, Bonnefoy N *et al*: **IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2.** *Sci Rep*, **3**:3456.
12. Huang CK, Yang CY, Jeng YM, Chen CL, Wu HH, Chang YC, Ma C, Kuo WH, Chang KJ, Shew JY *et al*: **Autocrine/paracrine mechanism of interleukin-17B receptor promotes breast tumorigenesis through NF-kappaB-mediated antiapoptotic pathway.** *Oncogene*, **33**(23):2968-2977.
13. Furuta S, Jeng YM, Zhou L, Huang L, Kuhn I, Bissell MJ, Lee WH: **IL-25 causes apoptosis of IL-25R-expressing breast cancer cells without toxicity to nonmalignant cells.** *Sci Transl Med*, **3**(78):78ra31.

14. King AJ, Sun H, Diaz B, Barnard D, Miao W, Bagrodia S, Marshall MS: **The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338.** *Nature* 1998, **396**(6707):180-183.
15. Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R: **Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation.** *EMBO J* 1999, **18**(8):2137-2148.
16. Ghayad SE, Cohen PA: **Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR pathway: new hope for breast cancer patients.** *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, **5**(1):29-57.
17. Pullen N, Thomas G: **The modular phosphorylation and activation of p70s6k.** *FEBS Lett* 1997, **410**(1):78-82.
18. Weng QP, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb MJ, Avruch J: **Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies.** *J Biol Chem* 1998, **273**(26):16621-16629.
19. Porter DC, Keyomarsi K: **Novel splice variants of cyclin E with altered substrate specificity.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**(23):E101.
20. Wingate H, Zhang N, McGarhen MJ, Bedrosian I, Harper JW, Keyomarsi K: **The tumor-specific hyperactive forms of cyclin E are resistant to inhibition by p21 and p27.** *J Biol Chem* 2005, **280**(15):15148-15157.
21. Wang XD, Rosales JL, Magliocco A, Gnanakumar R, Lee KY: **Cyclin E in breast tumors is cleaved into its low molecular weight forms by calpain.** *Oncogene* 2003, **22**(5):769-774.
22. Chung AS, Wu X, Zhuang G, Ngu H, Kasman I, Zhang J, Vernes JM, Jiang Z, Meng YG, Peale FV *et al*: **An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy.** *Nat Med*, **19**(9):1114-1123.
23. Duong MT, Akli S, Wei C, Wingate HF, Liu W, Lu Y, Yi M, Mills GB, Hunt KK, Keyomarsi K: **LMW-E/CDK2 deregulates acinar morphogenesis, induces tumorigenesis, and associates with the activated b-Raf-ERK1/2-mTOR pathway in breast cancer patients.** *PLoS Genet*, **8**(3):e1002538.
24. Weber CK, Slupsky JR, Kalmes HA, Rapp UR: **Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf.** *Cancer Res* 2001, **61**(9):3595-3598.
25. Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W: **Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(6):2262-2272.
26. Sarra M, Cupi ML, Bernardini R, Ronchetti G, Monteleone I, Ranalli M, Franze E, Rizzo A, Colantoni A, Caprioli F *et al*: **IL-25 prevents and cures fulminant hepatitis in mice through a myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism.** *Hepatology*, **58**(4):1436-1450.
27. Dolgachev V, Petersen BC, Budelsky AL, Berlin AA, Lukacs NW: **Pulmonary IL-17E (IL-25) production and IL-17RB+ myeloid cell-derived Th2 cytokine production are dependent upon stem cell factor-induced responses during chronic allergic pulmonary disease.** *J Immunol* 2009, **183**(9):5705-5715.
28. Miyagaki T, Sugaya M, Suga H, Kamata M, Ohmatsu H, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S: **IL-22, but not IL-17, dominant environment in cutaneous T-cell lymphoma.** *Clin Cancer Res*, **17**(24):7529-7538.
29. Mayer C, Popanda O, Zelezny O, von Brevern MC, Bach A, Bartsch H, Schmezer P: **DNA repair capacity after gamma-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes.** *DNA Repair (Amst)* 2002, **1**(3):237-250.

## ***DISCUSSION & PERSPECTIVES***

Avec environ 49 000 nouvelles femmes touchées chaque année, le cancer du sein est le plus répandu des cancers féminins. Le dépistage organisé et individuel du cancer du sein, ainsi que l'amélioration des traitements, notamment systémiques (chimiothérapies, hormonothérapie, thérapies ciblées), ont fait diminuer la mortalité mais il reste aujourd'hui encore le plus meurtrier des cancers féminins en France. L'efficacité des traitements demeure donc en deçà des espoirs attendus.

Une des pistes de recherche prometteuse concerne l'immunologie, il est en effet désormais largement reconnu que les cellules tumorales peuvent être identifiées par le système immunitaire. Mais les connaissances générales de l'immunité anti-tumorale nécessitent d'être précisées dans de nombreux cancers, notamment le cancer du sein, afin de pouvoir les transférer aux malades en vue d'une immunothérapie, qu'elle soit cellulaire et/ou humorale : c'est ce qui définit la recherche translationnelle et clinique.

"La recherche clinique se base sur les résultats de la recherche fondamentale pour inventer et prouver l'efficacité de nouveaux traitements." C'est ainsi dans une volonté de décroisement entre la recherche expérimentale et la recherche clinique, que mon projet de thèse s'est articulé autour de deux projets concernant chacun un de ces domaines de recherche.

### **A) Stratégie néoadjuvante des cancers du sein opérables, étude des facteurs pronostiques**

Afin de me former à la recherche clinique, j'ai d'abord travaillé au bureau de recherche clinique de l'institut Jean Godinot où j'ai rempli la fonction d'ARC. Cet institut étant un établissement spécialisé dans la prise en charge du cancer du sein, sujet auquel je m'intéressais déjà particulièrement, cette fonction m'a permis d'effectuer une exploration clinique de l'ensemble des cancers du sein.

Je me suis alors intéressée plus particulièrement à la stratégie de la chimiothérapie néoadjuvante pour des cancers du sein opérables. En effet, si cette stratégie est un gold-standard pour les cancers du sein localement avancés et les cancers du sein inflammatoires, elle a également été de plus en plus utilisée, depuis près de quarante ans, pour des tumeurs à pronostic immédiat mais grave et de taille importante empêchant toute chirurgie mammaire

conservatrice immédiate. Plusieurs études contrôlées ont ainsi été menées au début des années 2000 et ont démontré l'efficacité de la CTNA au moins identique à la chimiothérapie adjuvante post-opératoire<sup>128,129,322</sup>. L'utilisation de la CTNA présente de plus plusieurs avantages: - celui d'augmenter le taux de chirurgies conservatrices en diminuant la taille des tumeurs, - celui de traiter plus précocement les micro-métastases, - ainsi que d'analyser précisément la réponse au traitement anti-cancéreux sur la pièce chirurgicale. Certaines caractéristiques de cette analyse peuvent s'avérer être des facteurs pronostiques de survie sans rechute et de survie globale. J'ai donc décidé d'identifier ces nouveaux facteurs pronostiques de la CTNA pour les cancers du sein opérables à l'institut Jean Godinot.

Pour cela, j'ai dû entièrement créer une base de données à partir des patientes traitées par CTNA depuis l'année 2000, pour des cancers du sein invasifs primaires opérables. Cette étude rétrospective monocentrique constitue un groupe de patientes homogène puisqu'elles ont suivi un plan strict de CTNA, réunissant les 3 principales drogues actuelles de la chimiothérapie du cancer du sein. Celles-ci sont: les anthracyclines, principalement l'épirubicine, les taxanes, principalement le docétaxel, et le trastuzumab si la tumeur est HER2-positif, drogue justement disponible depuis le début des années 2000.

#### - Réponses à la CTNA

Dans un premier temps, j'ai observé que l'objectif premier de la CTNA en terme d'augmentation du taux de chirurgies conservatrices était effectivement atteint. En effet, la dernière méta-analyse, publiée en 2007<sup>323</sup> et regroupant les résultats de 14 études randomisées et 5500 patientes a démontré que la CTNA diminuait significativement le taux de mastectomies. La chirurgie conservatrice est donc significativement plus fréquente chez les patientes traitées en situation néoadjuvante (64%), que chez les patientes ayant reçu le traitement en adjuvant (47%), avec un changement positif du plan initial de prise en charge locale dans 26% des patientes traitées par CTNA. Notre taux de 58,8% de conservation du sein dans notre série se trouve légèrement en-dessous de la moyenne des données observées dans la littérature. Il serait intéressant qu'un travail de thèse d'exercice pour le diplôme d'études supérieures de chirurgie générale ou celui de gynécologie obstétrique puisse avoir lieu sur les mastectomies après CTNA. Il s'agirait de confronter la taille tumorale initiale, la réponse clinique, la localisation dans le sein, le type de chirurgie et enfin la taille histologique

du résidu, pour faire éventuellement évoluer nos pratiques chirurgicales à l'institut Jean Godinot.

Concernant la réponse clinique, les réponses complètes et partielles sont regroupées sous le terme de réponse objective (résultat dénommé réponse clinique dans l'article 1), celle-ci est évaluée par palpation dans notre institut, (67,3%) et par mesures radiologiques comprenant la mammographie et l'échographie (70,4%). Ces deux types d'évaluation de la réponse clinique ne sont pas significativement différents ( $p=1,00$ ). Cela reste constant lorsque l'on compare les réponses cliniques obtenues selon les différentes chimiothérapies suivies. Que la réponse soit évaluée par palpation (<sup>P</sup>) ou par mesure radiologique (<sup>R</sup>) la réponse objective est supérieure pour les patientes ayant reçu une CTNA à base d'anthracyclines seules (<sup>P</sup>: 69,7% / <sup>R</sup>: 76,8%) comparées aux patientes ayant reçu une CTNA séquentielle (<sup>P</sup>: 61,2% / <sup>R</sup>: 66,5%) et celle-ci est encore largement supérieure pour les patientes traitées par trastuzumab et CTNA (<sup>P</sup>: 83,7% / <sup>R</sup>: 71,4%). Toutefois ces résultats semblent discutables puisque certaines études ont montré que la palpation n'est pas suffisamment précise pour évaluer la tumeur résiduelle <sup>324</sup> ou encore que la combinaison de la mammographie et de l'échographie est moyennement précise pour évaluer la taille résiduelle de la tumeur suite à un traitement par CTNA <sup>325</sup>.

\* En effet, après un traitement par CTNA la palpation d'un tissu de fibrose ou de nécrose peut conduire à surestimer la taille résiduelle tumorale, de plus, pour des petites tumeurs dans un sein dense ou pour des tumeurs irrégulières il est toujours très difficile d'évaluer la taille du résidu par palpation.

\* L'évaluation de la réponse tumorale par mammographie connaît également certaines limites, celle-ci dépend tout d'abord de l'aspect mammographique initial de la tumeur, en effet la mesure devient difficile dans le cas d'un sein dense car le contraste est faible entre le tissu tumoral et le tissu sain. De plus, Moskovic et al.<sup>326</sup> ont démontré que la persistance des microcalcifications malignes et la distorsion architecturale visibles sur la mammographie aboutissent à de grosses erreurs d'interprétation de la maladie résiduelle après une CTNA.

\* Quant à l'évaluation par échographie, Londero et al.<sup>327</sup> ont prouvé que cette technique de mesure est supérieure à la palpation et à la mammographie pour évaluer le résidu après CTNA.

Cependant l'évaluation radiologique prise en compte pour notre étude combine la mammographie et l'échographie, or Peintinger et al.<sup>325</sup> ont montré que cette combinaison est moyennement précise pour cette évaluation. La corrélation entre l'imagerie et la taille tumorale résiduelle histologique varie ainsi de 78,6% à 74% en fonction de sa taille et la précision est également influencée par le type histologique de la tumeur.

Interviennent alors des techniques plus récentes d'imagerie, telles que l'IRM et le TEP-Scanner.

\* L'IRM s'est avérée supérieure à la mammographie et à l'échographie, avec une excellente corrélation entre la taille tumorale mesurée par IRM et la taille résiduelle histologique<sup>328</sup> et peut ainsi être utilisée pour l'évaluation du résidu tumoral. Elle est notamment souvent utilisée pour évaluer des tumeurs mammaires difficiles à suivre par des méthodes conventionnelles comme les tumeurs multifocales ou les carcinomes lobulaires invasifs.

\* La technique par Tomographie par Emission de Positons-18F-FluoroDésoxyGlucose ou TEP-Scan peut également être utilisée pour évaluer la réponse au traitement par CTNA. Cette technique est basée sur une consommation accrue de glucose par les cellules tumorales en comparaison à celle des cellules saines. Bien que le rôle dans le diagnostic initial de tumeurs mammaires du TEP-Scan soit rendu difficile par la fixation physiologique du tissu mammaire et ce de manière très variable, son rôle dans l'évaluation de la réponse à une chimiothérapie est déjà reconnu. En effet la variation métabolique liée au traitement pourrait être observée beaucoup plus tôt que le changement de taille tumorale mesuré par les imageries conventionnelles. Ainsi la prédiction précoce de la réponse à la chimiothérapie par TEP-Scan est une indication reconnue par la FDA, aux Etats-Unis, dans le cancer du sein, et en Europe dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures et dans les lymphomes.

Il semble donc que, bien que ces données ne fussent pas disponibles en routine pour une analyse entre les années 2000 et 2012, l'IRM et le TEP-Scan sont désormais des techniques plus fiables d'évaluation de la réponse tumorale clinique, qu'il conviendra d'intégrer à l'avenir dans toute étude prospective de recherche clinique en CTNA du cancer du sein.

Concernant ensuite la réponse histologique, les analyses des pièces opératoires ont toutes été réalisées par notre laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologique, qui a utilisé exclusivement la classification de Chevallier. Avec un taux global de pCR de 19,5% notre série se compare favorablement à celles de la littérature. Une méta-analyse datant de 2012 rapporte effectivement un taux de pCR de 18,7% pour près de 20 000 patientes évaluées. Le modèle de la CTNA pour le cancer du sein opérable pratiqué à l'institut Jean Godinot est donc validé.

La pCR, ou réponse histologique complète, est évaluée après la CTNA et combine l'envahissement ganglionnaire et la taille tumorale histologique. Dans de nombreux essais cliniques néoadjuvants les patientes atteignant une pCR ont montré une meilleure survie à long terme, indiquant la pCR comme un facteur pronostique fort<sup>54,55</sup>. Ainsi la FDA a

approuvé l'utilisation de la pCR comme objectif à atteindre dans les essais cliniques en situation néoadjuvante dans les cancers du sein à haut risque, afin d'accélérer l'approbation de nouvelles drogues<sup>53</sup>. Le problème reste que différentes définitions de la pCR existent dans la littérature, en effet l'absence de tumeur invasive dans le sein seulement ou dans le sein et les ganglions, ainsi que l'absence ou non de tumeur *in situ*, également dans le sein seulement ou dans le sein et les ganglions ne sont pas encore établies. De ce fait le taux de pCR varie selon les études et une définition précise et uniforme de la pCR est encore requise. Néanmoins, la plupart des études, dont la nôtre, suivent la recommandation de la FDA et de von Minckwitz<sup>153</sup> selon laquelle la pCR, définie comme l'absence de tumeur résiduelle invasive et *in situ* dans le sein et les ganglions, est le meilleur moyen de discriminer les patientes de bon pronostic de celles de mauvais pronostic.

Il faut également noter que la valeur pronostique de la pCR est valable lorsqu'on ne différencie pas les sous-types moléculaires, en effet, lorsque ceux-ci sont pris en compte, les taux de pCR diffèrent considérablement: les tumeurs lumineales A obtiennent de faibles taux de pCR, les lumineales B un taux intermédiaire, tandis que les tumeurs triple négatives et celles surexprimant le récepteur HER2 obtiennent de bons taux de pCR<sup>58</sup>. De plus, l'impact pronostique n'est pas le même: pour les tumeurs Luminales A et B la pCR n'est pas associée au pronostic, alors que pour les patientes présentant des tumeurs hautement prolifératives comme les cancers TN et les tumeurs surexprimant le récepteur HER2 (RH<sup>+</sup>) la pCR peut discriminer précisément les bons *versus* les mauvais pronostics<sup>57,59</sup>.

La pCR reste néanmoins considérée comme un facteur pronostique fort<sup>54,55</sup>, corrélée avec des SSR et SG améliorées<sup>316</sup>. Ainsi, correspondant au taux de pCR décrit ci-dessus, j'ai obtenu une SSR à 10 ans de 69,6% et une SG à 10 ans et 60,2%. Premièrement, la SSR est presque toujours inférieure à la SG dans la littérature, ce que je ne retrouve pas car ces 2 courbes se sont croisées à environ 8 ans, du fait du décès de 4 patientes pour d'autres causes que leur cancer du sein, et donc sans rechute. Deuxièmement, ayant trouvé la majorité des données récentes de survie de la littérature évaluées à 8 ans j'ai recalculé les SSR et SG de notre série également à 8 ans, nous sommes, à ce moment-là, au croisement des 2 courbes, les survies globale et sans rechute sont alors égales et d'environ 68%.

L'étude de Rastogi et al.<sup>329</sup> suite au protocole NSABP B-18 donne une SSR de 58% et une SG de 68% à 8 ans, et l'étude, plus récente, de von Minckwitz et al.<sup>330</sup> donne quant à elle une SSR de 60% et une SG de 67,5% à 8 ans. Je remarque donc que la SG reste très constante selon ces différentes séries et que notre SSR est bien supérieure aux autres, suggérant qu'il y a une bonne prise en charge par l'institut Jean Godinot.

A la recherche d'une analyse plus aboutie, j'ai ensuite relevé cette réponse histologique complète en fonction du type de CTNA. Alors même que la thérapie à base d'anthracyclines et de taxanes est désormais recommandée pour une chimiothérapie première suite à plusieurs études prospectives révélant qu'elle était associée aux meilleurs taux de réponse <sup>314,331</sup>, j'ai obtenu 17,2% de pCR pour les patientes traitées par chimiothérapie à base d'anthracyclines seules alors que les patientes traitées par chimiothérapie séquentielle obtenaient un taux de pCR plus faible: 14,3%. Cependant ces résultats ne sortent pas significativement différents, et nous ne pouvons donc rien en déduire.

Par contre, pour les patientes traitées par trastuzumab et chimiothérapie (anthracyclines plus ou moins taxanes), ce qui concerne 17% de notre population, le taux de pCR est de 40,8%. C'est donc l'ajout de trastuzumab à la chimiothérapie dans le sous-groupe concerné qui a permis de se rapprocher du taux de 20% de pCR pour l'ensemble des patientes traitées avant chirurgie, dans notre série. Suite à plusieurs essais de phase III <sup>315,137-139,332</sup> il est maintenant admis que le pronostic des patientes porteuses de tumeurs mammaires surexprimant HER2 rejoint celui des patientes présentant un cancer du sein HER2-négatif.

#### - Les facteurs pronostiques

Dans un deuxième temps je me suis intéressée aux facteurs pronostiques de la tumeur initiale et de la maladie résiduelle, en effet l'évaluation de la réponse tumorale ne peut pas être seulement quantitative, prenant en compte la taille du résidu, mais doit aussi être qualitative et donc prendre en compte les facteurs intrinsèques du résidu. Les facteurs pronostiques sont des mesures prises au diagnostic ou lors de la chirurgie et qui, en absence de thérapie adjuvante, sont associés aux taux de rechute, de décès par cancer ou tout autre événement clinique.

D'une part j'ai analysé les facteurs évalués au diagnostic:

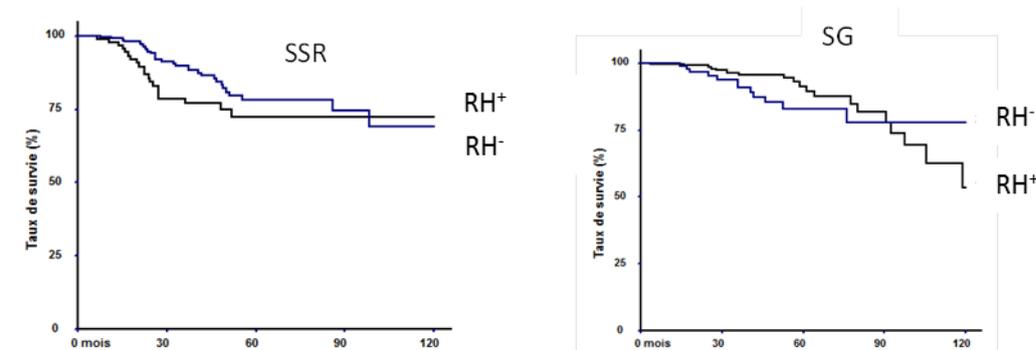
- la taille tumorale clinique initiale, le statut axillaire clinique initial, et donc le stade clinique, sont connus comme facteurs pronostiques acceptés et restent effectivement des facteurs pronostiques de la SSR et de la SG significatifs lors de mes analyses univariée et multivariée.

- Le grade SBR a parfois été critiqué du fait que 50 à 60% des tumeurs sont classées dans le grade II ; or, ce grade regroupe à la fois des patientes qui évoluent très favorablement

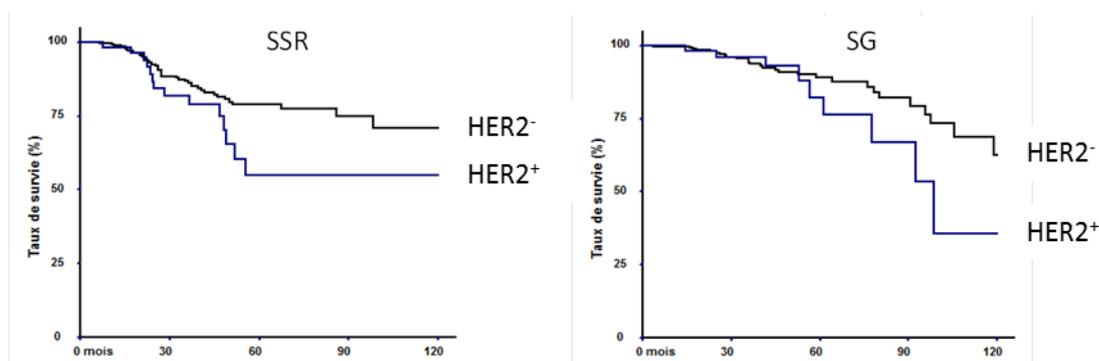
et d'autres qui évoluent très défavorablement. Le Doussal et al.<sup>61</sup> ont alors proposé un grade SBR modifié, le MSBR, qui élimine du score final la différenciation. Ce grade comprend 5 subdivisions qui aboutissent à deux groupes pronostiques : un groupe à faible risque métastatique (MSBR 1, 2 et 3) et un groupe à haut risque métastatique (MSBR 4 et 5).

Cependant le grade le plus utilisé actuellement reste le grade SBR classique, il constitue un facteur pronostique important et indépendant pour le risque métastatique et la survie des patientes. Plusieurs études ont montré que la survie globale et la survie sans rechute sont meilleures chez des patientes présentant une tumeur très différenciée (grade I) comparé à des patientes présentant une tumeur moyennement (grade II) ou peu différenciée (grade III)<sup>51,53</sup>. Lors de mon analyse univariée j'ai obtenu des SG à 9 ans de 94,1%, 57,9% et 55,1% ( $p=0,069$ ) pour les tumeurs de grade I, II et III respectivement, ainsi que des SSR à 9 ans de 92,1%, 80,2% et 60,9% ( $p=0,025$ ); le grade SBR reste donc un facteur pronostique significatif de la SSR et même si la différence n'est pas tout à fait significative pour la SG, la tendance est conservée. De plus, le grade SBR au diagnostic est le premier facteur pronostique à sortir de l'analyse multivariée, aussi bien pour la SSR ( $p=0,0001$ ) que pour la SG ( $p=0,0033$ ). Je suis donc en accord avec la littérature au sujet de ce paramètre clinique.

- Les marqueurs biologiques tels que le statut des récepteurs hormonaux et du récepteur HER2 sont des facteurs pronostiques reconnus dans le domaine du cancer du sein. Notamment, le récepteur HER2 est devenu un important marqueur prédictif, il y a quelques années, et était associé à un mauvais pronostic pour les patientes avant l'arrivée du trastuzumab. Cependant je n'ai pas retrouvé cette signification pronostique lors de mes analyses.



\* Concernant les récepteurs hormonaux, les courbes se croisent et les tendances pronostiques diffèrent selon qu'il s'agisse de la SSR ou de la SG alors qu'au vu de la littérature nous pouvions nous attendre à des meilleures SSR et SG pour les patientes RH<sup>+</sup> grâce aux thérapies endocrines adjuvantes<sup>317</sup>.



\* En revanche, concernant l'HER2, la tendance se prononce sur mes courbes en faveur des patientes HER2<sup>-</sup>, ce qui correspond à la littérature car nous savons que les tumeurs HER2<sup>+</sup> sont très agressives. Cependant j'obtiens une différence qui n'est pas significative statistiquement (p=0,15 pour la SSR, p=0,14 pour la SG), ce qui résulte certainement du traitement par trastuzumab, qui cible spécifiquement HER2<sup>+</sup> <sup>317</sup>.

D'autre part, j'ai étudié les facteurs évaluant la réponse à la CTNA :

- la taille de la tumeur résiduelle est mesurée histologiquement, c'est donc une mesure déjà beaucoup plus précise que la mesure clinique pré-opératoire. Il a ainsi été montré que la taille tumorale histologique était un facteur pronostique puissant de la SG et de la SSR, et ce, aussi bien chez des patientes ayant reçu une chimiothérapie adjuvante <sup>45</sup>, que chez des patientes ayant reçu une CTNA <sup>53</sup>. Lors de mes 2 analyses, univariée et multivariée, j'ai établi un cut-off à 0 et 2 cm pour reprendre la valeur utilisée en clinique des 2 cm concernant le diagnostic et ai obtenu ainsi (Cf article 1, fig. 3) une confirmation de ce facteur pronostique puisque les survies sont meilleures plus le résidu est petit. En effet même si la SG à 9 ans des résidus de plus 2 cm est meilleure (65,2%) que celle des résidus différents de 0 mais inférieurs à 2 cm (48,6%), la SG à 9 ans des patientes ne présentant pas de résidu est de 98,3%, d'où nous obtenons une différence significative (p=0,028). De plus l'ordre logique des courbes est rétabli lors de l'analyse des SSR, à 9 ans j'ai obtenu 90,9%, 70,1% et 62,6% pour les résidus de 0, moins de 2 cm et supérieurs ou égales à 2 cm, respectivement (p=0,011). De plus, la valeur pronostique de la taille résiduelle est confirmée par mon analyse multivariée, puisque ce paramètre sort 2<sup>ème</sup> en SG (p=0,017) et en SSR (p=0,0051).

- La CTNA est parfois controversée de par le fait qu'elle peut éliminer des ganglions positifs alors que l'envahissement ganglionnaire est le facteur pronostique le plus utilisé pour évaluer l'indication d'une chimiothérapie adjuvante. Cependant, la puissance pronostique du

nombre de ganglions résiduels chez des patientes ayant reçu une CTNA a été démontrée par plusieurs études <sup>45,51-53</sup>. En conséquence de ces derniers résultats je suggère que cette controverse n'a plus lieu d'être. Pour ces analyses il a ici encore fallu établir un cut-off pour le nombre de ganglions résiduels, je me suis cette fois concentrée sur les effectifs, voulant classer les patientes dans des groupes suffisamment homogènes pour l'analyse statistique, ainsi les patientes ne présentant pas de ganglion résiduel sont au nombre de 167, 1 à 3 ganglions ont été retrouvés pour 78 patientes et plus de 3 pour 63 patientes. Ce cut-off semble poser problème (Cf article 1, fig. 3) puisque les patientes avec peu de ganglions résiduels présentent une SG à 9 ans inférieure (49,5%) à celle des patientes avec de plus nombreux ganglions (53,3%), ce qui donne une différence non-significative entre les 3 groupes ( $p=0,079$ ). Néanmoins j'ai réussi à confirmer la valeur pronostique du nombre de ganglions résiduels en SSR où j'obtiens alors des survies à 9 ans de 82,4%, 65,6% et 48,7% pour les patientes sans ganglion résiduel, avec 1 à 3 ganglions ou plus de 3 ganglions, respectivement ( $p=0,011$ ). Le nombre de ganglions résiduels sort également, en 3ème place, dans l'analyse multivariée de la SSR ( $p=0,0039$ ).

- Le grade SBR évalué au diagnostic est un facteur pronostique reconnu, de plus l'étude d'Amat et al.<sup>333</sup> a démontré son évolution durant la CTNA. Plus tard cette même équipe a montré la valeur pronostique des grades SBR et MSBR post-CTNA <sup>120</sup>, ce qui a été confirmé par mon analyse univariée (Cf article 1, fig. 3). J'ai effectivement obtenu les SSR à 5 ans de 100%, 74,3% et 60,5% pour les grades I, II et III respectivement; qui révèle le grade SBR du résidu tumoral comme facteur pronostique significatif de la SSR ( $p=0,0032$ ), et cette tendance est conservée avec les SG de 94,7%, 88,4% et 84,2% bien que la différence ne soit plus significative ( $p=0,19$ ). La valeur pronostique du grade SBR évalué au diagnostic reste également significative dans l'analyse multivariée regroupant les patientes présentant un résidu, où ce paramètre sort le premier de l'analyse avec  $p=0,0064$  pour la SG et  $p=0,00033$  pour la SSR.

- Lors de cette étude j'ai regretté de ne pas posséder suffisamment de données sur l'état des marqueurs biologiques après CTNA. En effet plusieurs études ont suggéré que les marqueurs RH et/ou HER2 pouvaient être modifiés par la CTNA, ce qui pourrait avoir un impact sur les facteurs prédictifs et/ou pronostiques <sup>318</sup>. J'aurais aimé pouvoir étudier cette variation, sa présence ou non, ainsi que son sens et son impact pronostique et/ou prédictif. Ces données étant néanmoins désormais de plus en plus relevées, cela pourra être le sujet d'une future étude sur ma base de données.

J'ai également manqué de données en ce qui concerne le marqueur immunohistochimique Ki-67 puisque ce marqueur n'est évalué en routine à l'institut Jean Godinot que depuis récemment. Cet index de prolifération qui permet de quantifier la prolifération cellulaire et de classer les tumeurs du sein selon les 5 sous-types moléculaires décrits par Pérou<sup>334</sup> semble également pouvoir être un facteur pronostique. En effet plusieurs études ont prouvé sa valeur prédictive et pronostique<sup>111,112</sup>, en revanche le débat sur le cut-off entre le groupe de faible et de haut risque reste ouvert. Des données suggéraient qu'un Ki-67 supérieur à 10-14% définissait le groupe de patientes à haut risque, mais cette hypothèse a été mise en doute par Yerushalmi et al.<sup>335</sup>. En 2009 les experts du St Gallen ont considéré que le Ki-67 est un index important pour sélectionner les patientes porteuses de tumeurs mammaires RH<sup>+</sup> nécessitant une chimiothérapie en plus de la thérapie endocrine et pour classer les tumeurs comme faible, intermédiaire ou hautement proliférative avec des valeurs de Ki-67  $\leq 15\%$ , 16-30%, et  $>30\%$ , respectivement<sup>113</sup>. Le cut-off de cet index reste donc un sujet intéressant d'investigation.

- Des études ont montré que les facteurs pronostiques classiques et utilisés à l'heure actuelle pour définir la chimiothérapie à administrer pouvaient conduire à un sur-traitement des patientes dont environ 85% ne tireront pas d'avantage de la chimiothérapie au regard de la survie spécifique de la maladie à 10 ans<sup>336</sup>. Avec l'arrivée des études d'expression de gènes pour classer le cancer du sein, certains tests multigéniques ont été développés afin de mieux guider les cliniciens dans la décision thérapeutique tels que MammaPrint®, Oncotype<sup>TM</sup>, IGG®, EndoPredict®, PAM50 et Breast Cancer Index<sup>TM</sup> (Cf Chap 2 / 3 / e + **Tableau 8**). Ces tests apportent des informations supplémentaires et sont plus puissants que les facteurs cliniques et biologiques classiques.

Cependant, il faut tenir compte de la faisabilité en pratique de ces tests et de leur coût. Il est donc important que la recherche de nouveaux facteurs biomoléculaires continue afin d'en obtenir des plus faciles à utiliser en routine et capables de prédire de plus en plus finement la survie des patientes ou la sensibilité aux traitements afin d'aider les cliniciens dans la décision thérapeutique.

Test	Modèle industriel	Approbation de la FDA	Sous-types de cancers évalués	Suivi	Valeur pronostique	Valeur prédictive de la CT	Support	Analyse	LOE
<b>Oncotype DX™</b>	100% centralisé	Non	RH <sup>+</sup>	SSM 10 ans	Oui	Oui	FFP	qRT-PCR	I
<b>MammaPrint®</b>	100% centralisé	Oui	RH <sup>+</sup> /RH <sup>-</sup> N <sup>-</sup>	SSM 10 ans	Oui	Non	Tumeur congelée	Microarray	II
<b>IGG®</b>	100% centralisé	Non	RH <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup>	SSM 10 ans	Oui	Non	Tumeur congelée ou FFP	Microarray	III
<b>Breast Cancer</b>	100% centralisé	Non	RH <sup>+</sup>	SSM 10 ans	Oui	Non	FFP	qRT-PCR	III
<b>EndoPredict®</b>	Décentralisé sur plateformes locales	Non	RE <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup>	SSM 10 ans	Oui	Non	FFP	qRT-PCR	Ib
<b>PAM50</b>	Décentralisé sur plateformes locales	Non	RH <sup>+</sup> /RH <sup>-</sup>	SSM 10 ans	Oui	Non	FFP	qRT-PCR	I

SSM: Survie sans rechute métastatique

FFP: Tissus fixés avec du formol et inclus en paraffine

LOE: Level of Evidence

**Tableau 8 : Comparaison des tests multigéniques selon leurs caractéristiques**

- En plus de ces facteurs pronostiques, il existe plusieurs combinaisons prenant en compte plusieurs paramètres pour évaluer la maladie résiduelle. En Europe les classifications de Chevallier et de Sataloff sont les plus utilisées. Je me suis d'abord concentrée sur la classification de Chevallier, qui est une combinaison simple et avec des bornes bien délimitées, tandis que la classification de Sataloff sépare seulement les patientes en réponse pathologique complète ou incomplète, sans prendre en compte le carcinome *in situ*, qu'il est pourtant conseillé d'analyser séparément par les dernières recommandations internationales<sup>337</sup>. Ainsi, l'influence pronostique de la classification de Chevallier n'est désormais plus à prouver et c'est un résultat que j'ai retrouvé dans mon analyse univariée (p=0,016 pour la SG et p=0,0060 pour la SSR) ainsi que dans l'analyse multivariée regroupant les patientes présentant un résidu (p=0,012 pour la SSR). En revanche, cette combinaison prenant seulement en compte la taille du résidu et la présence ou non de tumeur *in situ*, je me suis intéressée à un index plus complexe: RDBN, pour Residual Disease in Breast and Nodes<sup>119</sup>. Comme son nom l'indique, cet index prend en compte tous les facteurs évalués post-chimiothérapie : taille de la tumeur résiduelle, grade SBR du résidu et nombre de ganglions résiduels envahis. J'ai alors testé sa valeur pronostique en analyse univariée et l'index est sorti très significatif (p=0,0082 pour la SG et p=0,0022 pour SG). En revanche, étant clairement corrélé aux autres paramètres inclus dans cette analyse, je n'ai pas pu le tester en analyse multivariée. Toutefois

Corben et al.<sup>121</sup> ont déjà démontré l'association de cet index avec la SSR via une analyse multivariée.

- Valeur pronostique dans les différents sous-types

Le cancer du sein n'est désormais plus reconnu comme une simple entité, mais comme 5 maladies distinctes, ayant chacune des cibles thérapeutiques différentes. Il m'a donc semblé logique que l'évaluation des facteurs pronostics puisse prendre en compte ces sous-types.

C'est pourquoi j'ai testé la valeur pronostique de l'index RDBN dans chaque sous-type moléculaire (Cf article 1, tab. 4).

- Pour le sous-groupe des tumeurs lumineales (A+B) (n=223) j'ai observé une discrimination pronostique significative en SSR (p=0,0031),

- j'ai également validé la signification pronostique de RDBN pour le sous-groupe des TN sur la SSR (p=0,013) et sur la SG (p=0,0064), malgré un nombre réduit de patientes (n=73), du fait que ce groupe est très chimiosensible,

- en revanche, je n'ai pas pu conclure pour le sous-groupe des HER2-positifs à cause d'un nombre de patientes trop restreint (n=19).

Je me suis ensuite interrogée sur la classification de Chevallier, à savoir si sa valeur pronostique était plus ou moins forte que celle de RDBN. J'ai alors observé que cet index est un facteur pronostique significatif des SG (p=0,0097) et SSR (p=0,003) seulement pour les TN, ne parvenant pas à conserver de valeur pronostique pour les autres sous-types de tumeurs.

C'est ainsi que je suis arrivée à une suggestion finale: étant donné les connaissances actuelles sur le cancer du sein, RDBN est l'index le plus approprié pour évaluer la maladie tumorale résiduelle et prédire les événements cliniques après CTNA.

- Conclusions et perspectives de cette étude:

\* L'institut Jean Godinot possède dorénavant une base de données sur la CTNA du cancer du sein opérable. En augmentant la base de données au fil des années ou en la complétant avec des données de patientes d'autres centres nous pourrions atteindre des populations suffisamment importantes dans chaque sous-type moléculaire et ainsi étudier la valeur pronostique de divers index dans chaque sous-type.

Il serait notamment intéressant d'y tester l'index RDBN car si l'on parvenait à prouver sa supériorité sur les autres index nous pourrions le guider vers une évaluation en routine.

L'harmonisation de l'évaluation de la réponse anatomopathologique permettrait ainsi d'apporter un facteur pronostique de survie additionnel aux cliniciens.

\* Les résultats de cette série monocentrique et homogène sur le plan thérapeutique se comparent favorablement aux études de la littérature concernant: - le taux de pCR, celui-ci étant proche de 20%, - la SG, qui reste constante selon les différentes études, - et la SSR, qui quant à elle, dépasse les données de la littérature. Donc, bien que le taux de chirurgies conservatrices soit légèrement inférieur aux données de la littérature, nos résultats suggèrent une bonne prise en charge des patientes traitées par CTNA par l'institut Jean Godinot.

\* Les résultats de cette série permettent également de confirmer une fois de plus la puissance pronostique de la réponse à la CTNA. Ils confirment l'intérêt majeur de cette analyse individuelle pour l'identification des patientes pour qui une thérapie adjuvante non-résistante sera profitable, tout en minimisant la toxicité pour les patientes qui ne risquent pas de rechute, c'est-à-dire pour l'indication de traitements additionnels systémiques et/ou locaux.

\* Cependant des études complémentaires doivent être menées sans tarder pour optimiser les résultats de la CTNA des différents types moléculaires de cancers du sein. Cela ne peut se concevoir que par des études prospectives multicentriques mettant en perspectives d'autres concepts de la cancérogénèse mammaire intégrant les nouvelles connaissances dans ce domaine telles que la protéomique et la génomique ou encore l'immunologie tumorale cellulaire ou environnementale.

Un protocole est ainsi en discussion avec l'équipe de recherche du Centre Jean Perrin, à Clermont-Ferrand, dont l'objectif consiste à évaluer l'importance de l'infiltration tumorale par les lymphocytes et, en particulier, par ceux exprimant CD8, pour la prédiction de la réponse à la CTNA et des survies des patientes présentant un cancer du sein luminal (RH<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>). En effet, nous ne disposons actuellement pas de facteur prédictif de la chimiothérapie pour ce type de cancer du sein. Cette équipe a alors obtenu de premiers résultats encourageants, à la fois pour l'administration personnalisée des traitements cytotoxiques et des traitements immunostimulateurs, avec une cohorte de 128 patientes. La validation de leurs résultats aurait désormais besoin d'être réalisée sur une cohorte plus large, ce que je me propose de faire grâce à la base que j'ai déjà établi et qui contient les données de survies de 223 patientes RH<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>.

## **B) Etude moléculaire d'un mécanisme d'échappement tumoral. Rôles des IL-17A et E dans la progression tumorale et l'invasion des cancers du sein**

Le projet autour de l'IL-17 a été développé suite au constat clinique de l'évolution péjorative de patientes atteintes d'un cancer du sein localisé triple négatif, notamment à la fin de leur traitement adjuvant. L'équipe du laboratoire d'immunologie cellulaire et moléculaire a alors étudié des patientes ayant ce profil évolutif et a constaté le caractère inflammatoire de la rechute, pouvant être associé à la présence de différentes formes d'IL-17.

Nos précédents résultats ainsi que de récentes publications ont démontré que l'IL-17A produit dans le microenvironnement, par les lymphocytes T infiltrant la tumeur, se fixe au récepteur formé par les chaînes IL-17RA/RC et induit la migration cellulaire, l'invasion, ainsi que la résistance à la chimiothérapie et aux traitements anti-angiogéniques<sup>338</sup> via l'activation de la voie ERK/MAPK<sup>201</sup>. Des résultats similaires ont été rapportés pour l'IL-17B, sécrétée par les cellules tumorales mammaires, qui se fixe à l'homodimère (IL-17RB)<sub>2</sub> et favorise ainsi la tumorigénèse via le recrutement de la voie de signalisation anti-apoptotique NF-κB<sup>295</sup>. Nous aurions alors pu suggérer un rôle pro-tumoral pour l'ensemble des cytokines de la famille IL-17.

Cependant l'IL-17E (ou IL-25) dont le récepteur est l'IL-17RA/RB et partage donc des sous-unités avec les récepteurs de l'IL-17A et B, a été décrite pour son rôle anti-tumoral. En effet l'étude de Furuta et al.<sup>321</sup> démontre que l'IL-17E, produite par les cellules mammaires épithéliales non transformées, entre en compétition avec l'IL-17B via cette sous-unité commune IL-17RB et favorise un signal pro-apoptotique par cette dernière. Les cellules saines résistent à la mort cellulaire, du fait de la faible expression de ce récepteur en comparaison aux cellules malignes.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires induits par l'IL-17E, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation que cette cytokine recrute dans les cellules cancéreuses mammaires. De plus, afin de trancher sur la problématique du rôle pro- ou anti-tumoral de l'IL-17E, nos études sur cette cytokine ont été menées en parallèle avec l'IL-17A, dont le rôle pro-tumoral a été confirmé par de récentes publications<sup>338</sup> ainsi que nos précédents travaux<sup>201</sup>.

Dans un premier temps nous avons démontré que l'IL-17A et l'IL-17E sont fortement surexprimées dans les tissus tumoraux en comparaison avec les tissus sains mammaires humains. Nous montrons également que ces cytokines ne sont pas produites par les cellules saines ou tumorales en culture, ce qui suggère que les cytokines puissent être produites par le microenvironnement tumoral ou que ce dernier puisse induire leur expression par les cellules tumorales. Ces résultats sont cohérents avec l'étude récente de Chen et al.<sup>286</sup> qui démontre une infiltration de 18% des tumeurs mammaires analysées par des cellules productrices d'IL-17A. Nous avons également analysé l'expression des 3 sous-unités constituant les récepteurs de ces cytokines. L'IL-17RA et l'IL-17RC sont exprimés sur les cellules tumorales comme sur les cellules non-transformées, tandis que l'expression de l'IL-17RB, faible dans les cellules saines, est fortement augmentée dans les cellules tumorales. Il semble donc que la surexpression d'IL-17RB soit une caractéristique propre aux cellules tumorales, comme l'avait déjà démontré l'étude de Furuta et al.<sup>321</sup> puis confirmé celle de Huang et al.<sup>295</sup>. En revanche tandis que cette première étude démontre un effet pro-apoptotique médié par ce récepteur, cette deuxième montre que la surexpression de l'IL-17RB conduit à la croissance tumorale. Il est important de noter que ce récepteur peut fixer l'IL-17B en s'homodimérisant ou l'IL-17E lorsqu'il est associé avec l'IL-17RA. Le rôle de cette sous-unité de récepteur pourrait donc varier en fonction de la formation du complexe dimérique et de son ligand. L'étude de Maezawa et al.<sup>339</sup> appuie les résultats de Huang puisqu'elle montre que le récepteur IL-17RB induit l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Nous avons alors voulu tester si l'IL-17E était réellement capable d'induire l'apoptose des cellules mammaires tumorales. Notre étude montre que l'IL-17E, comme l'IL-17A, ne conduit pas à l'apoptose des cellules mammaires tumorales. De plus, nous montrons que la stimulation de cellules tumorales par l'IL-17E, comme l'IL-17A, augmente la chimiorésistance au Taxol. Afin d'identifier les kinases impliquées dans cette chimiorésistance, nous avons étudié la phosphorylation de protéines jouant un rôle dans les voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale et avons ainsi mis en évidence les phosphorylations de c-RAF, acteur majeur de la voie MAP kinase, et celle de la kinase S6 qui est une cible de la voie mTOR. Il a déjà été démontré que les voies PI3K/AKT/mTOR et MAPK sont surexprimées dans de nombreuses tumeurs, notamment celles de sein et peuvent induire une chimiorésistance<sup>340</sup> ou une résistance aux thérapies endocrines<sup>341,342</sup>. De plus l'activation de la voie b-RAF-ERK1/2-mTOR a été associée avec de hauts niveaux d'expression de formes courtes de la cycline E: LMW-E *in vitro* et dans des tissus tumoraux humains, notamment dans cancers du sein<sup>343</sup>. La cycline E est une sous-unité régulatrice de CDK2, qui contribue à la transition des phases G1 à S. Il existe des formes courtes : les

LMW-E, auxquelles il manque le domaine régulateur, et qui ne peuvent donc pas être inhibées par les protéines p21 et p27, ce qui augmente fortement l'activité de CDK2 et donc la prolifération cellulaire. Cette même étude a effectivement démontré que cette forte expression de LMW-E était corrélée à un mauvais pronostic <sup>343</sup>.

Dans ce contexte, nous avons donc étudié l'expression de la cycline E et de ses différentes formes et avons pu démontrer que l'IL-17A et l'IL-17E augmentent la génération de LMW-E dans les lignées mammaires tumorales et non dans les cellules saines. Ces dernières expriment pourtant les récepteurs IL-17RA et RC, ce n'est donc pas l'absence de ces récepteurs qui explique l'absence de génération de LMW-E inductible par l'IL-17A. Ce mécanisme, spécifique des cellules tumorales, doit donc être acquis indépendamment des IL-17, comme la synthèse de protéases particulières, telles que les élastases <sup>343</sup>.

A l'avenir il serait également intéressant d'étudier l'impact des IL-17s sur la cycline D (1, 2 et 3), qui agit en amont de la cycline E. En effet, la cycline D1 a déjà été largement étudiée pour son rôle dans le cancer du sein et pourrait se révéler comme cible thérapeutique via ses kinases cycline-dépendantes: CDK4 et CDK6 <sup>344</sup>.

En conclusion, nos données indiquent que les cytokines IL-17A et IL-17E partagent un même effet pro-tumoral. Une caractéristique importante et propre aux cellules mammaires tumorales est la surexpression d'IL-17RB qui est liée à la prolifération et à l'augmentation de la chimiorésistance de ces cellules via l'activation des voies PI3K/AKT/mTOR et MAPK.

Pour continuer ces études j'aimerais profiter de ma proximité avec le centre d'anatomopathologie de l'institut Jean Godinot pour tester l'expression des récepteurs des différentes IL-17s sur différents types de tumeurs. Nous pourrions ainsi comparer les expressions d'IL-17s sur des tumeurs inflammatoires ou non, des tumeurs de patientes qui ont présenté des rechutes ou non, ou encore sur les 5 sous-types moléculaires de tumeurs mammaires.

Les mécanismes d'échappement mis en place pour les cellules tumorales sont nombreux. Notre projet autour de l'IL-17 étant initialement parti d'un constat clinique concernant particulièrement les tumeurs inflammatoires, il serait intéressant d'observer comment l'IL-17 peut modifier ce contexte inflammatoire. Nous pourrions établir s'il existe une relation entre les IL-17s et les lymphocytes infiltrant la tumeur, si ces cytokines participent au recrutement

de certaine sous populations cellulaires (lymphocytes, macrophages...) et/ou d'autres cytokines comme l'expression d'IL-6 et/ou IL-8, dans le microenvironnement tumoral, qui pourraient participer à l'inhibition de la cytotoxicité des lymphocytes via une reprogrammation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> <sup>205,209</sup>. On pourrait également étudier le rôle des IL-17s dans la dissémination métastatique, la première idée que j'aimerais développer serait l'observation d'une modulation ou non de l'expression de molécules d'adhésion par la cytokine.

Enfin, le rôle pro-tumoral de plusieurs IL-17s étant désormais clair, il serait intéressant de tester des anticorps anti-IL-17 dans un premier temps sur des modèles murins, puis sur l'Homme. Divers anticorps anti-IL-17A sont déjà en cours d'évaluation clinique chez l'Homme, trois preuves de concept ont démontré en 2010 que l'anticorps AIN457, devenu désormais Secukinumab était un agent thérapeutique efficace dans la lutte contre le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et l'uvéïte auto-immune <sup>345</sup>. Ce même anticorps a cependant donné des résultats inattendus dans un essai pour la maladie de Crohn <sup>346</sup>. En revanche un autre anti-IL-17A, Ixekizumab a été validé en phase II contre la polyarthrite rhumatoïde, de même que le Brodalumab avance vers une étude de phase III contre le psoriasis.

J'aimerais donc pouvoir tester des traitements par anticorps neutralisant chacune des IL-17s sur des modèles murins pour voir comment ces thérapies pourraient affecter la croissance tumorale et la sensibilité de la tumeur aux chimiothérapies ou immunothérapies (trastuzumab) dans ces modèles animaux.

Pour conclure, j'aimerais regrouper mes 2 axes de recherche à l'intérieur d'un seul protocole. Ainsi je souhaiterais analyser l'expression des IL-17s, par PCR et/ou IHC, sur différents types de tumeurs préalablement traitées par CTNA. De nombreuses données, et notamment les données de survie de ces patientes sont déjà enregistrées dans ma base de données et il sera possible de retrouver les tumeurs congelées dans notre laboratoire d'anatomopathologie, pour les tests d'expression de nos marqueurs d'intérêt. Cette étude nous permettra d'analyser l'expression des IL-17s selon divers paramètres déjà recueillis dans ma base.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Albertine Aouba, Mireille Eb, Grégoire Rey, Gérard Pavillon, É. J. Données sur la mortalité en France : principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000. *Bull. épidémiologique Hebd. l'InVS n°22*, 249 (2011).
2. Vogel, V. G. Atypia in the assessment of breast cancer risk: implications for management. *Diagn. Cytopathol.* **30**, 151–7 (2004).
3. Osako, T. *et al.* Incidence and prediction of invasive disease and nodal metastasis in preoperatively diagnosed ductal carcinoma in situ. *Cancer Sci.* **105**, 576–82 (2014).
4. Julian-Reynier, C. Prédiposition génétique aux cancers du sein et de l'ovaire Importance des résultats des tests. *médecine/sciences* **27**, 257–61 (2011).
5. Beaber, E. F. *et al.* Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20 to 49 years of age. *Cancer Res.* **74**, 4078–89 (2014).
6. Renehan, A. G. *et al.* Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. *Int. J. Cancer* **126**, 692–702 (2010).
7. Wolf, I., Sadetzki, S., Catane, R., Karasik, A. & Kaufman, B. Diabetes mellitus and breast cancer. *Lancet. Oncol.* **6**, 103–11 (2005).
8. Lu, Y. *et al.* Alcohol promotes mammary tumor growth through activation of VEGF-dependent tumor angiogenesis. *Oncol. Lett.* **8**, 673–678 (2014).
9. Cotterchio, M., Mirea, L., Ozcelik, H. & Kreiger, N. Active Cigarette Smoking, Variants in Carcinogen Metabolism Genes and Breast Cancer Risk among Pre- and Postmenopausal Women in Ontario, Canada. *Breast J.* **20**, 468–80 (2014).
10. Castelló, a *et al.* Spanish Mediterranean diet and other dietary patterns and breast cancer risk: case-control EpiGEICAM study. *Br. J. Cancer* 1–9 (2014). doi:10.1038/bjc.2014.434
11. Pot, G. K. *et al.* Dietary patterns derived with multiple methods from food diaries and breast cancer risk in the UK Dietary Cohort Consortium. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1–6 (2014). doi:10.1038/ejcn.2014.135
12. McNally, S. & Martin, F. Molecular regulators of pubertal mammary gland development. *Ann. Med.* **43**, 212–34 (2011).
13. Weinberg, R. Molecular basis of carcinogenesis : understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol. Ther.* **2(2):105-1**, (1996).
14. Harris, C. C. Chemical and Physical Carcinogenesis : Advances and Perspectives for the 1990s. *Chemical and Physical Carcinogenesis : Advances and Perspectives for the 1990s*1. (1991).
15. Gasco, M., Shami, S. & Crook, T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **4**, 70–6 (2002).
16. Maronpot, R. Correlation of data from the strain A mouse bioassay with long-term bioassays. *Exp Lung Res* 17(2):425–31 (1991).
17. Rifkind, R. a, Richon, V. M. & Marks, P. a. Induced differentiation, the cell cycle, and the treatment of cancer. *Pharmacol. Ther.* **69**, 97–102 (1996).
18. Solomon, E., Borrow, J. & Goddard, a D. Chromosome aberrations and cancer. *Science* **254**, 1153–60 (1991).
19. Li, D.-M. & Feng, Y.-M. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. *Breast Cancer Res. Treat.* **128**, 7–21 (2011).
20. Wendt, M. K., Taylor, M. a, Schiemann, B. J. & Schiemann, W. P. Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2423–35 (2011).
21. Mego, M., Mani, S. a & Cristofanilli, M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 693–701 (2010).
22. Danø, K. *et al.* Plasminogen activation and cancer. 676–681 (2005). doi:10.1160/TH05
23. Fan, F., Schimming, A., Jaeger, D. & Podar, K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *J. Oncol.* **2012**, 281261 (2012).

24. Dvorak, H. F. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: A Critical Cytokine in Tumor Angiogenesis and a Potential Target for Diagnosis and Therapy. *J. Clin. Oncol.* **20**, 4368–4380 (2002).
25. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 1–6 (2003).
26. Talmadge, J. E. & Fidler, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* **70**, 5649–69 (2010).
27. Iwatsuki, M. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.* **101**, 293–9 (2010).
28. Borsig, L., Wolf, M. J., Roblek, M., Lorentzen, a & Heikenwalder, M. Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory. *Oncogene* **33**, 3217–24 (2014).
29. Uehiro, N. *et al.* Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer. *Breast Cancer* 3–8 (2013). doi:10.1007/s12282-013-0453-7
30. Zonderland, H. M., Coerkamp, E. G., Hermans, J., Vijver, M. J. Van De & Voorthuisen, A. E. Van. Breast Imaging Diagnosis of Breast Cancer : Contribution of US as an Adjunct to Mammography 1. 413–422 (1996).
31. Tavassoli, F. A. Lobular and ductal intraepithelial neoplasia. *Pathologie* **29 Suppl 2**, 107–11 (2008).
32. Paul Peter ROSEN, David W. BRAUN, Barbara LYNGHOLM, Jerome A. URBAN, D. W. K. Lobular Carcinoma in situ of the Breast: Preliminary Results of Treatment by Ipsilateral Mastectomy and Contralateral Breast Biopsy. *Cancer* **47**, 813–819 (1965).
33. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–52 (2000).
34. Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–74 (2001).
35. Goldhirsch, a *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* **24**, 2206–23 (2013).
36. Hu, H. *et al.* Clinicopathological classification and individualized treatment of. *Chin. Med. J. (Engl)*. **126**, 3921–3925 (2013).
37. Dent, R. *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* **13**, 4429–34 (2007).
38. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. doi:10.1172/JCI45014DS1
39. Fredholm, H. *et al.* Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One* **4**, e7695 (2009).
40. Keegan, T. H. M., DeRouen, M. C., Press, D. J., Kurian, A. W. & Clarke, C. a. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. *Breast Cancer Res.* **14**, R55 (2012).
41. Dowsett, M. *et al.* Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J. Clin. Oncol.* **28**, 509–18 (2010).
42. Hawkins, R. a *et al.* Outcome after extended follow-up in a prospective study of operable breast cancer: key factors and a prognostic index. *Br. J. Cancer* **87**, 8–14 (2002).
43. De Paola, F. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor and Prognosis in Patients wiht Node-Negative Breast Cancer. **233**, 228–233 (2002).
44. Jacquillat, C. *et al.* Results of Neoadjuvant Chemotherapy and Radiation Therapy in the Breast-Conserving Treatment of 250 Patients With All Stages of infiltrative Breast Cancer. *Cancer* **66**, 119–129 (1990).
45. Bonadonna, G. *et al.* Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience in the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol* **16(1)**, 93–100 (1998).
46. Fitzgibbons, P. L. *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124**, 966–78 (2000).
47. Nemoto, T. *et al.* Management and Survival of Female Breast Cancer: *Cancer* **45**, 2917–2924 (1980).

48. Atahan, I. L. *et al.* Percent positive axillary involvement predicts for the development of brain metastasis in high-risk patients with nonmetastatic breast cancer receiving post-mastectomy radiotherapy. *Breast J.* **14**, 245–9 (2008).
49. Jeruss, J. S. *et al.* Staging of breast cancer in the neoadjuvant setting. *Cancer Res.* **68**, 6477–81 (2008).
50. Saxena, N. *et al.* Prognostic value of axillary lymph node status after neoadjuvant chemotherapy. Results from a multicentre study. *Eur. J. Cancer* **47**, 1186–92 (2011).
51. Curé, H. *et al.* Prognostic value of residual node involvement- Curé, 2002. *Breast Cancer Res. Treat.* **76**, 37–45 (2002).
52. Chen, S. *et al.* Lymph node counts and ratio in axillary dissections following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a better alternative to traditional pN staging. *Ann. Surg. Oncol.* **21**, 42–50 (2014).
53. Chen, S., Chen, C.-M., Yu, K.-D., Yang, W.-T. & Shao, Z.-M. A prognostic model to predict outcome of patients failing to achieve pathological complete response after anthracycline-containing neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J. Surg. Oncol.* **105**, 577–85 (2012).
54. Kuerer, H. M. *et al.* Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **17**, 460–9 (1999).
55. Von Minckwitz, G. *et al.* Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Res. Treat.* **125**, 145–56 (2011).
56. Mazouni, C. *et al.* Residual ductal carcinoma in situ in patients with complete eradication of invasive breast cancer after neoadjuvant chemotherapy does not adversely affect patient outcome. *J. Clin. Oncol.* **25**, 2650–5 (2007).
57. Von Minckwitz, G. *et al.* Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol.* **30**, 1796–804 (2012).
58. Ooe, A. *et al.* Relationship between intrinsic subtypes and tumor responses to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. *breast Dis* **34**, 9–17 (2012).
59. Cortazar, P. *et al.* Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* **384**, 164–72 (2014).
60. Bloom, H. J. & Richardson, W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br. J. Cancer* **11**, 359–77 (1957).
61. Le Doussal, V. *et al.* Prognostic Value of Histologic Grade Nuclear Components of Scarff - Bloom - Richardson (SBR). **1**, 1914–1921 (1970).
62. Cianfrocca, M. & Goldstein, L. J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* **9**, 606–16 (2004).
63. Andre, F. *et al.* Mitotic index and benefit of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in patients with early breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2996–3000 (2005).
64. Zambetti, M. *et al.* Pathological complete response rates following different neoadjuvant chemotherapy regimens for operable breast cancer according to ER status, in two parallel, randomized phase II trials with an adaptive study design (ECTO II). *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 843–51 (2012).
65. Michels, J.-J., Marnay, J., Delozier, T., Denoux, Y. & Chasle, J. Proliferative activity in primary breast carcinomas is a salient prognostic factor. *Cancer* **100**, 455–64 (2004).
66. Cocquyt, V. F. *et al.* Different responses to preoperative chemotherapy for invasive lobular and invasive ductal breast carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* **29**, 361–367 (2003).
67. Cristofanilli, M. *et al.* Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *J. Clin. Oncol.* **23**, 41–8 (2005).
68. Nagao, T. *et al.* The differences in the histological types of breast cancer and the response to neoadjuvant chemotherapy: the relationship between the outcome and the clinicopathological characteristics. *Breast* **21**, 289–95 (2012).

69. Bettelheim, R., Penman, H. G., Thornton-Jones, H. & Neville, a M. Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. *Br. J. Cancer* **50**, 771–7 (1984).
70. Houvenagel, G. *et al.* Du risque de sous-traitement des cancers du sein en utilisant la technique du ganglion sentinelle. *Bull cancer* **90**, 467–473 (2003).
71. Fuksa, L., Micuda, S., Grim, J., Ryska, a & Hornychova, H. Predictive biomarkers in breast cancer: their value in neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Invest.* **30**, 663–78 (2012).
72. Ni, Y.-B., Tsang, J. Y. S., Chan, S. K. & Tse, G. M. A novel morphologic-molecular recurrence predictive model refines traditional prognostic tools for invasive breast carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **21**, 2928–33 (2014).
73. Muss, H. Role of adjuvant endocrine therapy in early-stage breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* **28**, 313–21 (2001).
74. Dixon, J. M., Jackson, J., Renshaw, L. & Miller, W. R. Neoadjuvant tamoxifen and aromatase inhibitors: comparisons and clinical outcomes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **86**, 295–299 (2003).
75. Iii, W. A. K., Livingston, R. B., Gregory, E. J., Knight, W. A. & Mcguire, W. L. Estrogen Receptor as an Independent Prognostic Factor for Early Recurrence in Breast Cancer Estrogen Receptor as an Independent Prognostic Factor for Early Recurrence in Breast Cancer1. 4669–4671 (1977).
76. Fisher, B., Redmond, C., Fisher, E. & Caplan, R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* **6**, 1076–87 (1988).
77. Pichon, M. F. *et al.* Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 operable breast cancers. *Br. J. Cancer* **73**, 1545–51 (1996).
78. Hilsenbeck, S. *et al.* Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **52**, 227–37 (1998).
79. Coussens, L. *et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* **230**, 1132–9 (1985).
80. Semba, K., Toyoshima, K. & Yamamoto, T. c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor. **82**, 6497–6501 (1985).
81. Slamon, D. J. *et al.* Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene. *Science* **235**, 0–5 (1987).
82. Ross, J. & Fletcher, J. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* **3**, 237–252 (1998).
83. Penault-Llorca, F. *et al.* Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. *Int J Oncol* **22**, 1319–25 (2003).
84. Paik, S. *et al.* erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 1361–70 (1998).
85. Petit, T. *et al.* Chemotherapy Response of Breast Cancer Depends on HER-2 Status and Anthracycline Dose Intensity in the Neoadjuvant Setting Chemotherapy Response of Breast Cancer Depends on HER-2 Status and Anthracycline Dose Intensity in the Neoadjuvant Setting. 1577–1581 (2001).
86. Romond, E. H. *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1673–84 (2005).
87. Perez, E. a *et al.* Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3366–73 (2011).
88. Piccart-Gebhart, M. J. *et al.* Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer Martine. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1659–1672 (2005).
89. Robidoux, A. *et al.* Lapatinib as a component of neoadjuvant therapy for HER2-positive operable breast cancer (NSABP protocol B-41): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* **14**, 1183–92 (2013).

90. Gianni, L. *et al.* Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **13**, 25–32 (2012).
91. Romero, Q., Bendahl, P.-O., Fernö, M., Grabau, D. & Borgquist, S. A novel model for Ki67 assessment in breast cancer. *Diagn. Pathol.* **9**, 118 (2014).
92. De Azambuja, E. *et al.* Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br. J. Cancer* **96**, 1504–13 (2007).
93. Rudolph, P. *et al.* Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 271–8 (1999).
94. Rozan, S. *et al.* No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int. J. Cancer* **79**, 27–33 (1998).
95. Nishimura, R., Osako, T., Okumura, Y., Hayashi, M. & Arima, N. Clinical significance of Ki-67 in neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer as a predictor for chemosensitivity and for prognosis. *Breast Cancer* **17**, 269–75 (2010).
96. Jonat, W. & Arnold, N. Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Ann. Oncol.* **22**, 500–502 (2011).
97. Burcombe, R. J. *et al.* Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br. J. Cancer* **92**, 147–55 (2005).
98. De Abreu, F. B., Schwartz, G. N., Wells, W. a & Tsongalis, G. J. Personalized therapy for breast cancer. *Clin. Genet.* **86**, 62–7 (2014).
99. Gudlaugsson, E. *et al.* Prognostic Comparison of the Proliferation Markers (Mitotic Activity Index, Phosphohistone H3, KI67), Steroidreceptors,HER2, High Molecular Weight Cytokeratins and Classical Prognostic factors in T1-2N0M0 Breast Cancer. *Pol J Pathol* **1**, 1–8 (2013).
100. Klintman, M. *et al.* The prognostic value of mitotic activity index (MAI), phosphohistone H3 (PPH3), cyclin B1, cyclin A, and Ki67, alone and in combinations, in node-negative premenopausal breast cancer. *PLoS One* **8**, e81902 (2013).
101. Weigel, M. T. & Dowsett, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr. Relat. Cancer* **17**, R245–62 (2010).
102. Krajewski, S. *et al.* Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **6**, 29–40 (1999).
103. Devarajan, E. *et al.* Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* **21**, 8843–51 (2002).
104. Duffy, M. J. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin. Chem.* **48**, 1194–7 (2002).
105. Brinckerhoff, C. E. & Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 207–14 (2002).
106. Konecny, G. E. *et al.* Association between HER-2 / neu and Vascular Endothelial Growth Factor Expression Predicts Clinical Outcome in Primary Breast Cancer Patients Association between HER-2 / neu and Vascular Endothelial Growth Factor Expression Predicts Clinical Outcome in Pr. 1706–1716 (2004).
107. Generali, D., Symmans, W. F., Berruti, A. & Fox, S. B. Predictive immunohistochemical biomarkers in the context of neoadjuvant therapy for breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **2011**, 99–102 (2011).
108. Parker, J. S. *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–7 (2009).
109. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R68 (2010).
110. Metzger Filho, O., Ignatiadis, M. & Sotiriou, C. Genomic Grade Index: An important tool for assessing breast cancer tumor grade and prognosis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **77**, 20–9 (2011).

111. Filipits, M. *et al.* A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6012–20 (2011).
112. Gnant, M. *et al.* Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann. Oncol.* **25**, 339–45 (2014).
113. Zhang, Y. *et al.* NIH Public Access. *lancet oncol* **14**, 1067–1076 (2014).
114. Zhang, Y. *et al.* Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4196–205 (2013).
115. Rouzier, R. *et al.* Nomograms to predict pathologic complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 8331–9 (2005).
116. Haybittle, J. L. *et al.* A PROGNOSTIC INDEX IN PRIMARY BREAST CANCER. *Br J Cancer* **45**, 361–366 (1982).
117. Galea, M. H., Blamey, R. W., Elston, C. E. & Ellis, I. O. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **22**, 207–19 (1992).
118. Chollet, P. *et al.* Is Nottingham prognostic index useful after induction chemotherapy in operable breast cancer? *Br. J. Cancer* **89**, 1185–91 (2003).
119. Chollet, P. *et al.* A New Prognostic Classification After Primary Chemotherapy for Breast Cancer : Residual Disease in Breast. **14**, 1–3 (2008).
120. Amat, S. *et al.* High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **94**, 255–63 (2005).
121. Corben, A. D. *et al.* Pathologic response and long-term follow-up in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy: a comparison between classifications and their practical application. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **137**, 1074–82 (2013).
122. Mombelli, S. *et al.* Prognostic factors in Operable Breast Cancer treated by Neoadjuvant Chemotherapy (NACT): towards a quantification of the residual disease. *Oncology* (2014).
123. Cuzick, J. *et al.* Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **29**, 4273–8 (2011).
124. Haagensen, C. D. & Stout, A. P. Carcinoma Of The Breast II-Criteria Of Operability (Continued). *Ann Surg.* **118**, 1032–1051 (1943).
125. Gunduz, N., Fisher, B. & Saffer, E. a. Effect of surgical removal on the growth and kinetics of residual tumor. *Cancer Res.* **39**, 3861–5 (1979).
126. Fisher, B., Gunduz, N., Coyle, J., Rudock, C. & Saffer, E. Presence of a Growth-stimulating Factor in Serum following Primary Tumor Removal in Mice Presence of a Growth-stimulating Removal in Mice1 Factor in Serum following Primary Tumor. 1996–2001 (2001).
127. Skipper, E. Kinetics of Mammary Tumor Celle Growth and Implications for Therapy. *Cancer* **28**, 1479–99 (1971).
128. Wolmark, N., Wang, J., Mamounas, E., Bryant, J. & Fisher, B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **15212**, 96–102 (2001).
129. Van der Hage, J. A. *et al.* Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J. Clin. Oncol.* **19**, 4224–37 (2001).
130. Wang-Lopez, Q. *et al.* Is it important to adapt neoadjuvant chemotherrapy to the visible clinical response? an open randomized phase II study to compare response-guided versus standard treatment in HER2 negative operable breast cancer. *Oncologist*
131. EBCTCG. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **365**, 1687–717 (2005).

132. Bensouda, Y. *et al.* [Predictive factors of response to anthracyclines neoadjuvant chemotherapy in breast cancer]. *Gynécologie, Obs. Fertil.* **39**, 81–6 (2011).
133. Von Minckwitz, G. *et al.* Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPAR DUO study of the German Breast Group. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2676–85 (2005).
134. Heys, S. D. *et al.* Neoadjuvant Docetaxel in Breast Cancer: 3-Year Survival Results from the Aberdeen Trial. *Clin. Breast Cancer* **3**, S69–S74 (2002).
135. Bear, H. D. *et al.* The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4165–74 (2003).
136. Seidman, A. D. *et al.* Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: final results of Cancer and Leu. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1642–9 (2008).
137. Buzdar, A. U. *et al.* Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 3676–85 (2005).
138. Gianni, L. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER. *Lancet* **375**, 377–84 (2010).
139. Untch, M. *et al.* Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2024–31 (2010).
140. Valachis, A. *et al.* Trastuzumab combined to neoadjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast* **20**, 485–90 (2011).
141. Seidman, A. *et al.* Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1215–21 (2002).
142. Buzdar, A. U. *et al.* Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: an update of the initial randomized study. *Clin. Cancer Res.* **13**, 228–33 (2007).
143. Nahta, R. & O'Regan, R. M. Evolving strategies for overcoming resistance to HER2-directed therapy: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Clin. Breast Cancer* **10 Suppl 3**, S72–8 (2010).
144. Baselga, J. *et al.* Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* **379**, 633–40 (2012).
145. Li, S. G. & Li, L. Targeted therapy in HER2-positive breast cancer. *Biomed. reports* **1**, 499–505 (2013).
146. Coates, A. S. *et al.* Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J. Clin. Oncol.* **25**, 486–92 (2007).
147. Forbes, J. F. *et al.* Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet. Oncol.* **9**, 45–53 (2008).
148. Guarneri, V. *et al.* Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1037–44 (2006).
149. Huober, J. *et al.* Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res. Treat.* **124**, 133–40 (2010).
150. Seo, J. H., Kim, Y. H. & Kim, J. S. Meta-analysis of pre-operative aromatase inhibitor versus tamoxifen in postmenopausal woman with hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **63**, 261–6 (2009).

151. Therasse, P. *et al.* New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment. **92**, (2000).
152. Bogaerts, J. *et al.* Individual patient data analysis to assess modifications to the RECIST criteria. *Eur. J. Cancer* **45**, 248–60 (2009).
153. Von Minckwitz, G. *et al.* Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol.* **30**, 1796–804 (2012).
154. Feldman, L. D. *et al.* Pathological Assessment of Response to Induction Chemotherapy in Breast Cancer Pathological Assessment of Response to Induction Chemotherapy in Breast Cancer 1. 2578–2581 (1986).
155. Viens, P. *et al.* High-dose chemotherapy and haematopoietic stem cell transplantation for inflammatory breast cancer: pathologic response and outcome. *Bone Marrow Transplant.* **21**, 249–54 (1998).
156. Honkoop, A. H. *et al.* Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer. *Br. J. Cancer* **77**, 621–6 (1998).
157. Symmans, W. F. *et al.* Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4414–22 (2007).
158. Penault-Llorca, F. *et al.* Comparison of the prognostic significance of Chevallier and Sataloff's pathologic classifications after neoadjuvant chemotherapy of operable breast cancer. *Hum. Pathol.* **39**, 1221–8 (2008).
159. Chevallier, B., Roche, H., Olivier, J., Chollet, P. & Hurteloup, P. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol* **16**, 223–8 (1993).
160. Sataloff, D. *et al.* Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg* **180**, 297–306 (1995).
161. Vesely, M. D. & Schreiber, R. D. Cancer Immunoediting: antigens, mechanisms and implications to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* **1284**, 1–5 (2014).
162. Matzinger, P. The evolution of the danger theory. **8**, 311–317 (2012).
163. Melichar, B. *et al.* Predictive and prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer treated with neoadjuvant systemic therapy. *Anticancer Res.* **34**, 1115–25 (2014).
164. Burnet, F. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**, 1–27 (1970).
165. Escamilla-Tilch, M. *et al.* The interplay between pathogen-associated and danger-associated molecular patterns: an inflammatory code in cancer? *Immunol Cell Biol* **91**, 601–10 (2013).
166. Gatti, R. A. & Good, R. A. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. *Cancer* **28**, 89–98 (1971).
167. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960–4 (2006).
168. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **22**, 633–640 (2001).
169. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. & Bryceson, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. **115**, 2167–2176 (2010).
170. Maria, A. De, Bozzano, F., Cantoni, C. & Moretta, L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56 dim CD16 + NK cells as rapid producers of abundant IFN-  $\gamma$  on activation. (2011). doi:10.1073/pnas.1012356108/-/DCSupplemental. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1012356108
171. Marcenaro, E., Carlomagno, S., Pesce, S., Moretta, A. & Sivori, S. Bridging innate NK cell functions with adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* **780**, 45–55 (2011).
172. Marcenaro, E. *et al.* NK cells and their receptors during viral infections. *Immunotherapy* **3**, 1075–86 (2011).
173. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–84 (2010).

174. Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K. & Debr, P. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *122*, 2935–2942 (2013).
175. Sivori, S. *et al.* TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front. Immunol.* **5**, 105 (2014).
176. Falco, M., Moretta, L., Moretta, A. & Bottino, C. KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications? *Tissue Antigens* **82**, 363–73 (2013).
177. Braud, V. M. *et al.* HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**, 795–9 (1998).
178. Sutherland, C. L. & Chalupny, N. J. The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. 185–192
179. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* **32**, 593–604 (2010).
180. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–86 (2004).
181. Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 1–8 (2004).
182. Lamagna, C., Aurrand-Lions, M. & Imhof, B. A. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 705–13 (2006).
183. Barry, M. & Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 401–9 (2002).
184. Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R. & Lascurain, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* **6**, 15–25 (2009).
185. Filaci, G., Fenoglio, D. & Indiveri, F. CD8(+) T regulatory/suppressor cells and their relationships with autoreactivity and autoimmunity. *Autoimmunity* **44**, 51–7 (2011).
186. Yannelli, J. R., Sullivan, J. A., Mandell, G. L. & Engelhard, V. H. Reorientation and Fusion of Cytotoxic T Lymphocyte Granules after Interaction with Target Cells as Determined by High Resolution Cinemicrography. (1986).
187. Scaffidi, C. *et al.* Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675–87 (1998).
188. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Pillars Article : Two Types of Murine Helper T Cell Clone . I . Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins . *J. Immunol.*, 1986 , 136 : 2348 – 2357 . (2014).
189. O’Garra, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* **8**, 275–83 (1998).
190. Zhu, J. & Paul, W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* **20**, 4–12 (2010).
191. Reiner, S. L. Development in motion: helper T cells at work. *Cell* **129**, 33–6 (2007).
192. Hsieh, C. *et al.* Pillars Article : Development of T H 1 CD4 + T Cells Through IL-12 Produced by Listeria. (2014).
193. Bui, J. D. & Schreiber, R. D. Cancer immunosurveillance, immunoeediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 203–8 (2007).
194. Le Gros, G., Ben-sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, D. F. & Paul, W. E. Pillars Article : Generation of Interleukin 4 ( IL-4 ) -producing Cells In Vivo and In Vitro : IL-2 and IL-4 Are Required For In Vitro. **4**, (2014).
195. Yang, L. TGFbeta and cancer metastasis: an inflammation link. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 263–71 (2010).
196. Bolpetti, A., Silva, J. S., Villa, L. L. & Lepique, A. P. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunol.* **11**, 27 (2010).
197. Kidd, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* **8**, 223–46 (2003).
198. Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* **6**, 1133–41 (2005).
199. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121–33 (2006).

200. Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D. R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat. Immunol.* **9**, 641–9 (2008).
201. Cochaud, S. *et al.* IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Sci. Rep.* **3**, 3456 (2013).
202. Amedei, A. *et al.* Ex vivo analysis of pancreatic cancer-infiltrating T lymphocytes reveals that ENO-specific Tregs accumulate in tumor tissue and inhibit Th1/Th17 effector cell functions. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 1249–60 (2013).
203. Rao, P. E., Petrone, a. L. & Ponath, P. D. Differentiation and Expansion of T Cells with Regulatory Function from Human Peripheral Lymphocytes by Stimulation in the Presence of TGF- . *J. Immunol.* **174**, 1446–1455 (2005).
204. Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J. & Shevach, E. M. Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- -Mediated Induction of Foxp3+ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* **178**, 4022–4026 (2007).
205. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3015–29 (2009).
206. Wei, S., Kryczek, I. & Zou, W. Review article Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. **108**, 426–431 (2006).
207. Woo, E. Y. *et al.* Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* **61**, 4766–72 (2001).
208. Zamarron, B. F. & Chen, W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 651–8 (2011).
209. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–8 (2006).
210. Kanterman, J., Sade-Feldman, M. & Baniyash, M. New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 307–18 (2012).
211. Umansky, V. & Sevko, A. Overcoming immunosuppression in the melanoma microenvironment induced by chronic inflammation. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 275–82 (2012).
212. He, G. & Karin, M. NF-κB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* **21**, 159–68 (2011).
213. Kim, M.-K., Kim, K., Han, J. Y., Lim, J. M. & Song, Y. S. Modulation of inflammatory signaling pathways by phytochemicals in ovarian cancer. *Genes Nutr.* **6**, 109–15 (2011).
214. Baniyash, M., Sade-Feldman, M. & Kanterman, J. Chronic inflammation and cancer: suppressing the suppressors. *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 11–20 (2014).
215. DuPage, M., Mazumdar, C., Schmidt, L. M., Cheung, A. F. & Jacks, T. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature* **482**, 405–9 (2012).
216. De Haart, S. J. *et al.* Accessory cells of the microenvironment protect multiple myeloma from T-cell cytotoxicity through cell adhesion-mediated immune resistance. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5591–601 (2013).
217. Campoli, M. HLA antigen and NK cell activating ligand expression in malignant cells: a story of loss or acquisition. *Semin Immunopathol.* **33**, 321–334 (2012).
218. Whiteside, T. L. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 67–72 (2014).
219. Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R. & Johansson, C. C. Regulatory T cells in cancer. *Adv. Cancer Res.* **107**, 57–117 (2010).
220. Mantovani, A., Germano, G., Marchesi, F., Locatelli, M. & Biswas, S. K. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2522–5 (2011).
221. Belkaid, Y. & Oldenhove, G. Tuning Microenvironments: Induction of Regulatory T Cells by Dendritic Cells. *Immunity* **29**, 362–371 (2008).
222. Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162–74 (2009).
223. Padua, D. & Massagué, J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res.* **19**, 89–102 (2009).

224. Elkord, E. *et al.* Review T regulatory cells in cancer : recent advances and therapeutic potential. *1573–1586* (2010).
225. Vitale, M., Cantoni, C., Pietra, G., Mingari, M. C. & Moretta, L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1582–92 (2014).
226. Kirkin, V., Joos, S. & Zörnig, M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**, 229–49 (2004).
227. Erb, P. *et al.* Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation. *Immunol. Lett.* **100**, 68–72 (2005).
228. Whiteside, T. L. The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment. *Immunol. Invest.* **36**, 25–46 (2007).
229. Rygiel, T. P., Stolte, E. H., de Ruiter, T., van de Weijer, M. L. & Meyaard, L. Tumor-expressed collagens can modulate immune cell function through the inhibitory collagen receptor LAIR-1. *Mol. Immunol.* **49**, 402–6 (2011).
230. Singh, B. H. & Gulley, J. L. Therapeutic vaccines as a promising treatment modality against prostate cancer: rationale and recent advances. *Ther. Adv. vaccines* **2**, 137–48 (2014).
231. Abès, R., Dutertre, C. & Curie-paris, M. Les anticorps : mieux les connaître pour mieux s ' en servir. (2009).
232. Abes, R., Gelize, E., Fridman, W. H. & Teillaud, J.-L. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood* **116**, 1–4 (2010).
233. Taylor, C. *et al.* Augmented HER-2 specific immunity during treatment with trastuzumab and chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5133–43 (2007).
234. Lewis Phillips, G. D. *et al.* Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* **68**, 9280–90 (2008).
235. Müller, V., Witzel, I. & Stickeler, E. Immunological Approaches in the Treatment of Metastasized Breast Cancer. *Breast Care (Basel).* **4**, 359–366 (2009).
236. Peña, Y., Perera, A. & Batista, J. F. Immunoscintigraphy and radioimmunotherapy in cuba: experiences with labeled monoclonal antibodies for cancer diagnosis and treatment (1993-2013). *MEDICC Rev.* **16**, 55–60 (2014).
237. Sihver, W. *et al.* Radiolabeled Cetuximab Conjugates for EGFR Targeted Cancer Diagnostics and Therapy. *Pharmaceuticals (Basel).* **7**, 311–38 (2014).
238. Fang, L., Barekati, Z., Zhang, B., Liu, Z. & Zhong, X. Targeted therapy in breast cancer: what's new? *Swiss Med. Wkly.* **141**, w13231 (2011).
239. Zitvogel, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 151–60 (2011).
240. Olive, D., Thi, S., Xerri, L., Hirsch, I. & Nunès, J. A. Rôle de CTLA-4 dans la cosignalisation négative du système immunitaire. *médecine/sciences* **27**, 842–9 (2011).
241. Fourcade, J. *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J. Exp. Med.* **207**, 2175–86 (2010).
242. Fourcade, J. *et al.* CD8+ T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* **72**, 887–896 (2012).
243. Derré, L. *et al.* BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8 + T cells that can be partially reversed by vaccination. **120**, 157–167 (2010).
244. Cherfils-vicini, J. *et al.* Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. **120**, 1285–1297 (2010).
245. Gross, J. A., St John, T. & Allison, J. P. The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J. Immunol.* **144**, 3201–10 (1990).
246. Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J. & Allison, J. P. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J. Exp. Med.* **206**, 1717–25 (2009).
247. Wing, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271–5 (2008).

248. Robert, C. *et al.* Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2517–26 (2011).
249. Robert, C. & Mateus, C. anti-CTLA-4 dans le traitement du mélanome métastatique. **8**, (2011).
250. Song, M. *et al.* PTEN loss increases PD-L1 protein expression and affects the correlation between PD-L1 expression and clinical parameters in colorectal cancer. *PLoS One* **8**, e65821 (2013).
251. Hamid, O. *et al.* Safety and Tumor Responses with LAMBROLIZUMAB (Anti-PD-1) in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 134–144 (2013).
252. Wolchok, J. D. *et al.* Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 122–33 (2013).
253. Gulley, J. L., Madan, R. A. & Heery, C. R. Therapeutic vaccines and immunotherapy in castration-resistant prostate cancer: current progress and clinical applications. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 166–170 (2013). doi:10.1200/EdBook\_AM.2013.33.e166
254. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 411–422 (2010).
255. Schwartzentruber, D. J. *et al.* Gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients With Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2119–27 (2011).
256. Ramlau, R. *et al.* A Phase II Study of Tg4010 ( Mva-Muc1-II2 ) in Association with Chemotherapy in Patients with Stage III / IV Non-small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **3**, 735–744 (2008).
257. Kantoff, P. W. *et al.* Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1099–105 (2010).
258. Morales, A., Eidinger, D. & Bruce, A. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* **116**, 180–3 (1976).
259. Negrier, S. *et al.* Recombinant Human Interleukin-2, Recombinant Human Interferon Alfa-2a, or Both in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1272–1278 (1998).
260. Mule, J. J., Shu, S., Schwarz, S. L. & Rosenberg, S. A. Adoptive Immunotherapy of Established Pulmonary Metastases with LAK Cells and Recombinant Interleukin-2. *Science* **225**, 1487–1489 (1984).
261. Rosenberg, S. A., Spiess, P. & Lafreniere, R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* **233**, 1318–21 (1986).
262. Dréno, B. *et al.* Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 539–46 (2002).
263. Takeda, K. *et al.* Combination therapy of established tumors by antibodies targeting immune activating and suppressing molecules. *J. Immunol.* **184**, 5493–501 (2010).
264. Vogt, T. Therapy of metastatic malignant melanoma: on the way to individualized disease control. *Adv Exp Med Biol Exp* **810**, 272–81 (2014).
265. Tang, C. *et al.* Combining Radiation and Immunotherapy: A New Systemic Therapy for Solid Tumors? *Cancer Immunol. Res.* **2**, 831–838 (2014).
266. Huang, K.-W. *et al.* Combining antiangiogenic therapy with immunotherapy exerts better therapeutical effects on large tumors in a woodchuck hepatoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14769–74 (2010).
267. Soliman, H. Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. *Cancer Control* **20**, 17–21 (2013).
268. Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. & Nakae, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* **34**, 149–62 (2011).
269. Gaffen, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat Rev Immunol* **9**, 1–24 (2009).
270. Qian, Y. *et al.* The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Immunol.* **8**, 247–56 (2007).
271. Zou, W. & Restifo, N. P. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 248–56 (2010).

272. Zhang, J.-P. *et al.* Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J. Hepatol.* **50**, 980–9 (2009).
273. Kesselring, R., Thiel, a, Pries, R., Trenkle, T. & Wollenberg, B. Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. *Br. J. Cancer* **103**, 1245–54 (2010).
274. Maruyama, T. *et al.* Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer Sci.* **101**, 1947–54 (2010).
275. Kryczek, I. *et al.* Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* **114**, 1141–9 (2009).
276. Gaffen, S. L. An Overview of IL-17 Function and Signaling. **43**, 402–407 (2009).
277. Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S. & Ishigame, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.* **226**, 57–79 (2008).
278. Fossiez, F. *et al.* T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* **183**, 2593–603 (1996).
279. Acosta-Rodriguez, E. V *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* **8**, 639–46 (2007).
280. Yang, B. *et al.* The role of interleukin 17 in tumour proliferation, angiogenesis, and metastasis. *Mediators Inflamm.* **2014**, 623759 (2014).
281. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485–517 (2009).
282. Murphy, C. a *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **198**, 1951–7 (2003).
283. Hemdan, N. Y. a *et al.* Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **9**, 785–92 (2010).
284. Kortylewski, M. *et al.* Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **15**, 114–23 (2009).
285. Su, X. *et al.* Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J. Immunol.* **184**, 1630–41 (2010).
286. Chen, W.-C. *et al.* Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. *Histopathology* **63**, 225–33 (2013).
287. Straus, D. S. TNF $\alpha$  and IL-17 cooperatively stimulate glucose metabolism and growth factor production in human colorectal cancer cells. *Mol. Cancer* **12**, 78 (2013).
288. Lan, C. *et al.* High density of IL-17-producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Cell Tissue Res.* **352**, 351–9 (2013).
289. Liao, R. *et al.* High expression of IL-17 and IL-17RE associate with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **32**, 3 (2013).
290. Wang, B. *et al.* Mast cells expressing interleukin 17 in the muscularis propria predict a favorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 1575–85 (2013).
291. Li, Q. *et al.* IL-17 promoted metastasis of non-small-cell lung cancer cells. *Immunol. Lett.* **148**, 144–50 (2012).
292. Cui, X. *et al.* Analysis of CD137L and IL-17 expression in tumor tissue as prognostic indicators for glioblastoma. *Int. J. Biol. Sci.* **9**, 134–41 (2013).
293. Muranski, P. & Restifo, N. P. Does IL-17 promote tumor growth? *Blood* **114**, 231–2 (2009).
294. Miao, P., Sheng, S., Sun, X., Liu, J. & Huang, G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* **65**, 904–10 (2013).
295. Huang, C.-K. *et al.* Autocrine/paracrine mechanism of interleukin-17B receptor promotes breast tumorigenesis through NF- $\kappa$ B-mediated antiapoptotic pathway. *Oncogene* **33**, 2968–77 (2014).
296. Mizutani, K. *et al.* The Chemokine CCL2 Increases Prostate Tumor Growth and Bone Metastasis through Macrophage and Osteoclast Recruitment. **11**, 1235–1242 (2009).

297. Saxena, A., Raychaudhuri, S. K. & Raychaudhuri, S. P. Interleukin-17-induced proliferation of fibroblast-like synovial cells is mTOR dependent. *Arthritis Rheum.* **63**, 1465–6 (2011).
298. Jeon, S.-H. *et al.* Mechanisms underlying TGF-beta1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 557–66 (2007).
299. Waugh, D. J. J. & Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6735–41 (2008).
300. Mantovani, A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med* **10**, 369–73 (2010).
301. Numasaki, M. *et al.* IL-17 Enhances the Net Angiogenic Activity and In Vivo Growth of Human Non-Small Cell Lung Cancer in SCID Mice through Promoting CXCR-2-Dependent Angiogenesis. *J. Immunol.* **175**, 6177–6189 (2005).
302. Zhu, X. *et al.* IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* **10**, R95 (2008).
303. Benevides, L. *et al.* Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. *Eur. J. Immunol.* **43**, 1518–28 (2013).
304. Nam, J. *et al.* TGF- $\beta$  subverts the immune system into directly promoting tumor growth through IL-17. *Cancer Res* **68**, 3915–3923 (2008).
305. Lønnberg, A. S., Zachariae, C. & Skov, L. Targeting of interleukin-17 in the treatment of psoriasis. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **7**, 251–9 (2014).
306. Luchtman, D. W., Ellwardt, E., Larochelle, C. & Zipp, F. IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis: Current and future developments. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 403–413 (2014).
307. Geyer, M. & Müller-Ladner, U. Actual status of antiinterleukin-1 therapies in rheumatic diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* **22**, 246–51 (2010).
308. Patel, A. M. & Moreland, L. W. Interleukin-6 inhibition for treatment of rheumatoid arthritis: a review of tocilizumab therapy. *Drug Des. Devel. Ther.* **4**, 263–78 (2010).
309. Funakoshi, T. *et al.* A novel NF- $\kappa$ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice. *J. Crohns. Colitis* **6**, 215–25 (2012).
310. Bai, F. *et al.* Chimeric anti-IL-17 full-length monoclonal antibody is a novel potential candidate for the treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* **33**, 711–21 (2014).
311. Zhang, G. C. *et al.* Axillary lymph node status, adjusted for pathologic complete response in breast and axilla after neoadjuvant chemotherapy, predicts differential disease-free survival in breast cancer. *Curr Oncol* **20**, 180–192 (2013).
312. Mauri, D., Pavlidis, N. & Ioannidis, J. P. a. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 188–94 (2005).
313. Goldhirsch, a *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* **24**, 2206–23 (2013).
314. Bear, H. D. *et al.* The effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4165–74 (2003).
315. Burstein, H. J. Preoperative Therapy With Trastuzumab and Paclitaxel Followed by Sequential Adjuvant Doxorubicin/Cyclophosphamide for HER2 Overexpressing Stage II or III Breast Cancer: A Pilot Study. *J. Clin. Oncol.* **21**, 46–53 (2003).
316. Chavez-MacGregor, M. & Gonzalez-Angulo, A. M. Breast cancer in 2012: New drugs, new knowledge, new targets. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 75–6 (2013).
317. Goldhirsch, a *et al.* Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann. Oncol.* **20**, 1319–29 (2009).
318. Zhang, N., Moran, M. S., Huo, Q., Haffty, B. G. & Yang, Q. The hormonal receptor status in breast cancer can be altered by neoadjuvant chemotherapy: a meta-analysis. *Cancer Invest.* **29**, 594–8 (2011).

319. Kaufmann, M. *et al.* Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **19**, 1508–16 (2012).
320. Zhang, G. C. *et al.* Axillary lymph node status, adjusted for pathologic complete response in breast and axilla after neoadjuvant chemotherapy, predicts differential disease-free survival in breast cancer. *Curr. Oncol.* **20**, e180–92 (2013).
321. Furuta, S. *et al.* IL-25 Causes Apoptosis of IL-25R-Expressing Breast Cancer Cells Without Toxicity to Nonmalignant Cells. *Sci Transl Med* **3**, 1–24 (2011).
322. Mieog, J. S. D., van der Hage, J. a & van de Velde, C. J. H. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Br. J. Surg.* **94**, 1189–200 (2007).
323. Jh, V. D. H., Ccjh, V. D. V. & Sjsd, M. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer ( Review ). (2012).
324. Huber, S., Medl, M., Vesely, M. & Czembirek, H. Ultrasonographic Tissue Characterization in Monitoring Tumor Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Breast Cancer ( Work in Progress ). *J Ultrasound Med* 677–686 (2000).
325. Peintinger, F. *et al.* Accuracy of the combination of mammography and sonography in predicting tumor response in breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Ann. Surg. Oncol.* **13**, 1443–9 (2006).
326. Moskovic, E., Mansi, J., King, D., Murch, C. & Smith, I. Mammography in the assessment of response to medical treatment of large primary breast cancer. *Clin Radiol.* **47**, 339–44 (1993).
327. Londero, V. *et al.* Locally advanced breast cancer: comparison of mammography, sonography and MR imaging in evaluation of residual disease in women receiving neoadjuvant chemotherapy. *Eur. Radiol.* **14**, 1371–9 (2004).
328. Thibault, F. *et al.* MRI for Surgical Planning in. *AJR* 1159–1168 (2004).
329. Rastogi, P. *et al.* Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J. Clin. Oncol.* **26**, 778–85 (2008).
330. Von Minckwitz, G. *et al.* Response-guided neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3623–30 (2013).
331. Smith, I. E. *et al.* Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5108–16 (2005).
332. Untch, M. *et al.* Lapatinib versus trastuzumab in combination with neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy (GeparQuinto, GBG 44): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **13**, 135–44 (2012).
333. Amat, S. *et al.* Scarff-Bloom-Richardson ( SBR ) grading : a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *Int. J. Oncol.* **20**, 791–796 (2002).
334. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
335. Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P. M., Hayes, M. M. & Gelmon, K. a. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet. Oncol.* **11**, 174–83 (2010).
336. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet* **379**, 432–444 (2012).
337. Kaufmann, M. *et al.* Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1940–9 (2006).
338. Chung, A. S. *et al.* An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Med.* **19**, 1114–23 (2013).
339. Maezawa, Y. *et al.* Involvement of TNF Receptor-Associated Factor 6 in IL-25 Receptor Signaling. *J. Immunol.* **176**, 1013–1018 (2006).

340. Yang, X. L., Lin, F. J., Guo, Y. J., Shao, Z. M. & Ou, Z. L. Gemcitabine resistance in breast cancer cells regulated by PI3K / AKT-mediated cellular proliferation exerts negative feedback via the MEK / MAPK and mTOR pathways. *Oncol. Targets. Ther.* 1033–1042 (2014).
341. Beelen, K. *et al.* Phosphorylated p-70S6K predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients randomized between adjuvant tamoxifen versus no systemic treatment. *Breast Cancer Res.* **16**, R6 (2014).
342. Zhao, M. & Ramaswamy, B. Mechanisms and therapeutic advances in the management of endocrine-resistant breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 248–62 (2014).
343. Duong, M. T. *et al.* LMW-E/CDK2 deregulates acinar morphogenesis, induces tumorigenesis, and associates with the activated b-Raf-ERK1/2-mTOR pathway in breast cancer patients. *PLoS Genet.* **8**, e1002538 (2012).
344. Hosford, S. R. & Miller, T. W. Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer : CDK4 / 6 , Src , JAK / STAT , PARP , HDAC , and PI3K / AKT / mTOR pathways. 203–215 (2014).
345. Hueber, W. *et al.* Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci. Transl. Med.* **2**, 52ra72 (2010).
346. Hueber, W. *et al.* Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* **61**, 1693–700 (2012).

## **Cancers du sein et Immunologie anti-tumorale**

Avec environ 49 000 nouvelles femmes touchées chaque année, le cancer du sein est le plus répandu des cancers féminins. Le dépistage du cancer du sein, ainsi que l'amélioration des traitements ont fait diminuer la mortalité mais il reste encore le plus meurtrier des cancers féminins en France.

Le cancer du sein étant une maladie hétérogène, individualiser les traitements des patientes est désormais l'un des objectifs premiers des praticiens. C'est autour de cet objectif commun que se sont articulés les 2 projets de ce travail de thèse.

D'une part, pour l'étude clinique, j'ai établi une base de données sur la stratégie néoadjuvante des cancers du sein opérables, regroupant 318 patientes traitées à l'institut Jean Godinot. Cette base nous permet de comparer nos résultats à ceux de la littérature, de mettre en avant l'intérêt de la chimiothérapie néoadjuvante pour déterminer de nouveaux facteurs pronostics, et de valider l'évaluation des résidus tumoraux dans le sein et les ganglions par l'index RDBN.

D'autre part, l'étude expérimentale nous a permis d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes moléculaires d'échappement tumoral. Nous avons ainsi démontré le rôle pro-tumoral de l'IL-17A mais aussi de l'IL-17E, ces deux cytokines pouvant être présentes dans le microenvironnement tumoral, et mis en évidence leur implication dans la dérégulation du cycle cellulaire à travers la génération des LMW-E et l'acquisition d'un mécanisme de chimiorésistance.

**Mots clés:** cancers du sein, chimiothérapie néoadjuvante, facteurs pronostiques, index RDBN, interleukine-17A, interleukine-17E

---

## **Breast cancers and anti-tumor immunology**

With around 49 000 new affected women each year, breast cancer is the most common of feminine cancers. Breast cancer screening, and treatments improvements make mortality decreased but it stays the most murderous of feminine cancers in France.

Breast cancer being a heterogeneous disease, individualizing patients' treatments is now one of first goals of practitioner. It is around of this common aim that my 2 thesis projects are turned on.

On the one side, for clinical study, I designed a database on the neoadjuvant strategy of operable breast cancers, assembling 318 patients treated at Jean Godinot institute. This database allow us to compare our results with literature ones, to highlight the interest of neoadjuvant chemotherapy to determine new prognostic factors, and to validate evaluation of residual disease in breast and nodes by RDBN index.

On the other side experimental study allowed us to improve our knowledge on molecular mechanisms of tumor escape. We demonstrated pro-tumoral role of IL-17A but also of IL-17E, these two cytokines can be presents in tumoral microenvironment, and evidenced their implication in cell cycle dysregulation through generation of LMW-E and acquisition of chemoristance mechanisms.

**Key words:** breast cancers, neoadjuvant chemotherapy, prognostic factors, RDBN index, interleukin-17A, interleukin-17E

---