



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2020

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Analyse translationnelle d'une cohorte de cancer du sein *de novo*
oligométastatique**

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre à 18h
Au Pôle Formation
Par Sebastian CHRETIEN

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Nicolas PENEL

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Éric LARTIGAU

Monsieur le Professeur Laurent MORTIER

Madame le Docteur Laurence BUISSERET

Directeur de thèse :

Madame le Docteur Laurence BUISSERET

**Travail du Laboratoire de Recherche Translationnelle en
Cancérologie Mammaire J.-C. Heuson dirigé par Monsieur le
Professeur SOTIRIOU**

AVERTISSEMENT

« La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs. »

Table des matières

Résumé	6
Introduction	8
Cancer du sein : généralités	8
Cancer du sein <i>de novo</i> oligométastatique	11
Définition et données de la littérature.....	11
Prise en charge thérapeutique	12
Concept de maladie oligométastatique et hypothèses de physiopathologie.....	13
Environnement immunitaire et cancer du sein	15
Rôle du système immunitaire dans le cancer du sein	15
Méthodes pour évaluer l'infiltrat immunitaire.....	17
Problématique et Objectifs	18
Matériel et Méthodes	19
Patientes et échantillons	19
Cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein <i>de novo</i> oligométastatique	19
Cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein <i>de novo</i> polymétastatique	20
Revue des données cliniques, anatomopathologiques et biologiques	21
Quantification de l'infiltrat lymphocytaire tumoral (TILs)	21
Immunophénotypage de l'infiltrat immunitaire par Immunohistochimie multiplex multispectrale séquentielle (IHCm)	23
Méthode de coloration par Immunohistochimie multiplex multispectrale séquentielle.....	24
Acquisition des images	25
Analyse des images	26
Analyses statistiques	27
Résultats	29
Cancer du sein <i>de novo</i> oligométastatique et <i>de novo</i> polymétastatique : comparaison	29
Données cliniques, anatomopathologiques et biologiques au diagnostic.....	29
Stratégies thérapeutiques	31
Données de survie sans progression et survie globale	33
Tumeur primitive <i>de novo</i> oligométastatique : infiltrat immunitaire	34
Quantification des TILs	34
Immunophénotypage de l'infiltrat immunitaire.....	36
Cancer du sein <i>de novo</i> oligométastatique : facteurs pronostiques.....	39
Facteurs cliniques, anatomopathologiques et biologiques.....	40
Impact de la prise en charge thérapeutique	41
Impact de l'infiltrat immunitaire des tumeurs primitives	45

Facteurs pronostiques en analyse multivariée.....	49
Discussion	40
Cancer du sein <i>de novo</i> oligométastatique : une entité à part entière ?.....	51
Infiltrat immunitaire dans le cancer du sein <i>de novo</i> oligométastatique : un acteur clé ?.....	55
Conclusion et perspectives	58
Références	59
Annexe 1. Tableaux et Figures	65
Annexe 2 : Mise au point de la technique d'Immunohistochimie multiplex multispectrale	68
Annexe 3. Protocole d'Immunohistochimie multiplex multispectrale sur tissu mammaire	69

Résumé

Analyse Translationnelle d'une cohorte de cancer du sein *de novo* oligométastatique

Contexte

Le cancer du sein *de novo* oligométastatique (OM), défini par la présence de ≤ 5 lésions métastatiques au diagnostic, est une présentation rare de la maladie. Peu d'études se sont intéressées à cette présentation clinique et leurs résultats sont biaisés par une sélection des patientes et une définition variable de la maladie OM. Le système immunitaire pourrait jouer un rôle dans la présentation et le devenir de ces patientes.

Méthodes

Cette étude rétrospective a inclus 115 patientes présentant un cancer du sein *de novo* OM et 117 patientes *de novo* polymétastatique (PM) traitées entre 2000 et 2016 au Centre Oscar Lambret et à l'Institut Jules Bordet. Les caractéristiques d'intérêt au diagnostic ainsi que les stratégies thérapeutiques et les données de survie ont été collectées. L'infiltrat immun des tumeurs primitives *de novo* OM a été évalué par quantification des TILs (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, n=54/115) et caractérisé par immunohistochimie multiplex multispectrale (IHCm, n=31/115) permettant l'identification des lymphocytes T CD4+, CD8+ et FoxP3+, B CD20+ et des macrophages CD68+.

Résultats

Les patientes *de novo* OM ont une meilleure survie sans progression et globale, respectivement 23.9 et 54.9 mois, par rapport aux patientes *de novo* PM. Leur présentation se différencie principalement par des taux plus faibles de LDH et CA 15-3 ainsi que par une infiltration moins importante de différents sites métastatiques. Les tumeurs primitives *de novo* OM ont une infiltration médiane par des TILs de 5%, avec

50% des tumeurs sans aucune infiltration. L'analyse par IHCm montre une infiltration possible par tous les sous-types de cellules immunes, avec une prédominance pour les lymphocytes T CD4+/CD8+ et les macrophages CD68+ (médianes de 8, 4 et 5% respectivement). Seuls les lymphocytes T CD8+ et FoxP3+ sont associés à une meilleure survie en analyse univariée, tandis que les lymphocytes B CD20+ intra-tumoraux sont corrélés à une moins bonne SSP. En analyse multivariée, un grade 3 est associé à une moins bonne survie tandis que la chirurgie mammaire et l'utilisation de polychimiothérapie sont associés à une meilleure survie.

Conclusion

Notre travail suggère que le cancer du sein *de novo* OM est une entité particulière au pronostic plus favorable. Il souligne l'importance d'une stratégie thérapeutique plus « agressive » chez les patientes en état de le supporter. La composition de l'infiltrat lymphocytaire semble jouer un rôle dans le devenir de ces patientes.

Introduction

Cancer du sein : généralités

Le cancer du sein, avec plus de 2 millions de cas/an dans le monde, représente le 1^{er} cancer chez la femme (près de 1 femme sur 8) (1). Son incidence, qui peut varier d'un facteur 10 en fonction des régions du monde, est plus importante dans les pays dits « développés » où elle a atteint un plateau depuis les années 2000 après une forte augmentation dans les années 80 et 90, en lien principalement avec la mise en place du dépistage organisé (2). La mortalité par cancer du sein représente la 1^{ère} cause de décès par cancer chez la femme dans le monde avec 626,679 décès en 2018. Celle-ci est en diminution dans les pays dits « développés » depuis les années 90, notamment par l'amélioration des traitements et la mise en place du dépistage organisé, alors qu'elle continue d'augmenter dans certaines régions du monde (2).

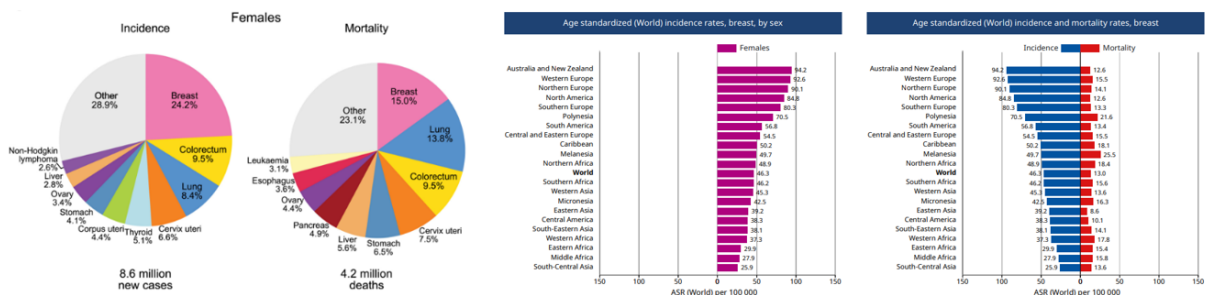


Figure 1. Incidence et mortalité du cancer du sein dans le monde et par pays (extrait de Bray et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov (1))

Plusieurs sous-types de cancer du sein ont été décrits et différentes classifications sont actuellement disponibles. On distingue classiquement 4 sous-types identifiés sur base de critères anatomopathologiques permettant une bonne corrélation avec les classifications moléculaires basées sur l'expression des gènes de la tumeur (3):

- LUMINAL A : exprimant les récepteurs hormonaux (RH+, récepteurs aux œstrogènes et/ou la progestérone), HER2 négatif (HER2-), bas grade/Ki67 < 20%

- LUMINAL B :
 - o RH+, HER2-, haut grade/Ki67 \geq 20%
 - o RH+, HER2 surexprimé ou amplifié (HER2+), peu importe le grade et le Ki67
- HER2-ENRICHED : n'exprimant pas les récepteurs hormonaux (RH-), HER2+
- BASAL-LIKE ou triple négatif (Triple Negative Breast Cancer, TNBC) : RH- et HER2-

Des données récentes indiquent qu'en France, 66.8% des tumeurs sont RH+/HER2- (LUMINAL A et B/HER2-), 6.3% sont RH+/HER2+ (LUMINAL B/HER2+), 3.7% sont RH-/HER2+ (HER2-ENRICHED) et 9.2% sont RH-/HER2- (TNBC), ce qui correspond également aux données retrouvées dans les registres américains et norvégiens (4–6).

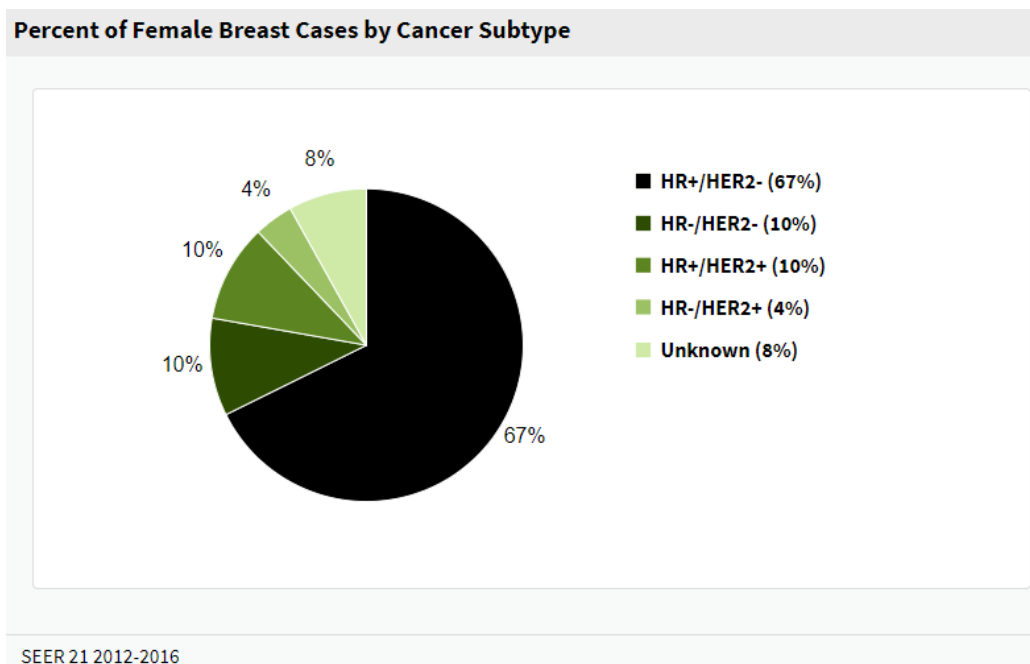


Figure 2. Distribution des sous-types de cancer du sein (SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013)

La mortalité par cancer du sein est principalement liée à la dissémination métastatique de la maladie, faisant chuter la survie globale à 5 ans de 89.7% tous stades confondus à 27% pour le stade métastatique (5). Le sous-type de cancer du sein influence fortement la survie des patientes pour tous les stades au diagnostic. Ainsi, pour les patientes métastatiques au diagnostic, on peut observer que le taux de survie globale à 5 ans chute de 41.8% pour les cancers RH+/HER2+ à 11.2% pour les cancers RH-/HER2- (5,7). De façon intéressante, on peut également noter que le sous-type RH+/HER2+ présente un meilleur pronostic que le sous-type RH+/HER2- au stade métastatique, à l'inverse du stade localisé.

5-Year Relative Survival Percent, Female Breast Subtypes by SEER Summary Stage 2000

Subtype	Localized	Regional	Distant
HR+/HER2-	100.0%	89.7%	29.8%
HR-/HER2-	91.0%	64.9%	11.2%
HR+/HER2+	98.3%	89.0%	41.8%
HR-/HER2+	95.8%	81.6%	36.3%
Unknown	95.6%	77.1%	15.3%
Total	98.8%	85.5%	27.3%

SEER 18 2010-2015

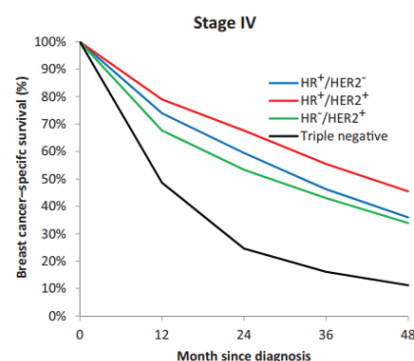


Figure 3. Survie globale selon le sous-type et le stade de cancer du sein (SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013)

Différents paramètres influencent la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein, appelés facteurs pronostiques. Comme décrit dans le Tableau 1, à l'exception de l'expression des récepteurs hormonaux et de HER2, les facteurs validés diffèrent en fonction du stade de la maladie.

Tableau 1. Facteurs pronostiques validés pour le cancer du sein en fonction du stade.

Facteurs pronostiques validés	Stades I à III	Stade IV
Utilisés en pratique courante (Influençant la prise en charge thérapeutique)	<p>Age < 35 ans (principalement pour les cancers RH+, effet pronostique non démontré pour les cancers HER2+ (8). A noter que les études récentes retrouvent une diminution de l'effet pronostique de l'âge par rapport aux études antérieures, témoignant probablement de l'évolution des traitements adjuvants (9))</p> <p>Taille tumorale (10)</p> <p>Atteinte ganglionnaire axillaire (10,11) (macro et micrométastases)</p> <p>Type histologique (tubulaire, mucineux et médullaire : meilleure survie)</p> <p>Grade tumoral (11)</p> <p>Envahissement vasculaire et péri-nerveux (12)</p> <p>Expression des récepteurs aux œstrogènes (meilleure survie dans les 5 ans suivant le diagnostic (13), effet pronostique moins certain voire péjoratif à long terme (14))</p> <p>Expression des récepteurs à la progestérone (moins bonne survie en cas d'absence d'expression, même en cas d'expression des récepteurs aux œstrogènes (15))</p> <p>Surexpression/amplification HER2 (moins bonne survie pour les patientes avec (16), et sans envahissement ganglionnaire (17))</p> <p>Marqueurs de prolifération : index mitotique, Ki67 (18)</p> <p>Profil génomique (19) (LUMINAL A meilleur pronostic ; LUMINAL B et HER2-ENRICHED pronostic intermédiaire ; basal-like moins bon pronostic)</p> <p>Signatures génomiques (L'ensemble des signatures sont pronostiques de récurrence et peuvent guider la thérapeutique adjuvante mais seul « Oncotype Dx » a démontré un bénéfice en terme de survie pour les patientes ≤ 50 ans avec un cancer RH+HER2- pT1b-T3N0 et un « Recurrence Score » > 16 lorsqu'une chimiothérapie adjuvante était proposée (20))</p>	<p>Perte de poids > 5% (21)</p> <p>Performans Status > 2 (21)</p> <p>Expression des récepteurs hormonaux (22) (meilleure survie, en particulier en cas de double positivité des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone)</p> <p>Surexpression/amplification HER2 (23) (moins bonne survie avant l'utilisation de traitements anti-HER2)</p> <p>Sites métastatiques (21,24,25)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Atteinte de la paroi thoracique, osseuse ou ganglionnaire : meilleure SSP - Atteinte hépatique ou pulmonaire : moins bonne SSP et SG
Non utilisés en pratique courante (N'influençant pas la prise en charge thérapeutique)	<p>Tabagisme (26)</p> <p>Ethnicité (5) (afro-américaines et hispaniques : moins bonne survie)</p> <p>Marqueurs de prolifération : fraction de phase-S, « proliferating-cell nuclear antigen » (18)</p> <p>Cellules tumorales circulantes (CTCs) (27) (≥ 1 CTCs : moins bonne survie)</p> <p>Activateur du plasminogène type-urokinase (uPA) et inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) (rapport uPA/PAI-1 bas : meilleure survie chez les patientes sans envahissement ganglionnaire) (28)</p>	<p>Taux de LDH > normale (21)</p> <p>Présence de CTCs (29)</p> <p>ADN tumoral circulant (30) (taux > médiane après 2 semaines de traitement par FULVESTRANT – PALBOCICLIB : moins bonne SSP)</p> <p>Profil génomique et signatures génomiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - PAM50 : LUMINAL A → meilleure SSP et SG (31) - Oncotype Dx : association du score de récurrence avec le temps jusqu'à progression et la SG chez les patientes RH+/HER2- (32) <p>Facteurs pronostiques incertains : la valeur pronostique du nombre de lésions et de sites métastatiques ainsi que d'un âge > 50 ans diffèrent selon les études</p>

Cancer du sein de novo oligométastatique

Définition et données de la littérature

Les différents sous-types de cancer du sein précédemment décrits sont le plus souvent diagnostiqués à un stade localisé et, bien qu'ayant une évolution clinique différente, ont tous le potentiel pour entraîner la formation de métastases. Dans les pays dits « développés », environ 6 à 10% des patientes présentent un cancer du sein d'emblée métastatique au diagnostic, appelé *de novo* métastatique et à différencier de la récurrence métastatique. Des données rétrospectives indiquent que les présentations *de novo* métastatiques sont de meilleur pronostic que les récurrences métastatiques. Ceci pourrait s'expliquer par une maladie moins agressive notamment par absence de sélection de clones résistants aux traitements antérieurs dans le cas d'une récurrence

métastatique (33). Environ 20% des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique présentent une dissémination limitée avec peu de métastases, appelée maladie *oligométastatique* (OM), dont l'incidence est en augmentation notamment par l'amélioration en termes de sensibilité des examens d'imagerie (34). L'ESMO (*European Society for Medical Oncology*) définit le cancer du sein OM par une atteinte limitée à 5 métastases dans un ou plusieurs organes et souligne qu'il s'agit d'une maladie de meilleur pronostic, avec plus de chances d'atteindre une rémission complète et une survie prolongée (35). En effet, les données de la littérature rapportent une SG médiane pouvant atteindre 185 mois, avec certaines patientes ne récidivant/progressant pas durant un suivi prolongé (36). Cependant, il est important de noter que la plupart des données de survie sont issues de patientes sélectionnées dans des études rétrospectives, avec une définition de la maladie OM variable, un caractère *de novo*/récidivant non toujours précisé et des traitements hétérogènes.

Prise en charge thérapeutique

Le diagnostic de cancer du sein *de novo* OM représente une situation clinique délicate pour les praticiens car il n'existe pas de recommandation de prise en charge précise. Celle-ci peut donc varier d'un traitement systémique exclusif à un traitement multimodal incluant un traitement systémique, un traitement local de la tumeur primitive et éventuellement un traitement ciblé sur les métastases. L'absence de recommandation est liée au fait qu'il n'existe pas d'étude prospective ayant comparé ces deux modalités de prise en charge. De plus, il est aujourd'hui difficile de prédire le devenir de ces patientes, certaines évoluant rapidement vers une maladie polymétastatique (PM) alors que d'autres présentent une maladie plus indolente. L'évolution clinique variable de la maladie suggère qu'il s'agit en réalité de deux entités distinctes, avec une maladie OM vraie et une maladie diagnostiquée à un stade

précoce de la dissémination PM. Il existe donc un réel intérêt à pouvoir distinguer ces patientes afin d'adapter la prise en charge thérapeutique : maintien de la qualité de vie chez les patientes atteintes d'une maladie agressive en cours de dissémination PM versus « curative » chez les patientes atteintes d'une maladie OM vraie, plus indolente. L'adaptation « personnalisée » de la stratégie thérapeutique nécessite l'identification de facteurs pronostiques spécifiques à cette catégorie de patientes. Si quelques études ont permis de mettre en évidence certains facteurs pronostiques dans le cancer du sein OM, il est important de noter qu'aucune étude ne s'est spécifiquement intéressée au stade *de novo* OM. De plus, ces études incluaient des patientes souvent sélectionnées, avec une définition de maladie OM variable.

Les facteurs identifiés après analyse multivariée dans des études ayant inclus des patientes correspondant à la définition actuelle d'une maladie *de novo* OM selon l'ESMO sont (Annexe 1, Tableau 1) :

- L'atteinte uniquement osseuse (meilleure SG) (37)
- La taille des lésions métastatiques hépatiques traitées par radiofréquence < 2.5cm (meilleure SG) (38)
- La chirurgie R0 des métastases pulmonaires (meilleure SG) (39)
- Le phénotype TNBC (moins bonne survie sans maladie) (40)
- La taille des lésions métastatiques traitées par ablation thermique percutanée > 4cm (moins bonne survie sans maladie) (40)

Concept de maladie oligométastatique et hypothèses de physiopathologie

Le concept de maladie OM a été proposé en 1995 par Hellman et Weichselbaum comme un stade intermédiaire dans le processus métastatique, pour lequel la tumeur n'aurait pas encore acquis tout son potentiel de dissémination (41). Il représenterait donc une étape transitoire entre une maladie localisée et une maladie disséminée.

Dès 1889, S. Paget observe que le processus métastatique n'est pas un phénomène aléatoire lié à la simple présence de cellules tumorales circulantes mais qu'il résulte d'un véritable « dialogue » entre certaines cellules tumorales sélectionnées (« seeds ») et un microenvironnement réceptif (« soil ») et propose alors la théorie de « seed and soil » (42). De nombreuses études pré-cliniques ont depuis validé ce concept et permis de mieux comprendre le processus métastatique ainsi que l'interaction complexe entre les cellules métastatiques et le micro-environnement de l'organe colonisé (43). Il est désormais démontré que l'acquisition des propriétés métastatiques est un processus dynamique en plusieurs étapes appelé « cascade métastatique », correspondant à différents processus biologiques gouvernés par l'acquisition progressive d'anomalies génétiques (44). Ainsi, les cellules tumorales ayant acquis un phénotype plus agressif vont être capables d'atteindre la circulation systémique et devenir des cellules tumorales circulantes. Il leur faudra ensuite survivre et s'adapter à ce nouvel environnement avant d'atteindre un nouvel organe et le remodeler afin d'aboutir à la formation d'un nouveau site métastatique. Ce processus métastatique est peu efficace, avec environ 0.01% des cellules circulantes qui parviendront effectivement à former des métastases (45). Il est donc tout à fait concevable qu'un « défaut » d'acquisition d'une de ces étapes aboutisse à un potentiel métastatique limité expliquant la présentation OM de la maladie. Une autre hypothèse met en avant le rôle potentiel du système immunitaire dans la physiopathologie de la maladie OM.

Environnement immun et cancer du sein

Rôle du système immunitaire dans le cancer du sein

L'interaction entre la tumeur et le système immunitaire a été conceptualisée par la théorie d' « *immunoediting* » proposant 3 phases (46):

- Phase d'élimination dans laquelle le système immunitaire détruit les cellules tumorales (appelée « *immunosurveillance* »)
- Phase d'équilibre dans laquelle le système immunitaire continue de détruire les cellules tumorales mais sélectionne des cellules résistantes aboutissant à un état d'équilibre entre destruction et croissance tumorale (appelée « *immunoselection* »)
- Phase d'échappement dans laquelle les cellules ayant échappé au système immunitaire prolifèrent et dépassent ses capacités de destruction (appelée « *immunosubversion* »)

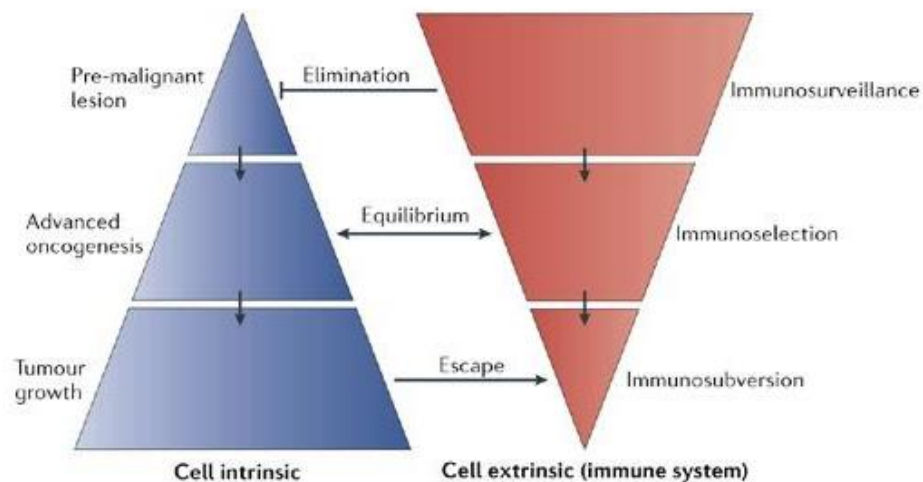


Figure 4. Effets du système immunitaire sur la progression tumorale (extrait de Zitvogel L. et al. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. Nat Rev Immunol. 2006 Oct (47))

Même si la présence de métastases témoigne d'un échappement au système immunitaire, ce dernier continue de jouer un rôle dans l'évolution et le pronostic de la maladie. En témoigne le succès de l'immunothérapie par inhibiteurs de points de contrôle qui vise à réactiver le système immunitaire des patients et qui a révolutionné le pronostic de nombreux cancers ces dernières années, avec récemment une indication en 1^{ère} ligne métastatique pour le cancer du sein triple-négatif (48). Un autre argument en faveur du rôle constant du système immunitaire est l'association entre la présence d'un taux élevé d'infiltrat lymphocytaire (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs) au niveau de la tumeur mammaire primitive ou des métastases et un meilleur devenir en termes de survie ou de réponse thérapeutique (49). L'activité persistante du système immunitaire pourrait ainsi expliquer un certain contrôle de la maladie empêchant l'évolution vers un stade PM (50). Outre le taux de TILs, la composition de cet infiltrat joue également un rôle important dans l'évolution du cancer du sein. En effet, les TILs sont composés à la fois de cellules pro-inflammatoires orientées vers un contrôle de la progression tumorale et de cellules immunosuppressives favorisant l'échappement tumoral à l'immunosurveillance (Annexe 1, Figure 1). Les données de la littérature indiquent que le cancer du sein peut être infiltré par l'ensemble de ces sous-types cellulaires. En effet, plusieurs études se sont intéressées au rôle de la composition de l'infiltrat immunitaire dans le cancer du sein localisé (revue par *Pruneri et al.* (49)) et quelques-unes rapportent des données pour le cancer du sein métastatique (51–53), mais à notre connaissance aucune ne s'est intéressée spécifiquement au cancer du sein *de novo* OM.

Méthodes pour évaluer l'infiltrat immun

Outre l'utilisation de signatures immunes, actuellement du domaine de la recherche et ayant montré une valeur pronostique dans le cancer du sein, plusieurs méthodes permettent d'évaluer l'infiltrat immun sans recours à un plateau de biologie moléculaire (54,55). Les cellules immunes peuvent être évaluées de façon morphologique et quantitative sur les colorations standards H&E (Hématoxyline et Eosine) (56). Néanmoins, l'analyse sur lames H&E ne permet pas de distinguer les différentes sous-populations de cellules immunes. Les deux principales techniques pour étudier l'expression de protéines *in situ* correspondent à l'immunohistochimie (IHC) et à la cytométrie de flux. Cette dernière permet une analyse quantitative multi-paramétrique à très haut débit de cellules isolées (> 10000 cellules / seconde). Dans le cadre de l'étude des TILs, elle permet donc de renseigner de manière précise sur la composition de l'infiltrat lymphocytaire mais nécessite une dissociation des tissus ne rendant pas compte de l'architecture tissulaire, des interactions cellulaires ou encore de l'hétérogénéité tumorale.

L'IHC est une technique permettant de visualiser directement sur une coupe histologique l'expression de la protéine marquée, sans perte de l'architecture tissulaire. Classiquement, l'IHC utilise des anticorps marqués par un chromogène ou un fluorophore et reste limitée à l'étude d'un ou deux marqueurs par coupe. L'étude de plusieurs marqueurs sur une même coupe tissulaire porte le nom d'IHC multiplex et permet de maximiser l'information disponible tout en économisant du matériel tumoral et en maintenant l'architecture tumorale intacte. C'est donc un outil puissant et particulièrement intéressant pour la caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire. L'IHC multiplex multispectrale (IHCm), correspondant à de l'IHC séquentielle avec des

signaux fluorescents amplifiés grâce au Tyramide, représente un choix idéal pour la caractérisation phénotypique de l'infiltrat immun dans le cancer du sein.

Problématique et Objectifs

Peut-on guérir le cancer du sein métastatique ? Il s'agit d'une question actuellement débattue (57). Dans cette optique, le cancer du sein *de novo* OM représente probablement l'entité idéale pour un traitement à visée « curative ». Les données de la littérature concernant cette présentation clinique sont biaisées par l'inclusion de patientes sélectionnées pour des traitements spécifiques et par une définition variable de la maladie *de novo* OM. Nous rapportons les données de l'analyse translationnelle de patientes *de novo* OM non sélectionnées, représentant les patientes de « la vie réelle ».

Les objectifs de ce travail sont :

- Comparaison des données cliniques, anatomopathologiques et biologiques au diagnostic ainsi que la prise en charge et la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein *de novo* OM et *de novo* PM
- Evaluation de l'infiltrat immun au niveau des tumeurs primitives au diagnostic des patientes atteintes d'un cancer du sein *de novo* OM
- Identification de facteurs associés à la survie sans progression et à la survie globale parmi les données cliniques, anatomopathologiques et biologiques au diagnostic ainsi que les données de prise en charge et d'infiltrat immun chez les patientes atteintes d'un cancer du sein *de novo* OM

Matériel et Méthodes

Patientes et échantillons

Cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein *de novo* oligométastatique

Cette étude rétrospective a été réalisée au Centre Oscar Lambret de Lille et à l'Institut Jules Bordet de Bruxelles. Les départements d'information médicale de ces deux hôpitaux ont identifié 1435 patientes prises en charge entre 2000 et 2016 pour la 1^{ère} fois pour un cancer du sein avec diagnostic de métastase dans les 6 mois suivant le diagnostic de cancer du sein. Après revue manuelle des dossiers informatiques et papiers, l'ensemble des patientes répondant aux critères d'inclusion et d'exclusion ont été incluses dans l'étude et l'ensemble des échantillons de tumeur primitive et de lésions métastatiques disponibles ont été collectés. Le diagramme de flux est présenté en Annexe 1 (Figure 2).

Les patientes devaient respecter l'ensemble des critères d'inclusion suivants :

- Diagnostic histologique de cancer du sein entre janvier 2000 et décembre 2016
- ≤ 5 lésions métastatiques viscérales et/ou osseuses et/ou ganglionnaires à l'exception d'adénopathies axillaires et/ou sus-claviculaires homolatérales (cancer oligométastatique)
- Diagnostic des métastases ≤ 3 mois après le diagnostic de cancer du sein (cancer *de novo* métastatique)
- Prise en charge thérapeutique dans l'un des deux centres jusqu'à 1^{ère} progression locale ou à distance
- Age > 18 ans

Les patientes étaient exclues de l'étude en présence d'un des critères suivants :

- > 5 lésions métastatiques (cancer polymétastatique)
- Diagnostic des métastases > 3 mois après le diagnostic de cancer du sein (cancer non *de novo* métastatique)
- < 18 ans
- Présence d'un antécédent de cancer (à l'exception d'un carcinome basocellulaire)
- Opposition à l'utilisation des données
- Prise en charge thérapeutique avant 1^{ère} progression dans un autre centre

Cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein *de novo* polymétastatique

Le département d'information médicale de l'Institut Jules Bordet a identifié 518 patientes prises en charge à l'Institut entre 2000 et 2016 pour la 1^{ère} fois pour un cancer du sein avec diagnostic de métastase dans les 6 mois suivant le diagnostic de cancer du sein. Après revue manuelle des dossiers informatiques et papiers, 117 patientes correspondant aux critères d'inclusion et d'exclusion ont été incluses. Le diagramme de flux est présenté en Annexe 1 (Figure 3)

Les patientes devaient respecter l'ensemble des critères d'inclusion suivants :

- Diagnostic histologique de cancer du sein entre janvier 2000 et décembre 2016
- > 5 lésions métastatiques viscérales et/ou osseuses et/ou ganglionnaires, à l'exception d'adénopathies axillaires et/ou sus-claviculaires homolatérales (cancer polymétastatique)

- Diagnostic des métastases \leq 3 mois après le diagnostic de cancer du sein (cancer *de novo* métastatique)
- Prise en charge thérapeutique à l'Institut Jules Bordet jusqu'à 1^{ère} progression locale ou à distance
- Age > 18 ans

Les patientes étaient exclues de l'étude en présence d'un des critères suivants :

- \leq 5 lésions métastatiques (cancer oligométastatique)
- Diagnostic des métastases > 3 mois après le diagnostic de cancer du sein (cancer du sein non *de novo* métastatique)
- < 18 ans
- Présence d'un antécédent de cancer (à l'exception d'un carcinome baso-cellulaire)
- Opposition à l'utilisation des données
- Prise en charge thérapeutique avant 1^{ère} progression dans un autre centre

[Revue des données cliniques, anatomopathologiques et biologiques](#)

Les dossiers cliniques de l'ensemble des patientes incluses dans notre étude ont été revus et les paramètres cliniques, anatomopathologiques et biologiques d'intérêt au diagnostic, les traitements administrés ainsi que les données de survie ont été recueillis.

[Quantification de l'infiltrat lymphocytaire tumoral \(TILs\)](#)

La présence de lymphocytes au niveau des lésions tumorales, ou TILs, a été évaluée et quantifiée par un pathologiste sur lames colorées par H&E selon les recommandations de l' « *International Immuno-Oncology Biomarker Working Group* »

au niveau des tumeurs primitives (n = 54) et des métastases correspondantes au diagnostic (n = 4) des patientes *de novo* OM (56). Le pathologiste a distingué les TILs intra-tumoraux (iTILs) et stromaux (sTILs) en fonction de leur localisation par rapport aux cellules tumorales. Les résultats sont indiqués en pourcentages de surface de tissu tumoral ou stromal infiltré par les TILs. Les tumeurs ont été ensuite classées en fonction de la localisation de cet infiltrat lymphocytaire en 4 groupes (58):

- Tumeur « cold » : absence de TILs infiltrant la tumeur dans sa partie épithéliale et stromale
- Tumeur « margin-restricted » : absence de TILs infiltrant la tumeur dans sa partie épithéliale, présence de TILs en bordure de la tumeur uniquement, dans sa partie stromale (250µm à l'intérieur et l'extérieur de la marge tumorale)
- Tumeur « stroma-restricted » : absence de TILs infiltrant la tumeur dans sa partie épithéliale, présence de TILs infiltrant la tumeur dans sa partie stromale
- Tumeur « fully inflamed » : présence de TILs infiltrant la tumeur dans ses parties épithéliale et stromale

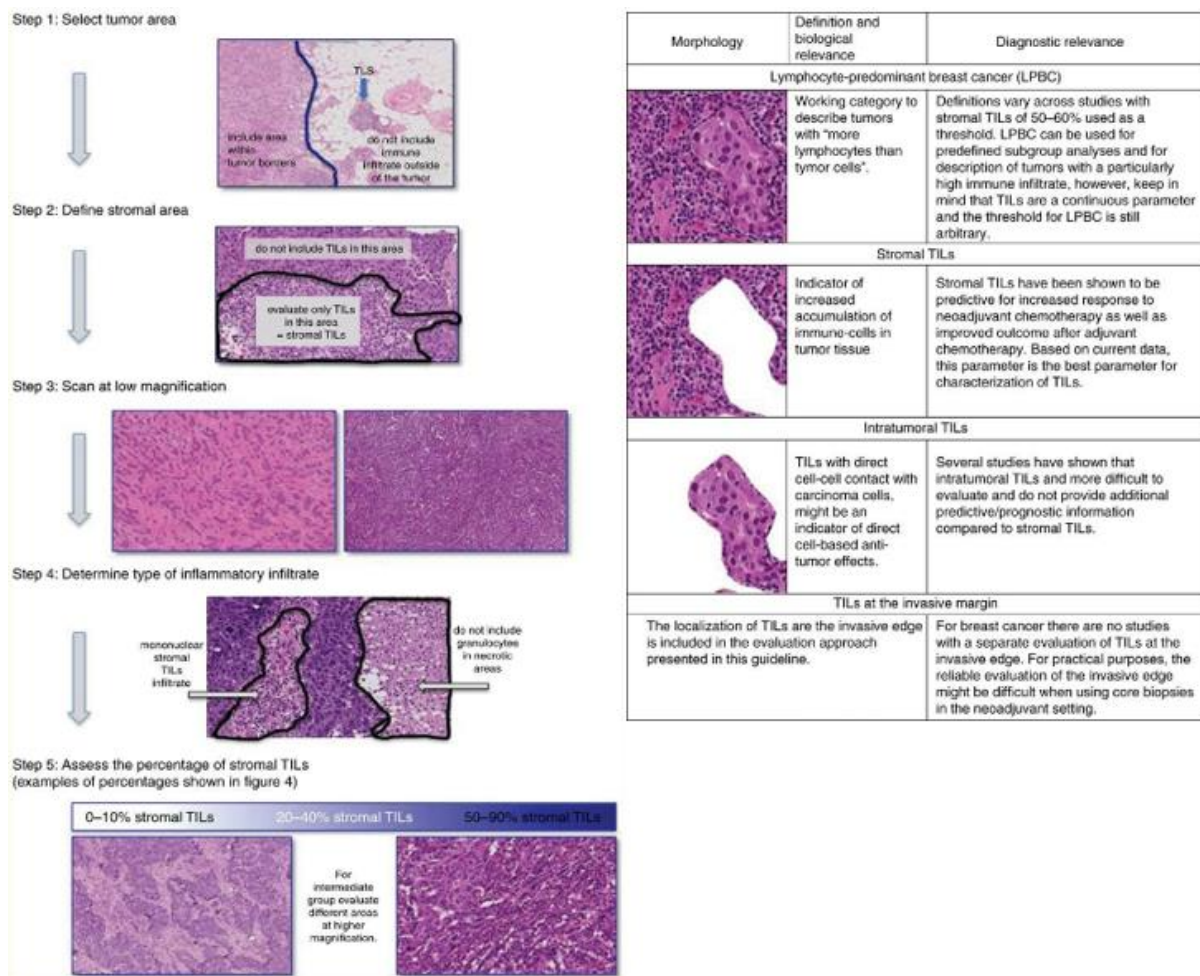


Figure 5. Recommendations internationales pour l'évaluation des TILs (extrait de Salgado et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Ann. Oncol. 2015, (56))

Immunophénotypage de l'infiltrat immun par Immunohistochimie multiplex multispectrale séquentielle (IHCm)

L'IHCm permet de détecter sur une même coupe de tissu plusieurs cibles d'intérêt par fixation séquentielle de fluorophores (OPALs). Un fluorophore correspond à une substance chimique activée par une lumière de longueur d'onde spécifique (spectre d'excitation) et émettant une lumière appelée fluorescence à une longueur d'onde plus grande, également spécifique (spectre d'émission).

Brièvement, la cible d'intérêt est reconnue par un anticorps primaire spécifique sur lequel vient ensuite se fixer un anticorps secondaire aspécifique couplé à de l'HRP

(HorseRadish Peroxydase). Cette dernière va pouvoir, en présence d'H₂O₂, activer le Tyramide inactif couplé au fluorophore ce qui entraîne une amplification du signal fluorescent et sa fixation par liaison covalente sur les résidus tyrosine à proximité de l'épitope. Le couple anticorps primaire spécifique – anticorps secondaire aspécifique est ensuite retiré tout en laissant le fluorophore fixé au niveau de sa cible ce qui permet de renouveler le marquage de façon séquentielle avec de nouvelles cibles et de nouveaux fluorophores.

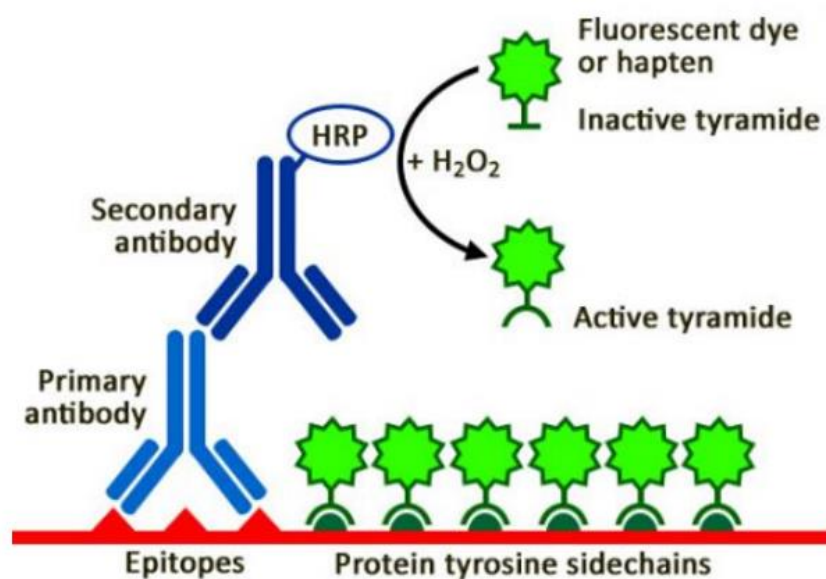


Figure 6. Immunohistochimie multiplex multispectrale séquentielle : amplification et liaison covalente du signal fluorescent par le Tyramide

Méthode de coloration par Immunohistochimie multiplex multispectrale séquentielle

Nous avons utilisé le kit commercial *Opal™ 7 Solid Tumor Immunology Kit* (Akoya Biosciences) comprenant les couples anticorps primaire - fluorophore suivants : CD4-OPAL 520, CD8-OPAL 570, CD20-OPAL 540, FoxP3-OPAL 620, CD68-OPAL 650 et pan-cytokeratin-OPAL 690.

Afin d'utiliser la technique d'IHCm sur nos coupes de cancer du sein, nous avons d'abord mis au point une librairie spectrale des anticorps primaires en IHC monoplex sur tissu d'amygdale puis ajusté notre technique d'IHCm impliquant plusieurs cycles

de marquage toujours sur ce tissu contrôle. Cette mise au point est détaillée en Annexe 2.

Le protocole pour l'IHCm sur tissu mammaire peut être résumé comme suit. Des coupes histologiques de 3,5 µm ont été réalisées au niveau des blocs paraffinés des tumeurs primaires. Celles-ci étaient ensuite déparaffinées, réhydratées et soumises à une étape de récupération des épitopes par traitement au micro-onde dans une solution d'« Antigen Retrieval ». Les sites non spécifiques étaient ensuite masqués par incubation d'« Antibody Diluent ». L'anticorps primaire spécifique était ensuite ajouté, puis révélé par l'anticorps secondaire couplé à l'HRP et au fluorophore (OPAL) d'intérêt. Les anticorps étaient ensuite retirés par une étape de « lavage » avant la réalisation d'un nouveau cycle d'incubation. A l'issue du dernier cycle de marquage, les tissus étaient incubés dans du DAPI avant l'application d'un milieu de montage et la pose d'une lamelle. Le protocole détaillé est disponible en Annexe 3.

Acquisition des images

L'acquisition des images d'IHCm a été réalisée sur un Vectra®Polaris (Akoya Biosciences) permettant de scanner les lames en microscopie sur fond clair et en immunofluorescence multispectrale. L'appareil est équipé d'une caméra multispectrale qui permet de capter la fluorescence émise par chaque fluorophore (spectre d'émission) après excitation du tissu marqué par des LED à intervalles réguliers de 10nm (spectre d'excitation).

Brièvement, après vérification de la qualité du tissu et élimination des lames présentant une perte tissulaire et/ou une coupe repliée, les lames entières étaient scannées en microscopie sur fond clair. Les images de lame entière étaient ensuite analysées à l'aide du logiciel PhenoChart™ (Akoya Biosciences) afin d'apposer des zones pour scan en immunofluorescence multispectrale. Ces zones intéressaient l'ensemble du tissu

pour les biopsies et 25 à 50% du tissu pour les pièces opératoires, chaque zone étant dans ce cas apposée de façon aléatoire par le logiciel Phenochart™ (Akoya Biosciences) afin de ne pas entraîner de biais de sélection.

Analyse des images

L'analyse des images d'IHCm a été réalisée avec le logiciel inForm®Cell Analysis™ (Akoya Biosciences) permettant l'analyse quantitative des différents types cellulaires identifiés par les différents marquages. Le logiciel inForm®Cell Analysis™ (Akoya Biosciences) est un logiciel de « machine-learning » qui nécessite une 1^{ère} étape d'entraînement avant de permettre l'analyse de l'ensemble de la lame scannée.

Brièvement, l'analyse d'image par le logiciel inForm®Cell Analysis™ (Akoya Biosciences) peut être résumée ainsi :

- Etape d'entraînement du logiciel (« machine-learning »)
 - Utilisation de quelques images de zones scannées en immunofluorescence multispectrale d'une même lame (environ 10)
 - Entraînement du logiciel à distinguer les zones tumorales, stromales et sans tissu par sélection manuelle de plusieurs zones représentatives. Nous avons considéré que la distinction était de qualité satisfaisante lorsque la reconnaissance estimée par le logiciel était > 99% et nous paraissait correcte après vérification manuelle
 - Entraînement du logiciel à reconnaître les cellules. Les noyaux étaient reconnus par leur marquage au DAPI et à l'OPAL 620 correspondant au marquage nucléaire de l'anticorps anti-FoxP3. Le cytoplasme était reconnu par marquage à l'OPAL 690 correspondant au marquage cytoplasmique de l'anticorps anti-panCytokeratin. Enfin les membranes

étaient reconnues par marquage aux OPAL 520, 540 et 570 correspondant respectivement aux marquages par les anticorps anti-CD4, -CD20 et -CD8. Différents paramètres tels que l'intensité minimale de détection des différents OPAL ou encore les tailles minimales de noyau ou de cytoplasme étaient ensuite ajustés jusqu'à l'obtention d'une reconnaissance cellulaire satisfaisante

- Entraînement du logiciel à distinguer les différents sous-types cellulaires par sélection manuelle de cellules exprimant les OPALs correspondant aux anticorps CD4, CD8, CD20, FoxP3, CD68 et la panCytokeratin. Les cellules n'exprimant aucun des OPAL étaient classées en « autre type cellulaire »
- Enregistrement de l'algorithme d'entraînement
- Etape d'analyse de l'ensemble des zones scannées en immunofluorescence multispectrale pour une même coupe : l'algorithme entraîné sur quelques images de zones scannées en immunofluorescence multispectrale d'une même lame est ensuite appliqué pour l'analyse de l'ensemble des zones scannées
- Etape de quantification des différents sous-types cellulaires par zone identifiée (tumorale et stromale) à l'aide des scripts phenoptr et phenoptrReports fournis par Akoya Biosciences sur le logiciel RStudio version 3.5.3 (2019-03-11)

[Analyses statistiques](#)

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.5.3 (2019-03-11). Les caractéristiques initiales ont été décrites selon les règles classiques de la statistique descriptive : fréquence et pourcentage pour les variables catégorielles ; médiane et extrêmes pour les variables continues. Les données manquantes ont également été précisées.

La comparaison des variables quantitatives a été effectuée par le test non paramétrique de Mann Whitney. La comparaison des variables catégorielles a été réalisée par le test de Chi deux ou le test exact de Fisher.

Les différentes courbes de survie (survie sans progression et survie globale) ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier à partir de la date de diagnostic :

- Le délai de la survie globale était calculé jusqu'à la date de décès de toute cause. Les patientes vivantes à la dernière consultation ont été censurées à cette date.
- Le délai de la survie sans progression était calculé jusqu'à la date de 1^{ère} progression locale ou à distance ou jusqu'au décès de toute cause. Les patientes vivantes sans progression à la dernière consultation ont été censurées à cette date.

La recherche de facteurs pronostiques associés à la survie (sans progression et globale) a été réalisée en utilisant un modèle de Cox univarié puis multivarié. Le Hazard Ratio et son intervalle de confiance à 95% sont détaillés pour chaque modèle. Le seuil de significativité était fixé à 5%.

Résultats

Cancer du sein *de novo* oligométastatique et *de novo* polymétastatique : comparaison

Données cliniques, anatomopathologiques et biologiques au diagnostic

Les cohortes de patientes atteintes d'un cancer du sein *de novo* OM et *de novo* PM sont statistiquement comparables en termes d'âge ou de stade T/N. De même, les données anatomopathologiques de la tumeur primitive sont comparables pour le sous-type tumoral, le grade ou le Ki67.

Les patientes atteintes d'un cancer *de novo* OM ont un ratio neutrophiles/lymphocytes et des taux de LDH et CA15-3 plus faibles que les patientes atteintes d'un cancer du sein PM. De plus, elles présentent un nombre de sites métastatiques plus faible, avec moins d'atteinte osseuse, pulmonaire ou ganglionnaire. Seules l'atteinte hépatique et du système nerveux central sont statistiquement comparables. L'ensemble des données sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Comparaison des caractéristiques au diagnostic des patientes atteintes d'un cancer du sein *de novo* oligométastatique et *de novo* polymétastatique.

Caractéristiques au diagnostic			De novo oligométastatique (n = 115)	De novo polymétastatique (n = 117)	P value
Cliniques	Age		Median: 55 ans (27 – 84)	Median 58 ans (23 – 83)	0.392
	Performance Status	0-1 2 >2 Inconnu	67 (95.7) 3 (4.3) 0 45	39 (81.3) 7 (14.6) 2 (4.2) 48	0.028
	Index de Masse Corporelle	≤ 25 kg/m2 >25 Inconnu	37 (38.5) 59 (61.5) 19	50 (53.8) 43 (46.2) 24	0.042
	Stade cT	1 2 3 4a-c 4d Inconnu	18 (16.7) 35 (32.4) 27 (25.0) 12 (11.1) 16 (14.8) 7	13 (11.4) 40 (35.1) 37 (32.5) 15 (13.2) 9 (7.9) 3	0.304
	Stade cN	0 ≥ 1 Inconnu	39 (36.1) 69 (63.9) 7	35 (31.5) 76 (68.5) 6	0.479
Anatomopathologiques	Sous-type (Défini par IHC)	RH+HER2- RH+HER2+ RH-HER2+ TNBC	76 (66.1) 22 (19.1) 9 (7.8) 8 (7.0)	69 (59.0) 23 (19.7) 18 (15.4) 7 (6.0)	0.333
	Grade histopronostique SBR	1 – 2 3 Inconnu	56 (54.9) 46 (45.1) 13	69 (62.2) 42 (37.8) 6	0.330
	Ki67	< 20 ≥ 20 Inconnu	20 (34.5) 38 (65.5) 57	35 (37.6) 58 (62.4) 24	0.731
Biologiques	Ratio neutrophile / lymphocyte	Médian	2.1 (1.0 – 7.6)	2.6 (0.8 – 25.4)	0.003
		≤3	52 (78.8)	73 (64.0)	0.045
		>3 Inconnu	14 (21.2) 49	41 (36.0) 3	
	LDH	Normal >Normal Inconnu	59 (90.8) 6 (9.2) 50	35 (44.3) 44 (55.7) 38	<0.001
CA 15-3	Normal >Normal Inconnu	49 (59.0) 34 (41.0) 32	46 (40.4) 68 (59.7) 3	0.014	
Dissémination métastatique	Nombre de lésions métastatiques	1	51 (44.4)	NA	NA
		2	25 (21.7)		
		3	19 (16.5)		
		4	15 (13.0)		
		5	5 (4.4)		
	Nombre de sites métastatiques	1	103 (89.6)	67 (57.3)	<0.001
		2 >2	12 (10.4) 0	23 (19.7) 27 (23.1)	
Sites métastatiques	Os	62 (53.9)	84 (71.8)	0.006	
	Foie	46 (40.0)	57 (48.7)	0.189	
	Poumons	12 (10.4)	28 (23.9)	0.009	
	Ganglions	5 (4.4)	26 (22.2)	<0.001	
Système nerveux central	2 (1.7)	4 (3.4)	0.684		

Stratégies thérapeutiques

La plupart des patientes atteintes d'un cancer du sein *de novo* OM ont été traitées en 1^{ère} intention par traitement systémique (76/115, 66.1%). La majorité d'entre elles étaient ensuite traitées par résection chirurgicale de la tumeur primitive (53/76, 69.7%), le plus souvent avant toute progression locale ou à distance (41/53, 77.4%). Pour ces patientes, le traitement systémique de 1^{ère} ligne était majoritairement de la chimiothérapie (54/76, 71%), dont la moitié consistait en des protocoles de polychimiothérapie. La plupart des patientes *de novo* OM traitées en 1^{ère} intention par chirurgie mammaire (39/115, 33.9%) ont ensuite reçu un traitement systémique « pseudo-adjuvant » (36/39, 92.3%).

La majorité des patientes *de novo* PM étaient également traitées en 1^{ère} intention par traitement systémique (95/117, 81.2%), le plus souvent par chimiothérapie (60/95, 63.2%). Les deux tiers d'entre elles étaient ensuite traitées par résection chirurgicale de la tumeur primitive (59/95, 62.1%), pour la moitié d'entre elles avant progression locale ou à distance (46/95, 48.4%). Les patientes traitées par chirurgie mammaire d'emblée (22/117, 18.8%) ont toutes reçu un traitement systémique dans les suites, majoritairement par hormonothérapie (15/22, 68.2%). Les stratégies thérapeutiques pour les patientes *de novo* OM et PM sont décrites dans la Figure 7.

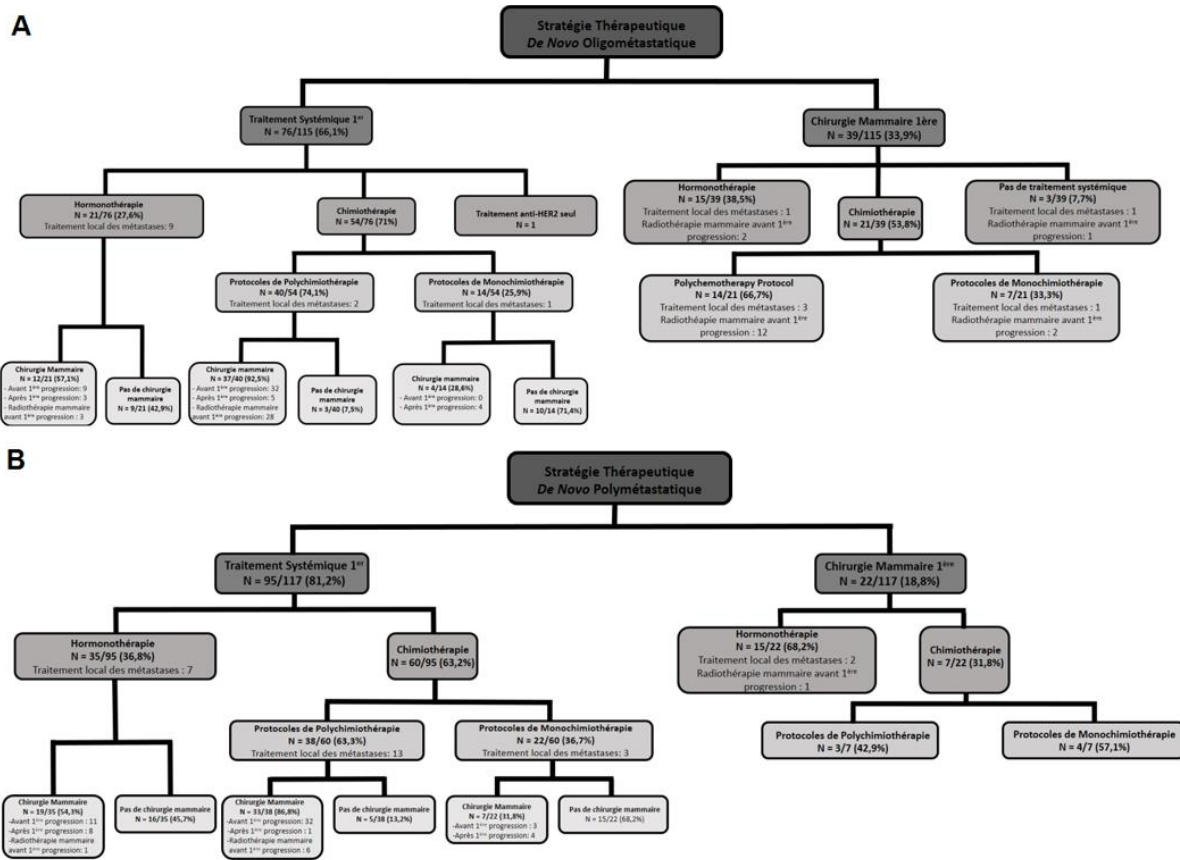


Figure 7. A : Stratégies thérapeutiques chez les patientes *de novo* oligométastatiques. B : Stratégies thérapeutiques chez les patientes *de novo* polymétastatiques.

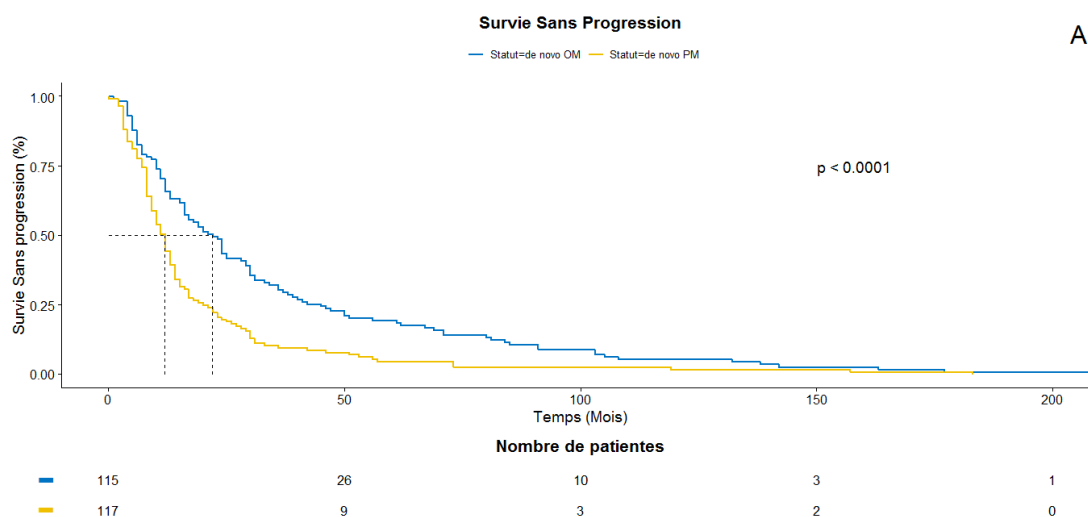
La comparaison des stratégies thérapeutiques montre que plus de patientes OM ont été traitées par chirurgie première, même si dans les deux cohortes le premier traitement était majoritairement un traitement systémique. On retrouve également plus de radiothérapie mammaire post-opératoire chez les patientes *de novo* OM. Dans le sous-groupe RH+/HER2-, plus de patientes OM étaient traitées par chimiothérapie, principalement par protocoles de polychimiothérapie, tandis que les patientes PM recevaient principalement une hormonothérapie. La comparaison des stratégies thérapeutiques est résumée dans le Tableau 3.

Tableau 3. Comparaison des stratégies thérapeutiques chez les patientes *de novo* oligométastatiques et *de novo* polymétastatiques.

Caractéristiques au diagnostic			De novo oligométastatique (n = 115)	De novo polymétastatique (n = 117)	Comparaison (P value)
Stratégie thérapeutique	Premier traitement	Chirurgie mammaire Traitement systémique	39 (33.9) 76 (66.1)	22 (18.8) 95 (81.2)	0.011
	Chirurgie mammaire	Avant 1 ^{ère} progression	80 (87.9)	66 (82.5)	0.387
		Après 1 ^{ère} progression Not applicable	11 (12.1) 24	14 (17.5) 37	
	1er traitement systémique	Hormonothérapie Monochimiothérapie Polychimiothérapie Pas de traitement / Anti-HER2	36 (32.4)	50 (42.7)	0.197
			22 (19.8)	24 (20.5)	
53 (47.8) 4			43 (36.8) 0		
1er traitement systémique chez les patients RH+/HER2-	Hormonothérapie Monochimiothérapie Polychimiothérapie	30 (37.5%) 19 (23.7%) 31 (38.8%)	46 (66.7%) 4 (5.8%) 19 (27.5%)	0.001	
Radiothérapie mammaire pseudo-adjuvante avant 1 ^{ère} progression		51 (44.4)	7 (9.1)	<0.001	
Traitement local métastase avant 1 ^{ère} progression			29 (25.2)	26 (22.2)	0.645

Données de survie sans progression et survie globale

Les survies médianes sans progression (SSP) et globale (SG) dans notre cohorte de patientes *de novo* OM, respectivement 23.9 (2.9 – 221) et 54.9 (6.7 – 221) mois, sont significativement plus élevées que les survies des patientes *de novo* PM, respectivement de 12 (1 – 183) et 39 (1 – 208) mois. Vingt-quatre patientes *de novo* OM n'ont jamais progressé/rechuté durant un suivi allant de 24 à 221 mois et 24 patientes ont une SSP > 5ans.



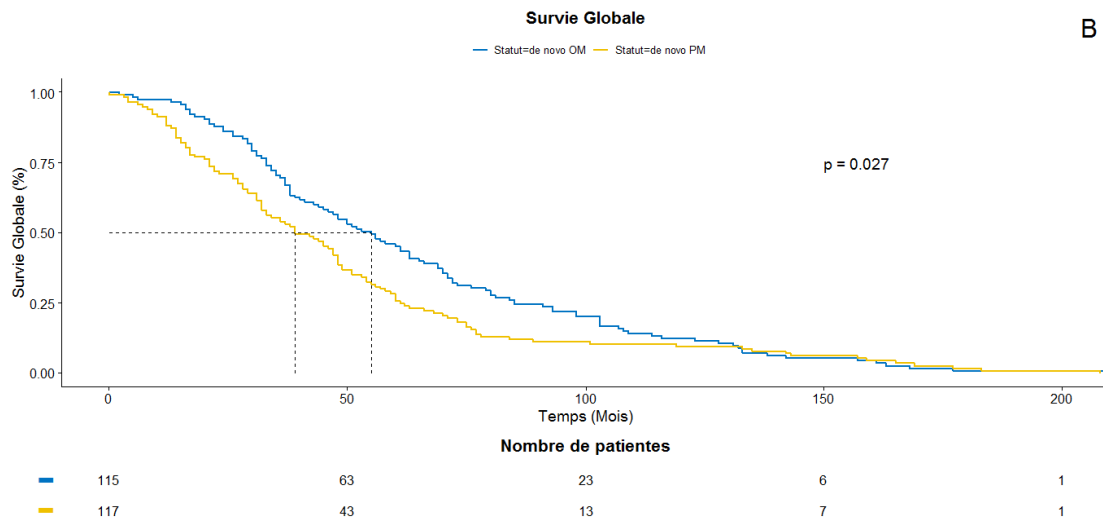


Figure 8. A : Survie sans progression des patientes *de novo* oligométastatiques et *de novo* polymétastatiques. B : Survie globale des patientes *de novo* oligométastatiques et *de novo* polymétastatiques

Tumeur primitive *de novo* oligométastatique : infiltrat immun

Quantification des TILs

L'infiltration médiane par des TILs au niveau des tumeurs mammaires au diagnostic est évaluée à 5% dans notre cohorte *de novo* OM. La moitié des patientes (27/54, 50%) présentent des tumeurs dépourvues de TILs classées « cold ». La majorité des autres cas sont infiltrés par des sTILs uniquement et sont donc classés « stroma - restricted » avec une infiltration modérée $\leq 10\%$ pour 17 cas (31.5%) et $\geq 20\%$ pour 6 cas uniquement (11.1%). Deux patientes présentent une tumeur infiltrée par des sTILs localisés au niveau de la marge tumorale, classées « margin-restricted », évaluées à 30% pour l'une, et 10% pour la seconde. Enfin, deux tumeurs sont infiltrées par des sTILs mais également des iTILs. Ces 2 tumeurs, classées « fully inflamed », correspondent à un cancer LUMINAL B/HER2- et un TNBC.

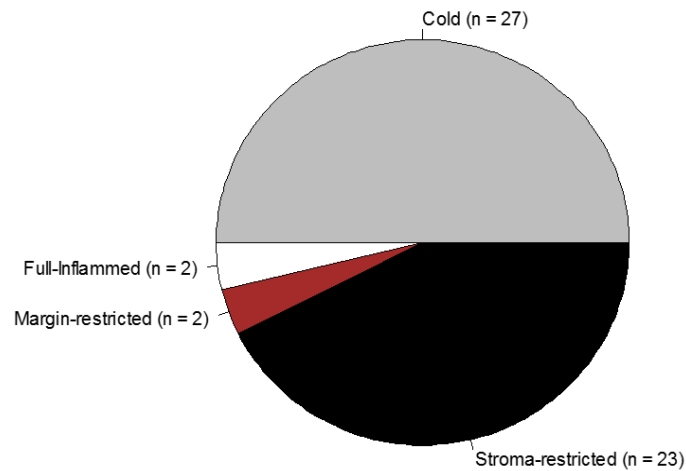


Figure 9. Distribution des configurations spatiales des TILs dans les tumeurs primitives *de novo* oligométastatiques

Nous n'avons pas observé de différences entre les tumeurs primitives et les métastases pour 4 patientes évaluées (Tableau 4). En effet, 2 patientes présentent une tumeur dépourvue de TILs tant au niveau de la tumeur primitive que des métastases correspondantes (métastases osseuses). Les deux autres patientes sont infiltrées par des sTILs à des taux similaires au niveau de la tumeur primitive et de métastases hépatiques.

Tableau 4. Configurations spatiales des TILs au niveau de la tumeur primitive et d'une métastase correspondante au diagnostic pour 4 patientes *de novo* oligométastatiques.

Patiente	Infiltrat lymphocytaire de la tumeur primitive		Infiltrat lymphocytaire de la métastase		Type de métastase
	Pourcentage de TILs	Configuration spatiale	Pourcentage de TILs	Configuration spatiale	
1	0	cold	0	cold	Osseuse
2	0	cold	0	cold	Osseuse
3	20	Stroma-restricted	15	Stroma-restricted	Hépatique
4	10	Stroma-restricted	10	Stroma-restricted	Hépatique

Pour huit patientes, nous avons analysé l'infiltration immune au niveau de la tumeur primitive résiduelle après chimiothérapie néo-adjuvante. En comparant avec l'infiltrat lymphocytaire au niveau des biopsies pré-thérapeutiques, nous observons que 3 patientes avec une tumeur primitive avant traitement dépourvue de TILs classée « cold » ont acquis une infiltration stromale après chimiothérapie néo-adjuvante (Tableau 5). A noter également qu'une patiente avec une infiltration par des sTILs

évaluée à 5% au niveau de la tumeur primitive présente une tumeur résiduelle après chimiothérapie classée « cold ».

Tableau 5. Configurations spatiales des TILs au niveau de la biopsie pré-thérapeutique et de la pièce opératoire correspondante après chimiothérapie néo-adjuvante pour 8 patientes *de novo* oligométastatiques.

Patiente	Infiltrat lymphocytaire de la tumeur primitive avant traitement		Infiltrat lymphocytaire de la pièce opératoire après polychimiothérapie	
	Pourcentage de TILs	Configuration spatiale	Pourcentage de TILs	Configuration spatiale
1	0	cold	0	cold
2	0	cold	0	cold
3	0	cold	0	cold
4	0	cold	10	Stroma-restricted
5	0	cold	5	Stroma-restricted
6	0	cold	<5	Stroma-restricted
7	10	Stroma-restricted	10	Stroma-restricted
8	5	Stroma-restricted	0	cold

Immunophénotypage de l'infiltrat immun

L'immunophénotypage par IHCm a pu être réalisé pour 31/54 des tumeurs primitives collectées dans le cadre de cette étude. Les 23 tumeurs restantes n'ont pu être analysées en raison d'un détachement du matériel tumoral secondaire aux bains successifs pour le retrait des anticorps (« antigen retrieval »), ou d'un épuisement de matériel tumoral. Les 31 tumeurs analysées correspondaient à 23 biopsies et 8 pièces opératoires. L'analyse de la configuration spatiale des TILs en H&E pour ces 31 tumeurs retrouvait 15 tumeurs « cold », 14 tumeurs « stroma-restricted » (sTILs 4 à 60%), 1 tumeur « margin-restricted » (30% sTILs) et 1 tumeur « fully inflamed » (15% iTILs et 35% sTILs).

La Figure 10 est un exemple des résultats obtenus par IHCm dans notre cohorte. Il s'agit d'une biopsie avant traitement d'une tumeur HER2-ENRICHED. L'analyse de la lame H&E montrait une infiltration de type « stroma-restricted » évaluée à 25% de TILs et on peut observer que l'ensemble des sous-types cellulaires sont détectés en IHCm dans cette tumeur primitive.

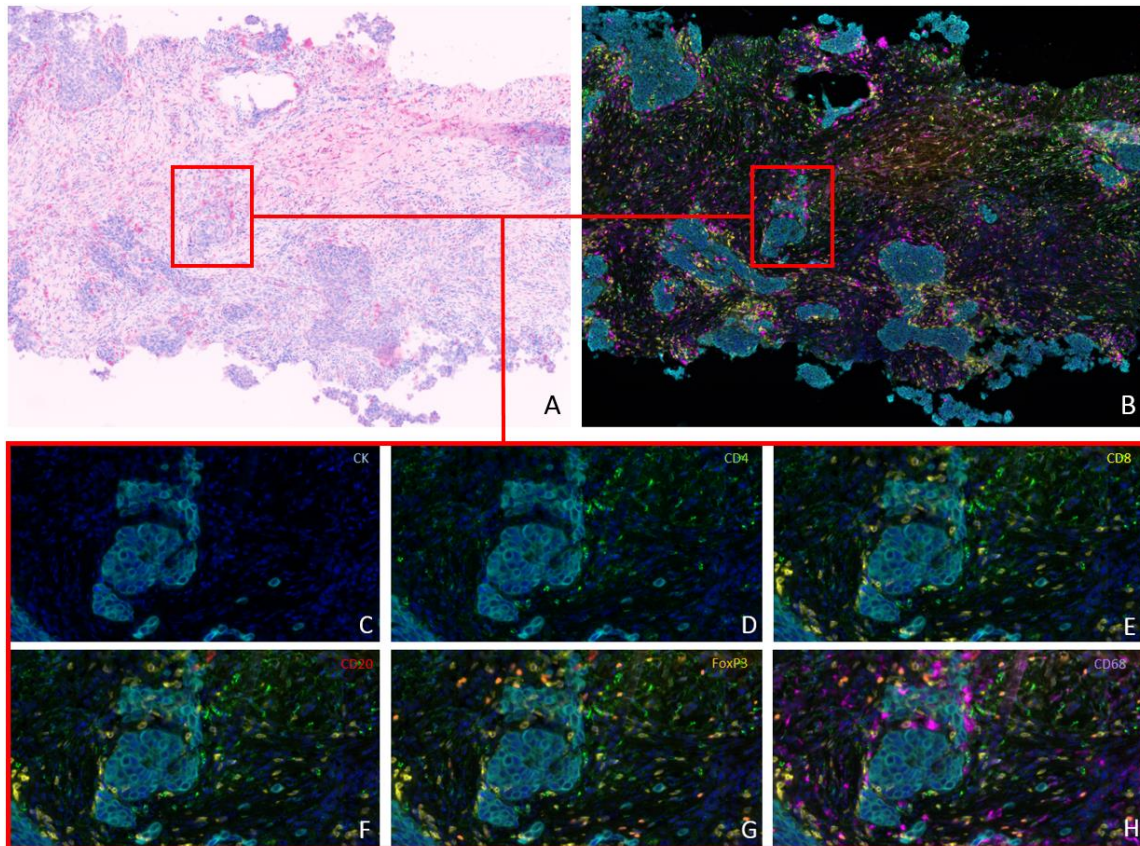


Figure 10. A/B : colorations H&E et IHCm d'une coupe tissulaire de tumeur primitive *de novo* OM. C- H : visualisation progressive des marqueurs pan-CK, CD4, CD8, CD20, FoxP3 et CD68 en IHCm

L'immunophénotypage de l'infiltrat immunitaire tumoral par IHCm révèle que le sous-type immunitaire le plus représenté correspond aux lymphocytes T CD4+ (infiltration médiane de 8% [2 – 27%]), suivi des macrophages CD68+ (5% [1 – 20%]) puis des lymphocytes T CD8+ (4% [1 – 28%]). On note très peu de lymphocytes B CD20+ (1% [0 – 14%]) et de lymphocytes T régulateurs FoxP3+ (2% [0 – 6%]). Six tumeurs ne présentent aucune infiltration par des lymphocytes B CD20+ et 5 tumeurs aucune infiltration par des lymphocytes T régulateurs FoxP3+.

L'analyse quantitative automatisée des images multispectrales par le logiciel inForm®Cell Analysis™ (Akoya Biosciences) de chaque phénotype cellulaire est résumée dans Tableau 6.

Tableau 6. Quantification des sous-types cellulaires au niveau stromal, intra-tumoral et total par IHCm chez les patientes de novo oligométastatiques.

	CD4	CD8	CD20	FoxP3	CD68	CK	Autre
Stroma							
Médiane	13%	7%	3%	3%	8%	4%	56%
Moyenne	15%	10%	5%	3%	8%	7%	52%
Extrêmes	5 – 33%	1 – 32%	0 – 28%	1 – 8%	2 – 19%	0 – 29%	14 – 78%
Intra-tumoral							
Médiane	2%	2%	0%	1%	3%	76%	8%
Moyenne	3%	3%	1%	1%	4%	77%	11%
Extrêmes	0 – 7%	0 – 18%	0 – 5%	0 – 3%	0 – 22%	60 – 97%	0 – 28%
Total							
Médiane	8%	4%	1%	2%	5%	45%	29%
Moyenne	9%	7%	3%	2%	6%	41%	32%
Extrêmes	2 – 27%	1 – 28%	0 – 14%	0 – 6%	1 – 20%	8 – 69%	11 – 62%

Il est intéressant de noter que parmi les 15 tumeurs classées « cold » sur lames H&E, l'infiltration par les différents sous-types lymphocytaires en IHCm, à savoir l'addition des lymphocytes T CD4+, CD8+, FoxP3+ et des lymphocytes B CD20+, variait de 6 à 34%, avec 10/15 tumeurs présentant une infiltration > 10%. Les taux médians et moyens d'infiltration par les différents sous-types cellulaires en IHCm sont résumés dans le Tableau 7. Le détail pour chaque lame est disponible en Annexe 1 (Tableau 2). Ceci est illustré par la Figure 11 qui rapporte l'IHCm pour deux tumeurs classées « cold » sur lames H&E, l'une d'entre elles se révélant infiltrée par de nombreux lymphocytes en IHCm.

Tableau 7. Quantification des sous-types cellulaires au niveau total (stromal + intra-tumoral) par IHCm chez 15 patientes classées "cold" sur lames H&E.

Taux d'infiltration en IHCm	tCD4	tCD8	tCD20	tFoxP3	tCD68	tCK	tAutre
Tumeur + Stroma							
Médiane[extrêmes]	8% [2–18%]	4% [1–10%]	1% [0–11%]	1% [0–5%]	5% [1–13%]	49% [8-68%]	33%[14-62%]
Moyenne	8%	4%	2%	2%	6%	43%	35%

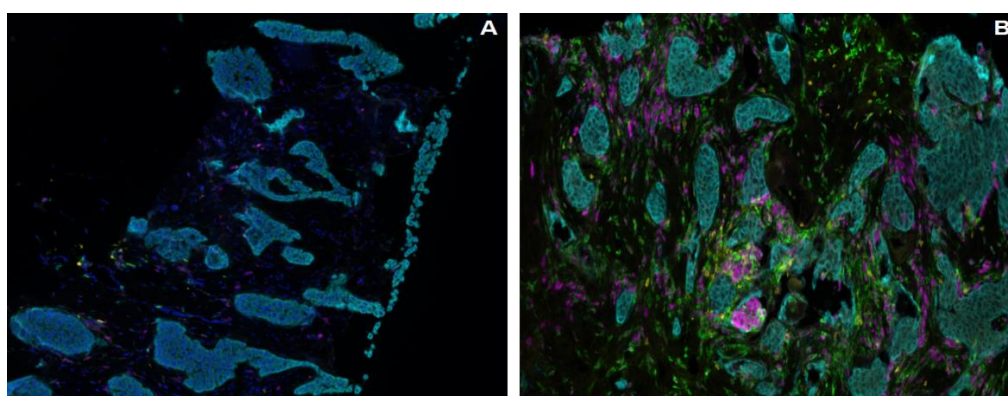


Figure 11. IHCm de deux tumeurs classées "cold" sur lames H&E. A : tumeur non infiltrée en IHCm. B : tumeur infiltrée par de nombreuses cellules immunes en IHCm.

De même, parmi les 14 tumeurs classées « stroma-restricted » en H&E, sans infiltrat intra-tumoral retrouvé par l'anatomopathologiste, l'IHCm révèle une infiltration intra-tumorale par les différents sous-types lymphocytaires variant de 0 à 21%, dont 5/14 tumeurs avec un infiltrat > 10%. Les taux médians et moyens d'infiltration intra-tumorale par les différents sous-types cellulaires en IHCm sont résumés dans le Tableau 8. Le détail pour chaque lame est disponible en Annexe 1 (Tableau 3). Ceci est illustré par la Figure 12 qui rapporte les coupes après coloration par H&E et IHCm d'une tumeur classée « stroma-restricted » sur lame H&E, montrant un infiltrat intra-tumoral par des lymphocytes T CD8+.

Tableau 8. Quantification des sous-types cellulaires au niveau intra-tumoral par IHCm chez 14 patientes classées "stroma-restricted" sur lames H&E.

Taux d'infiltration en IHCm	iCD4	iCD8	iCD20	iFoxP3	iCD68	iCK	iAutre
Tumeur							
Médiane[extrêmes]	2% [0-7%]	4% [0-18%]	0% [0-1%]	1% [0-2%]	3% [1-22%]	74%[61-94%]	13%[2-25%]
Moyenne	3%	5%	0%	1%	5%	75%	12%

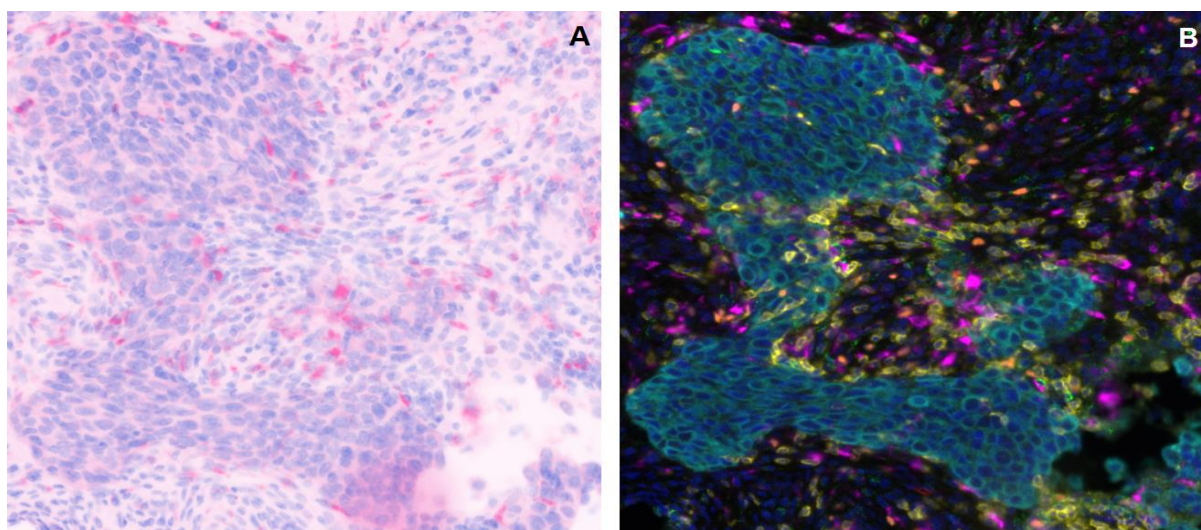


Figure 12. Meilleure visualisation des lymphocytes T CD8+ (jaune) intra-tumoraux en IHCm (B) qu'en coloration H&E (A)

Cancer du sein *de novo* oligométastatique : facteurs pronostiques

Facteurs cliniques, anatomopathologiques et biologiques

Nous avons évalué la survie des patientes *de novo* OM en fonction des paramètres cliniques, anatomopathologiques et biologiques (Tableau 9). L'élévation du marqueur tumoral CA 15-3 au diagnostic est associé à une moins bonne SSP sans avoir d'impact sur la SG. De même, un grade histopronostique SBR 3 est associé à une moins bonne SG, sans impact sur la SSP. L'ensemble des autres paramètres, notamment l'extension de la maladie métastatique (nombre de lésions, nombre de sites atteints et organes atteints) n'ont pas d'impact sur la survie des patientes dans notre cohorte.

Tableau 9. Impact pronostic des caractéristiques cliniques, anatomopathologiques et biologiques au diagnostic sur la survie sans progression et la survie globale chez les patientes *de novo* oligométastatiques.

Caractéristiques			SSP		SG	
			HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value
Cliniques	Age	Continuum (+1an) ≤ 35 ans (n = 11)	1.00 (0.99 – 1.02) 0.89 (0.47 – 1.66)	0.350 0.718	1.01 (0.99 – 1.02) 0.93 (0.50 – 1.75)	0.099 0.842
	BMI	>25 (n = 59)	1.06 (0.69 – 1.61)	0.775	0.95 (0.62 – 1.45)	0.834
	Stade cT	T1 (n = 18) T2 (n = 35) T3 (n = 27) T4a-c (n = 12) T4d (n = 16)	1 0.90 (0.47-1.74) 1.17 (0.60-2.31) 1.02 (0.44-2.35) 1.12 (0.53-2.39)	 0.928	1 1.26 (0.63-2.53) 1.17 (0.56-2.45) 1.26 (0.53-3.00) 1.21 (0.53-2.74)	 0.975
	Stade cN	N0 (n = 39) ≥ N1 (n = 69)	1 1.00 (0.91 – 1.10)	0.961	1 1.17 (0.70 – 1.94)	0.432
Anatomopathologiques	Sous-type (défini par IHC)	RH+HER2- (n = 76) RH+HER2+(n = 22) RH-HER2+ (n = 9) TNBC (n = 8)	1 0.70 (0.38-1.27) 0.95 (0.41-2.19) 1.85 (0.84-4.05)	0.228	1 0.57 (0.30-1.10) 0.83 (0.35-1.93) 1.67 (0.72-3.89)	0.179
	Grade histopronostique SBR > 2 (n = 46)		1.30 (0.97 – 1.75)	0.184	1.67 (1.43 – 1.95)	0.010
Biologiques	Ratio neutrophiles / lymphocytes	>2.1 (n = 31) >3 (n = 14)	0.78 (0.46 – 1.32) 1.04 (0.58 – 1.86)	0.339 0.882	0.76 (0.48 – 1.19) 0.88 (0.47 – 1.51)	0.275 0.578
	LDH > Normal (n = 6)		1.32 (0.70 – 2.49)	0.382	1.66 (0.87 – 3.14)	0.118
	CA 15-3 ≥ Normal (n = 34)		1.72 (1.06 – 2.79)	0.038	1.12 (0.68 – 1.82)	0.646
Dissémination métastatique	Lésion osseuse unique (n = 26)		1.09 (0.36 – 3.30)	0.690	1.41 (0.23 – 4.41)	0.123
	Nombre de lésions métastatiques	1 (n = 51) 2 (n = 25) 3 (n = 19) 4 (n = 15) 5 (n = 5)	1 1.41 (0.82-2.42) 1.49 (0.83-2.70) 1.84 (0.97-3.48) 0.93 (0.29-3.03)	 0.323	1 1.63 (0.90-2.95) 0.95 (0.51-1.76) 1.51 (0.77-2.97) 0.93 (0.28-3.06)	 0.376
	Nombre de sites métastatiques > 1 (n = 12)		0.79 (0.43 – 1.40)	0.461	0.89 (0.49 – 1.64)	0.729
	Sites métastatiques	Os (n = 62) Foie (n = 46) Autres (n = 19)	0.72 (0.49 – 1.04) 1.17 (0.80 – 1.71) 1.03 (0.61 – 1.72)	0.086 0.400 0.907	0.85 (0.59 – 1.23) 1,00 (0.68 – 1.45) 0.93 (0.56 – 1.54)	0.401 0.999 0.784

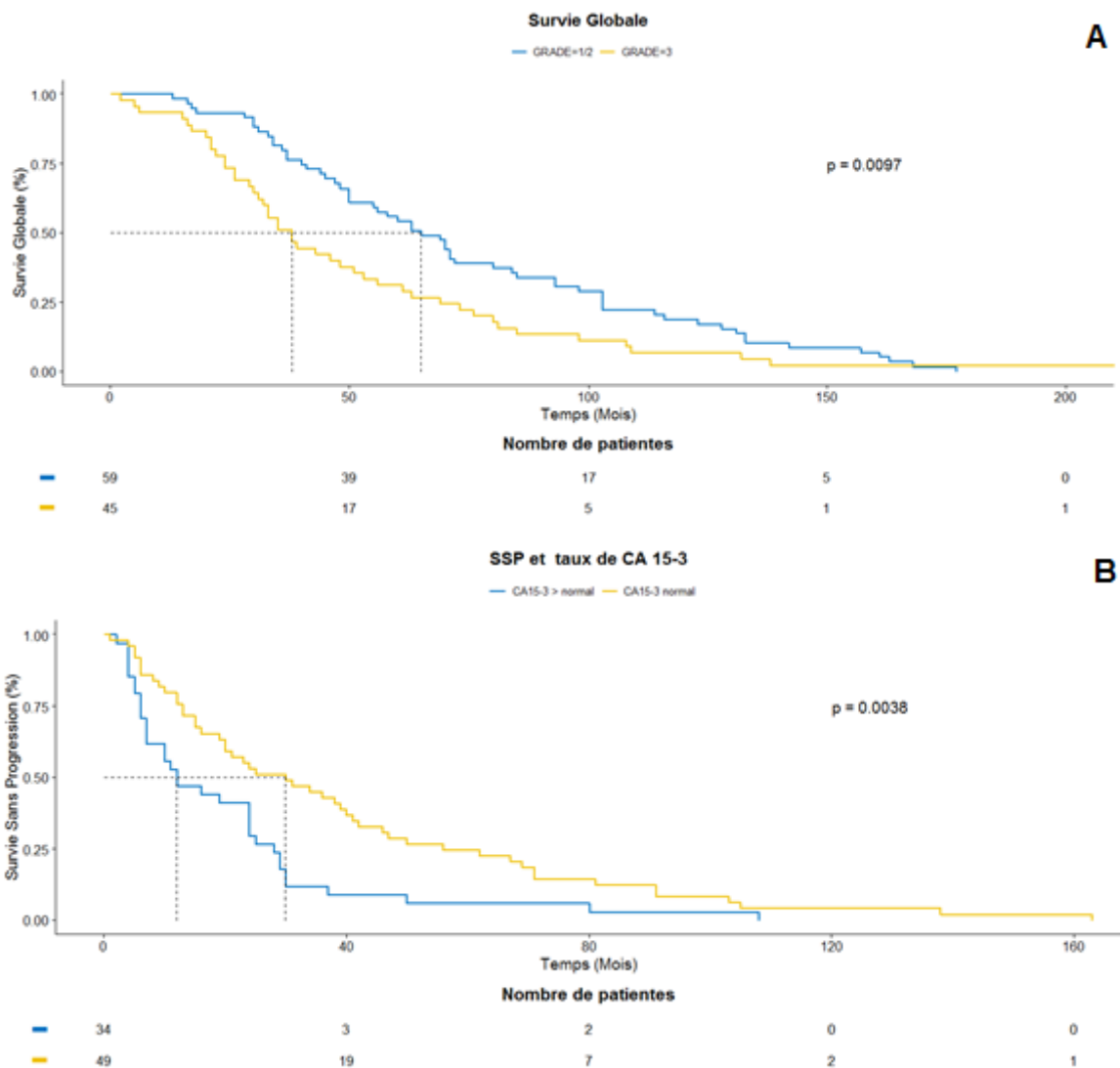


Figure 13. A : Survie globale en fonction du grade histopronostique SBR de la tumeur primitive *de novo* oligométastatique. B : Survie sans progression en fonction du taux de CA 15-3 au diagnostic chez les patientes *de novo* oligométastatiques

Impact de la prise en charge thérapeutique

Notre analyse démontre que la stratégie thérapeutique utilisée influence le pronostic des patientes *de novo* OM (Tableau 10). En effet, le traitement chirurgical de la tumeur primitive, la radiothérapie mammaire post-opératoire et l'utilisation d'une polychimiothérapie (avant ou après chirurgie, y compris dans le sous-groupe des patientes RH+ pouvant bénéficier d'hormonothérapie), améliorent la SSP. En

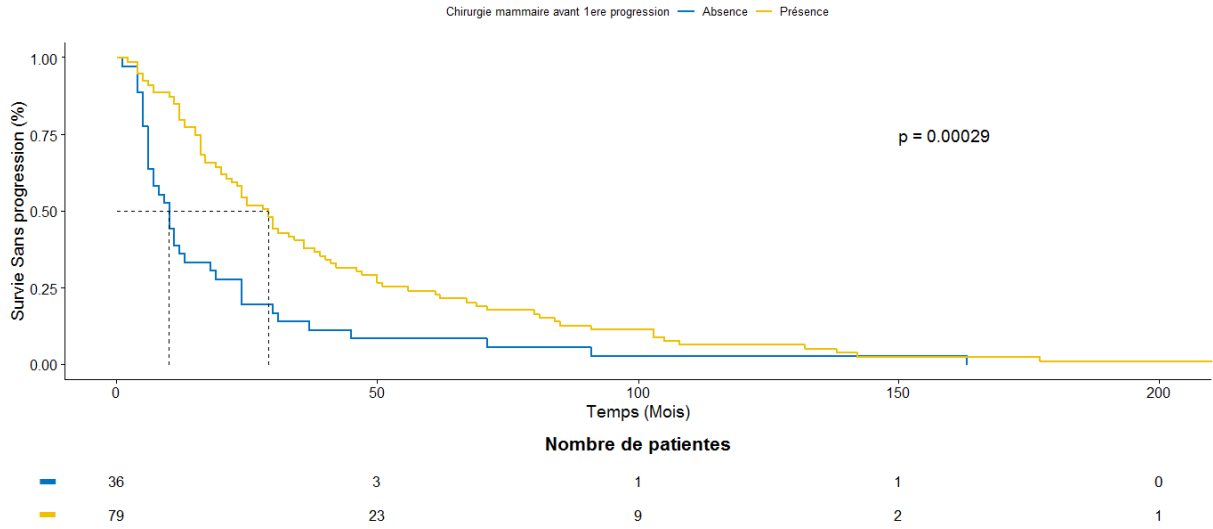
revanche, la séquence des traitements (prise en charge thérapeutique initiale par un traitement systémique versus chirurgie mammaire) n'est pas associée au devenir clinique des patientes. A noter que seule la polychimiothérapie, généralement utilisée dans le cadre de protocoles de chimiothérapie néo-adjuvante ou adjuvante, améliore la SG des patientes *de novo* OM. Enfin, le traitement local des métastases n'influence pas le pronostic dans notre étude.

Tableau 10. Impact pronostic de la stratégie thérapeutique sur la survie sans progression et la survie globale chez les patientes *de novo* oligométastatiques.

Stratégie thérapeutique		SSP		SG	
		HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value
Chirurgie mammaire première ou traitement systémique premier	Chirurgie (n = 39)	1		1	
	Traitement systémique (n = 76)	1.00 (0.68 – 1.48)	0.969	1.00 (0.68 – 1.49)	0.969
Chirurgie mammaire	Avant 1ère progression (n = 79)	0.47 (0.31 – 0.71)	< 0.001	0.89 (0.6 – 1.32)	0.575
	Après 1ère progression (n = 12)	NA	NA	0.56 (0.28 – 1.13)	0.111
Traitement systémique	Hormonothérapie (n = 36)	1		1	
	Monochimiothérapie (n = 21)	1.30 (0.74 – 2.24)	0.002	0.97 (0.56 – 1.67)	0.007
	Polychimiothérapie (n = 54)	0.49 (0.32 – 0.77)		0.54 (0.35 – 0.85)	
Traitement systémique chez les patients RH+ (n = 98)	Hormonothérapie (n = 35)	1		1	
	Monochimiothérapie (n = 28)	1.21 (0.64 – 2.04)	<0.001	0.84 (0.49 – 1.57)	0.005
	Polychimiothérapie (n = 35)	0.41 (0.31 – 0.78)		0.49 (0.35 – 0.89)	
Radiothérapie mammaire pseudo-adjuvante avant 1ère progression (n = 48)		0.51 (0.34 – 0.76)	< 0.001	0.78 (0.53 – 1.14)	0.208
Traitement local de site métastatique avant 1ère progression (n = 18)		0.71 (0.46 – 1.10)	0.129	1.08 (0.70 – 1.67)	0.703

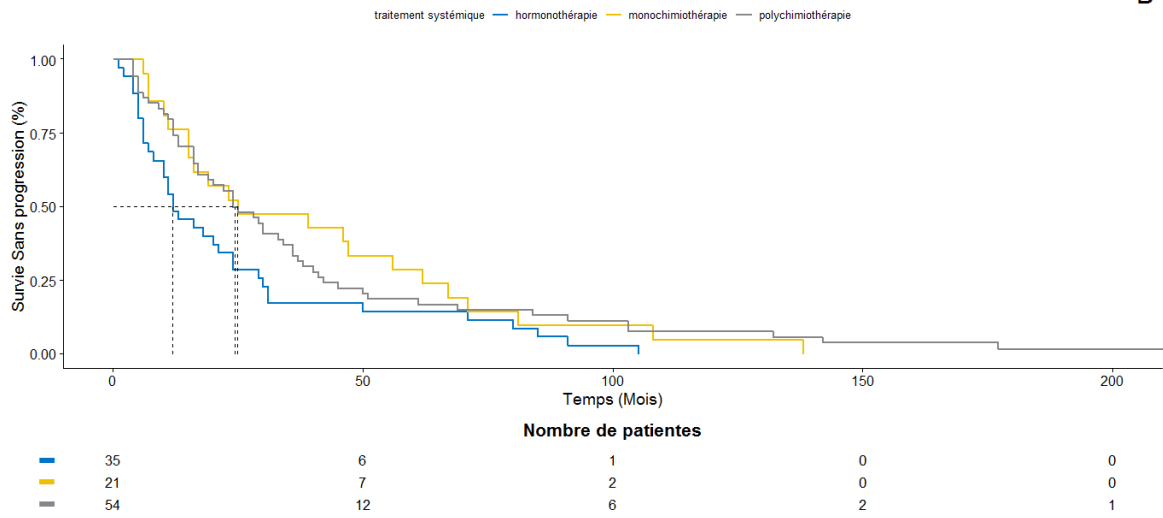
Survie Sans Progression

A



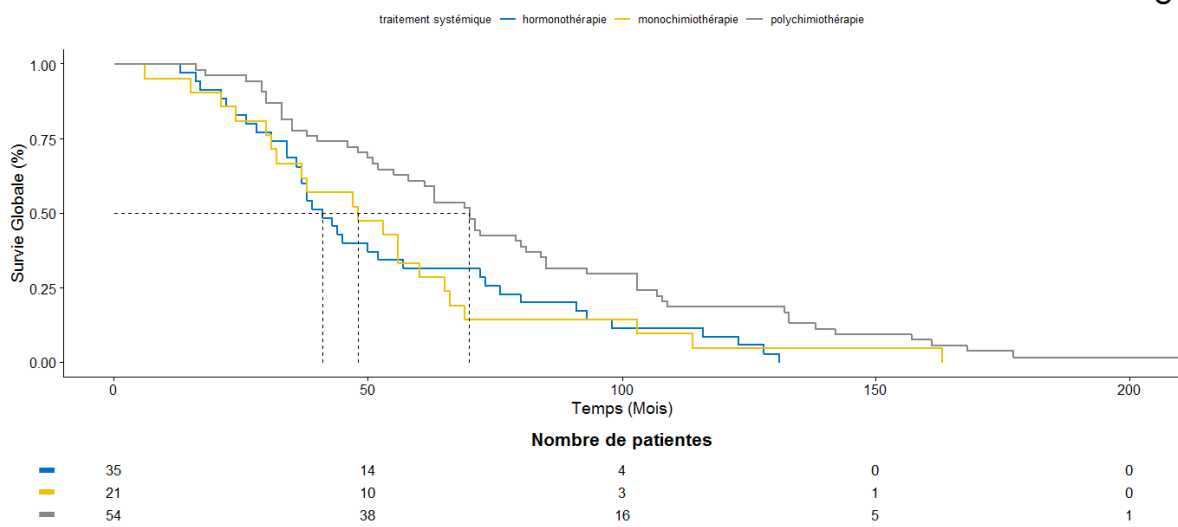
SSP en fonction du traitement systémique

B



SG en fonction du traitement systémique

C



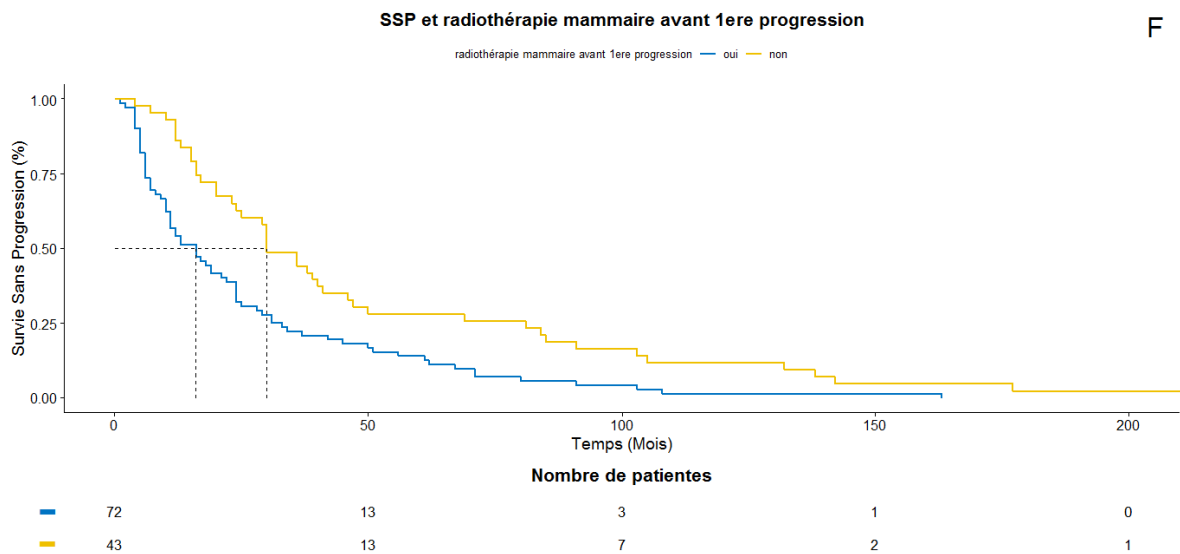
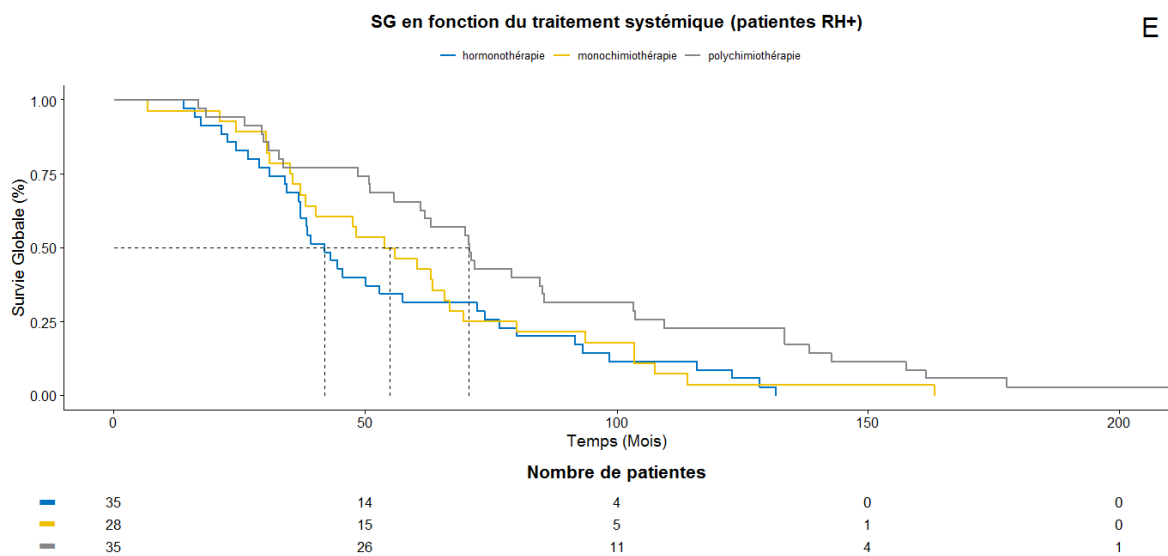
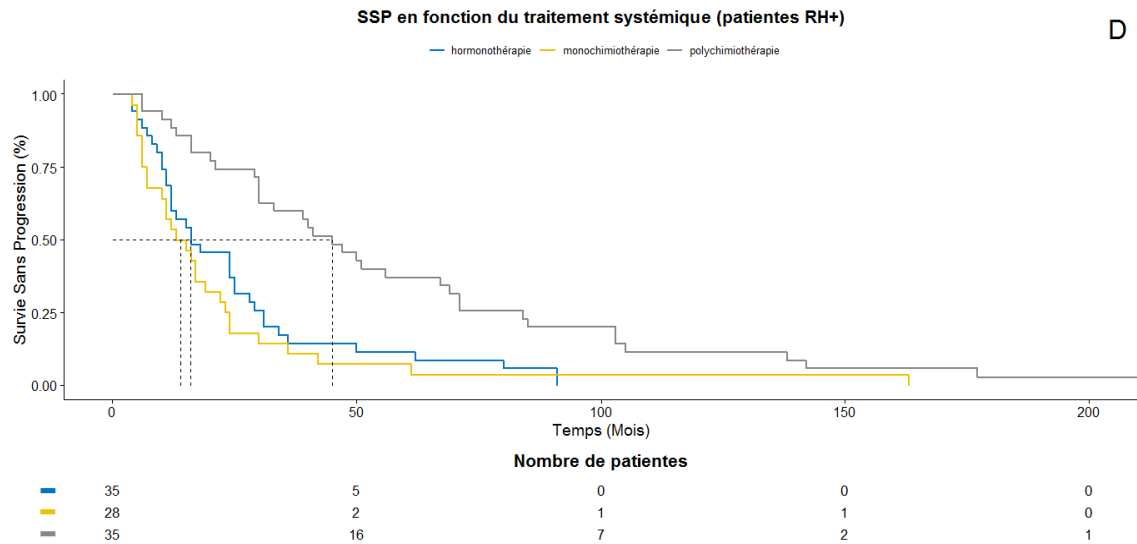


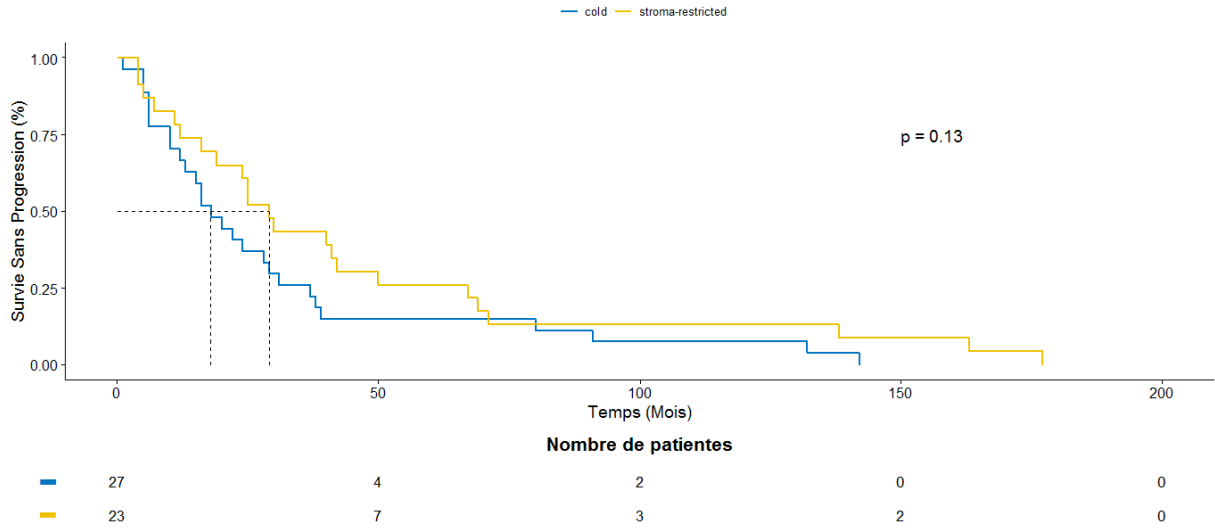
Figure 14. A : Impact de la chirurgie mammaire avant 1^{ère} progression locale ou à distance sur la survie sans progression. B/C : Survie sans progression/globale en fonction du type de 1^{er} traitement systémique. D/E : Survie sans progression/globale en fonction du type de 1^{er} traitement systémique chez les patientes RH+. F : Impact de la radiothérapie mammaire post-opératoire sur la survie sans progression

Impact de l'infiltrat immun des tumeurs primitives

Nous avons étudié l'impact sur la survie des TILs évalués sur colorations standards H&E au niveau de la tumeur primitive *de novo* OM. Après retrait des 2 tumeurs « fully inflamed » et des 2 tumeurs « margin-restricted » en raison d'un trop petit nombre d'évènements, la configuration spatiale de l'infiltrat immun « stroma-restricted » n'apparaît pas pronostique de la SSP (HR 0.65, $p = 0.130$) ou de la SG (HR 0.86, $p = 0.820$) par rapport à une configuration « cold » (Figure 12). La présence de TILs au niveau de la tumeur primitive *de novo* OM n'influence pas non plus la survie des patientes dans notre cohorte. Un taux $>5\%$ de TILs, correspondant au taux médian chez les patientes dans notre cohorte, n'a pas de valeur pronostique sur la SSP (HR 0.73, $p = 0.289$) ou la SG (HR 0.74, $p = 0.306$). De même, un taux $> 10\%$ n'influence pas la SSP (HR 0.63, $p = 0.241$) ou la SG (HR 0.79, $p = 0.529$) dans notre étude. En revanche, chaque 10% supplémentaires de lymphocytes infiltrant la tumeur est associé à une meilleure SSP (HR 0.10, $p = 0.043$), sans impact statistiquement significatif sur la SG (HR 0.10, $p = 0.115$).

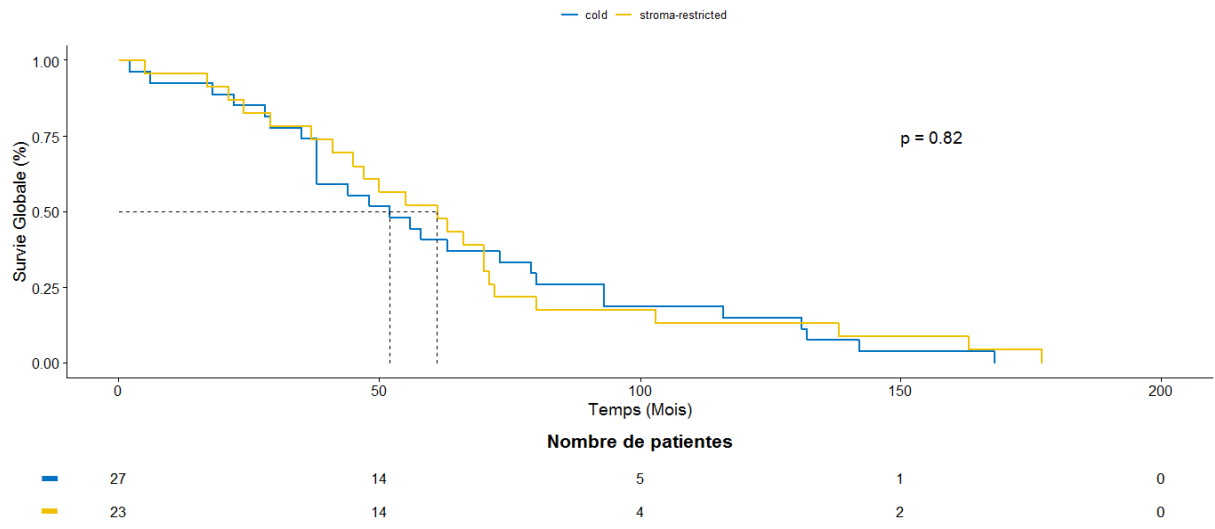
SSP et configuration spatiale de l'infiltrat immun

A



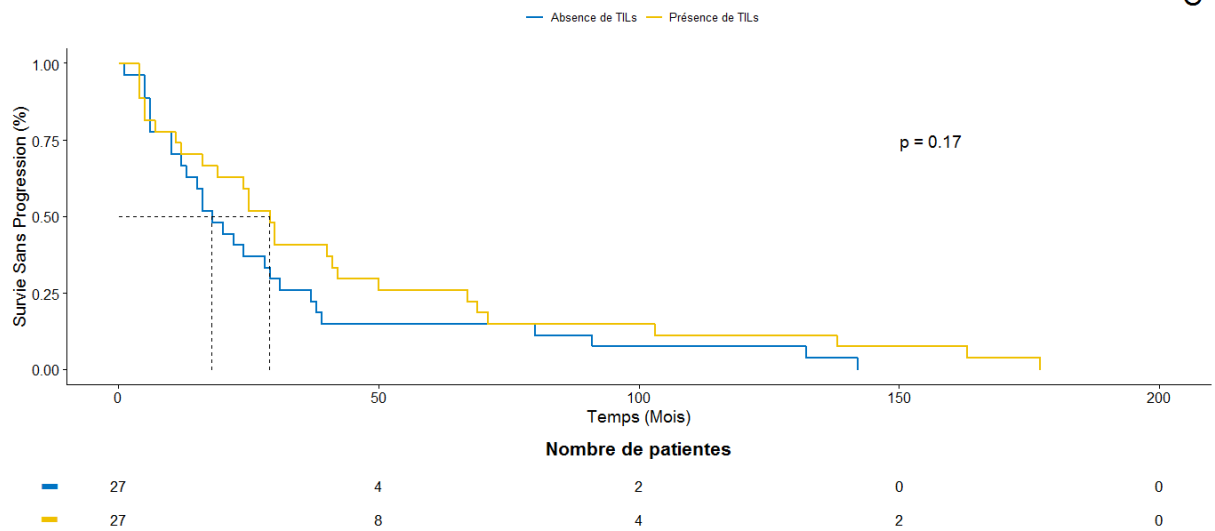
SG et configuration spatiale de l'infiltrat immun

B



SSP et présence de TILs

C



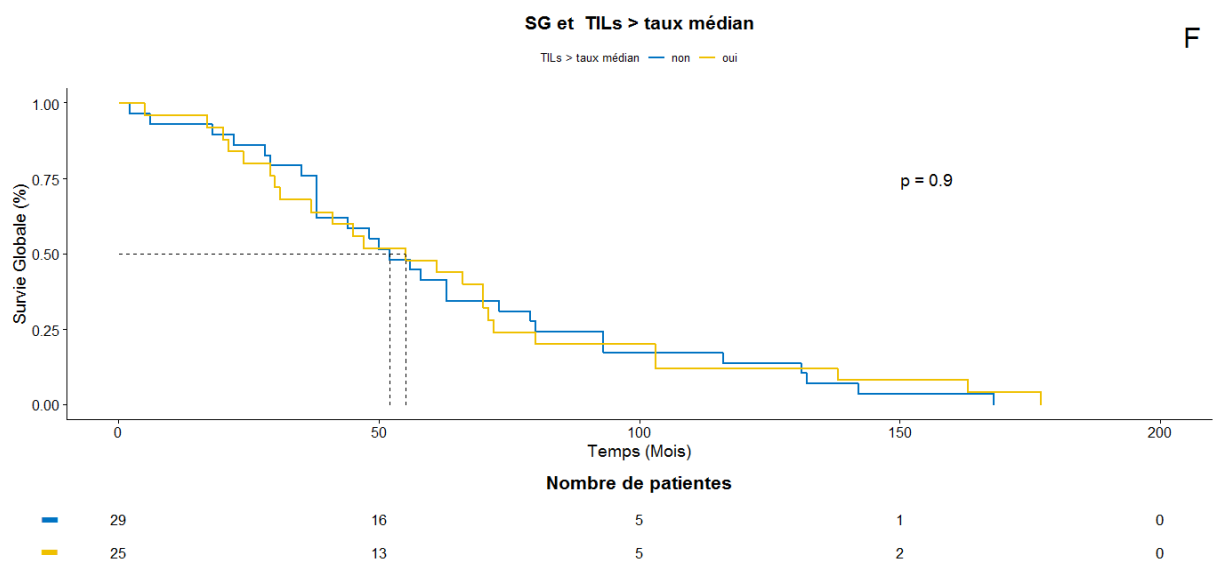
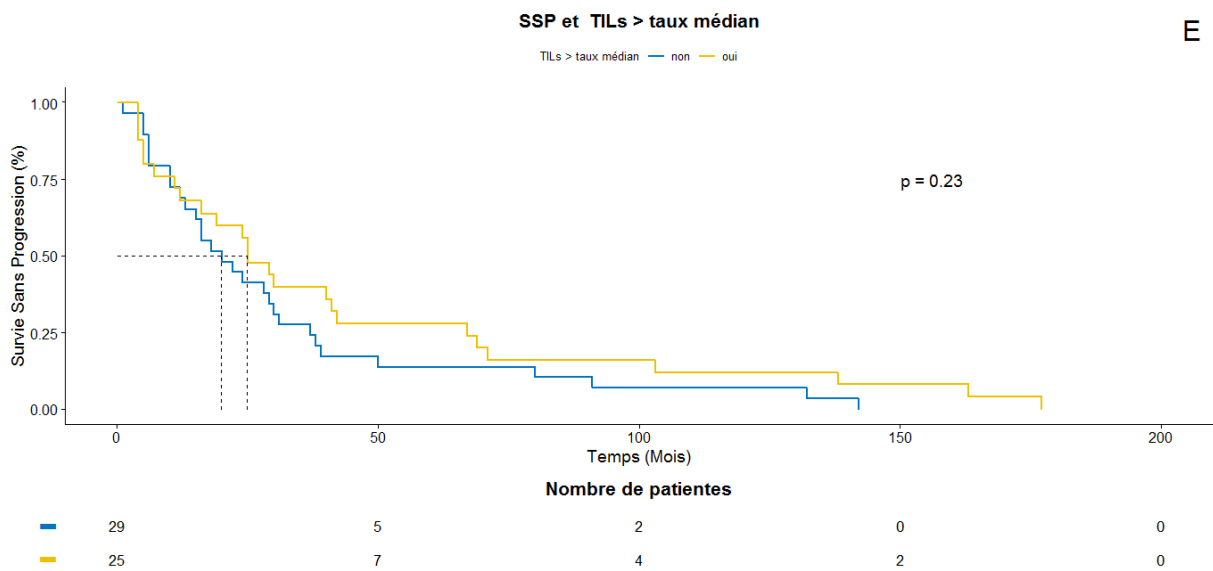
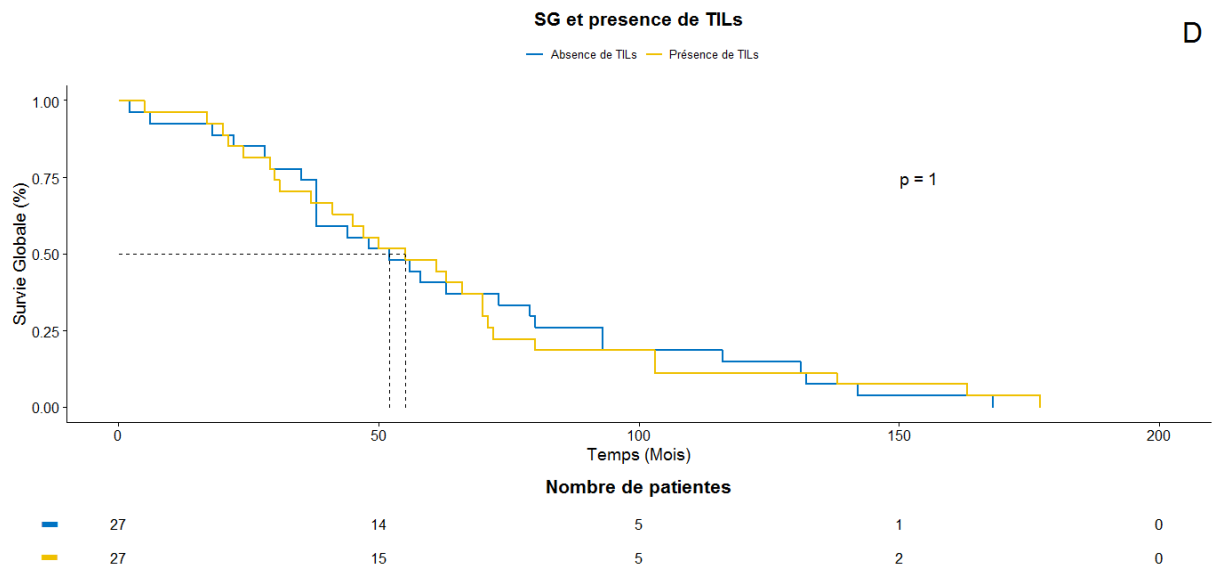


Figure 15. A/B : Impact de la configuration spatiale des TILs au niveau de la tumeur primitive *de novo* OM sur la SSP/SG. B/C : Impact de la présence de TILs au niveau de la tumeur primitive *de novo* OM sur la SSP/SG. D/E : Impact de la présence de TILs à un taux supérieur à la médiane au niveau de la tumeur primitive *de novo* OM sur la SSP/SG

Nous avons ensuite évalué l'impact pronostic de la composition de l'infiltrat immunitaire retrouvé en IHCm dans notre cohorte de patientes *de novo* OM (Tableau 11). Les taux de lymphocytes T CD4+ et de macrophages CD68+ n'influencent pas la SSP ou la SG dans notre cohorte. En revanche, un taux croissant de lymphocytes T CD8+ est en faveur de meilleures SSP et SG. Ainsi, une infiltration supérieure au taux médian de 4% est fortement associée à une meilleure SG, sans impact statistiquement significatif sur la SSP. Cet impact pronostic favorable est également retrouvé pour les iCD8 et les sCD8. La présence de lymphocytes B CD20+ totaux (tCD20) ne semble pas influencer le pronostic dans notre cohorte mais de manière intéressante, la présence de lymphocytes B iCD20+ est quant à elle fortement associée à une moins bonne SSP, sans impact sur la SG alors que la présence de lymphocytes B sCD20+ n'influence pas le devenir. Enfin, la présence de lymphocytes T régulateurs tFoxP3+ améliore la SG sans influencer la SSP. Nos analyses suggèrent que c'est le taux de lymphocytes T régulateurs sFoxP3+ au niveau stromal qui influence la SG et même la SSP alors que la présence et le taux de iFoxP3 au niveau intra-tumoral n'a pas d'impact sur le devenir des patientes.

Tableau 11. Impact pronostic sur la survie sans progression et la survie globale des différents sous-types immuns détectés en IHCm sur tumeur primitive de patientes *de novo* oligométastatiques.

Sous-type immunitaire		Stromal		Intra-tumoral		Total (stromal + intra-tumoral)	
		SSP	SG	SSP	SG	SSP	SG
CD4	Taux (+1 %)	HR 1.02 p = 0.457	HR 1 p = 0.807	HR 1.15 p = 0.128	HR 0.97 p = 0.761	HR 1.02 p = 0.471	HR 0.99 p = 0.964
	Taux > médiane	HR 0.54 p = 0.129	HR 0.50 p = 0.07	HR 1.45 p = 0.345	HR 0.95 p = 0.899	HR 0.84 p = 0.653	HR 0.64 p = 0.234
CD8	Taux (+1 %)	HR 0.92 p = 0.006	HR 0.93 p = 0.013	HR 0.90 p = 0.046	HR 0.88 p = 0.041	HR 0.91 p = 0.017	HR 0.91 p = 0.018
	Taux > médiane	HR 0.53 p = 0.108	HR 0.48 p = 0.071	HR 0.56 p = 0.142	HR 0.35 p = 0.009	HR 0.50 p = 0.091	HR 0.34 p = 0.009
FoxP3	Taux (+1 %)	HR 0.81 p = 0.034	HR 0.80 p = 0.019	HR 1.02 p = 0.913	HR 0.78 p = 0.357	HR 0.81 p = 0.073	HR 0.78 p = 0.036
	Taux > médiane	HR 0.64 p = 0.272	HR 0.60 p = 0.198	HR 1.32 p = 0.548	HR 1.01 p = 0.978	HR 0.66 p = 0.293	HR 0.44 p = 0.038
CD20	Taux (+1 %)	HR 0.95 p = 0.207	HR 0.94 p = 0.116	HR 2.14 p = 0.001	HR 1.16 p = 0.392	HR 0.92 p = 0.249	HR 0.89 p = 0.097
	Taux > médiane	HR 0.75 p = 0.465	HR 0.55 p = 0.135	HR 11.13 p = 0.001	HR 2.36 p = 0.188	HR 0.92 p = 0.249	HR 0.89 p = 0.097
CD68	Taux (+1 %)	HR 1.01 p = 0.694	HR 1.02 p = 0.640	HR 1.05 p = 0.196	HR 1.04 p = 0.293	HR 1.07 p = 0.185	HR 1.04 p = 0.425
	Taux > médiane	HR 0.95 p = 0.909	HR 1.04 p = 0.901	HR 1.25 p = 0.538	HR 1.12 p = 0.750	HR 1.76 p = 0.128	HR 1.40 p = 0.360

Facteurs pronostiques en analyse multivariée

Les données d'IHCm n'ont pu être incluses dans l'analyse multivariée en raison d'un nombre d'évènements trop faible (IHCm chez 31/115 patientes). Le grade histopronostique SBR 3 reste associé à une moins bonne SSP et une moins bonne SG. La chirurgie mammaire avant 1^{ère} progression reste également significativement associée à une meilleure SSP mais pas à la SG. L'utilisation de polychimiothérapie améliore la SSP et s'approche de la significativité statistique pour la SG. Le CA 15-3 et la radiothérapie mammaire post-opératoire n'ont pas d'impact pronostic sur la SSP ou la SG en analyse multivariée. Les résultats sont résumés dans le Tableau 12.

Tableau 12. Analyse multivariée des facteurs pronostiques pour le cancer du sein *de novo* oligométastatique.

Facteurs pronostiques en analyse multivariée	SSP		SG	
	HR (95% IC)	P value	HR (95% IC)	P value
Grade histopronostique SBR > 2	2.49 (2.05 – 3.03)	0.002	2.58 (2.18 – 3.06)	< 0.001
CA 15-3 > Normal	1.23 (0.58 – 2.58)	0.458	0.90 (0.17 – 4.55)	0.724
Chirurgie mammaire avant 1 ^{ère} progression	0.41 (0.30 – 0.54)	0.014	1.07 (0.72 – 1.60)	0.839
Utilisation de polychimiothérapie	0.44 (0.34 – 0.56)	0.012	0.57 (0.31 – 1.02)	0.056
Radiothérapie mammaire post-opératoire	0.92 (0.56 -1.52)	0.799	1.03 (0.80 – 1.32)	0.899

De façon intéressante, l'infiltration par des lymphocytes T CD8+ > 4% (infiltration médiane) reste significativement associée à une meilleure SG (HR 0.33, p =0.002) en analyse multivariée incluant le grade, la chirurgie mammaire avant 1^{ère} progression et l'utilisation de polychimiothérapie.

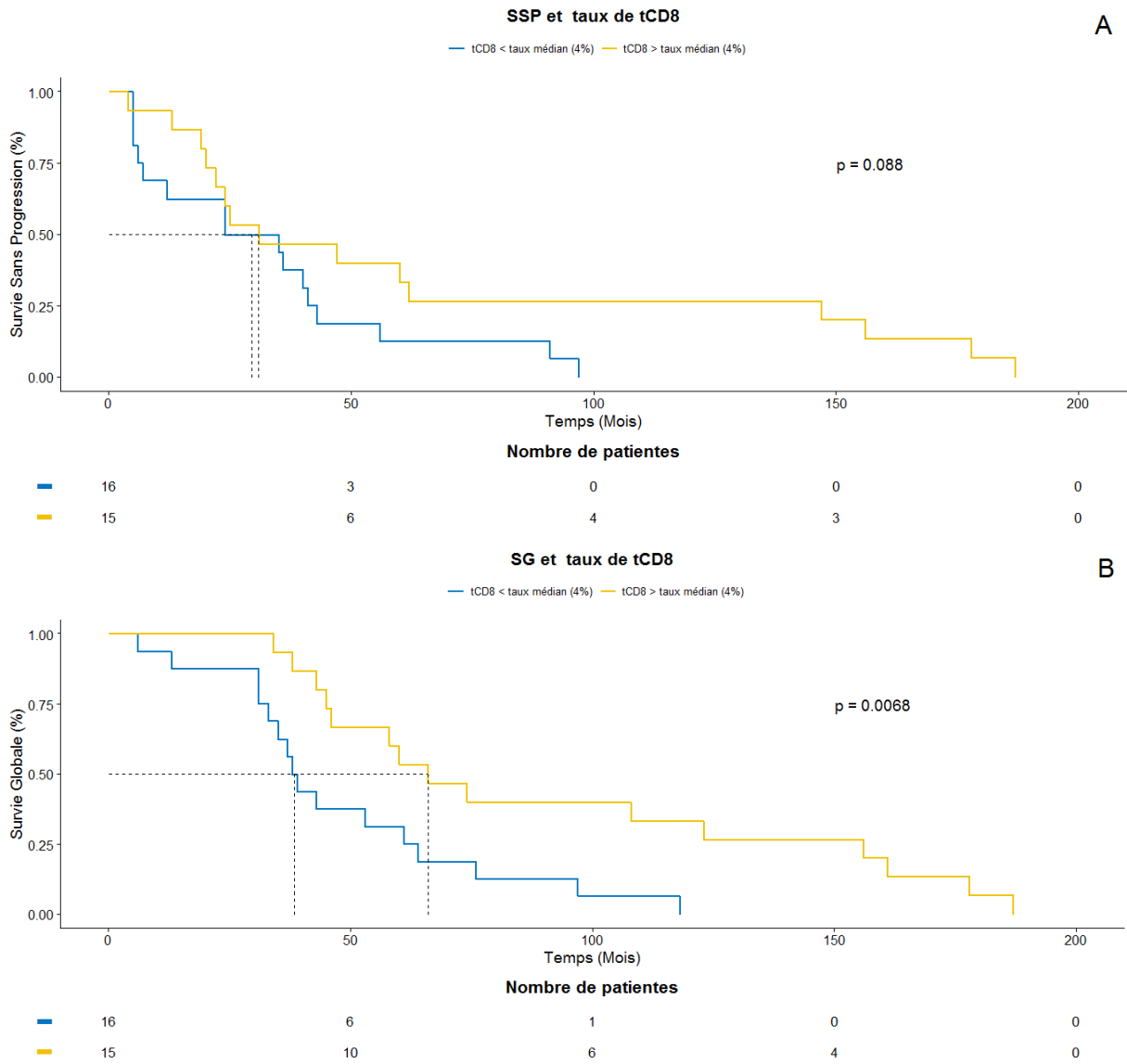


Figure 16. A/B : SSP/SG en fonction du taux de lymphocytes T CD8+ totaux (stroma + intra-tumoral) en IHCm dans la tumeur primitive *de novo* oligométastatique

Discussion

Ce travail est une des premières études s'intéressant spécifiquement à l'infiltration immune tumorale dans le cancer du sein *de novo* OM. L'inclusion de patientes non sélectionnées pour un traitement permet de décrire de façon objective les caractéristiques au diagnostic mais également la prise en charge thérapeutique et les données de survie de ces patientes dans deux centres spécialisés.

Cancer du sein *de novo* oligométastatique : une entité à part entière ?

L'âge médian au diagnostic de 55 ans pour les patientes *de novo* OM et 58 ans pour les patientes *de novo* PM contraste avec l'âge médian pour le cancer du sein tous stades confondus, rapporté à 63 ans en France (59). Ceci pourrait s'expliquer par un « effet centre », les patientes plus jeunes et d'emblée métastatiques étant volontiers adressées aux centres de référence pour le traitement du cancer du sein.

Il est démontré que plus la taille tumorale et/ou l'envahissement ganglionnaire au diagnostic sont importants plus le risque d'atteinte métastatique est élevé (60). Nous notons cependant un nombre non négligeable de patientes avec une tumeur de petite taille (cT1 = 12.2%) et/ou sans envahissement ganglionnaire (cN0 = 33.9%). De plus, le grade histopronostique est faible/intermédiaire chez la moitié des patientes, contrastant avec l'agressivité attendue d'une tumeur diagnostiquée d'emblée à un stade métastatique. Le stade T/N peu avancé et le grade histopronostique faible/intermédiaire sont interpellant et remettent en cause l'hypothèse d'un processus métastatique lié à l'extension à distance d'une maladie localement avancée. Ceci est en faveur, au moins pour certains cancers du sein *de novo* métastatiques, d'une maladie d'emblée systémique en accord avec la théorie systémique de Fisher (61).

Près de la moitié des patientes *de novo* OM ont une lésion unique et la grande majorité n'ont qu'un site métastatique atteint, témoignant d'une véritable limitation de la

dissémination métastatique. De façon attendue, le squelette osseux est le plus fréquemment touché (62/115, 53.9%) (62). En revanche, on observe un taux important d'atteinte hépatique dans nos deux cohortes, supérieur aux 30% habituellement rapportés et un taux moins important d'atteinte pulmonaire, habituellement le 2^{ème} site métastatique aux alentours de 35% dans la littérature. Ceci pourrait correspondre à un tropisme particulier pour le foie de la maladie *de novo* métastatique, qui contrasterait avec celui des récurrences métastatiques représentant la majorité des cas de cancers du sein métastatiques.

L'analyse des caractéristiques au diagnostic de nos deux cohortes montre que celles-ci sont comparables pour les critères cliniques et anatomopathologiques. En revanche, elles semblent se distinguer par leurs critères biologiques, notamment le reflet de la charge tumorale par les taux de LDH et de CA 15-3, plus souvent élevés chez les patientes PM. Un taux élevé chez une patiente étiquetée OM pourrait donc refléter une maladie PM non identifiée par les limites des examens d'imagerie actuels.

Notre travail révèle l'hétérogénéité de prise en charge thérapeutique des patientes atteintes d'un cancer du sein *de novo* OM. En effet, différentes stratégies thérapeutiques ont été proposées, allant de la prise en charge par hormonothérapie palliative seule (9/115, 7.8%) à un traitement multimodal intégrant polychimiothérapie, chirurgie de primitif et traitement local des métastases avant 1^{ère} progression (15/115, 13%). Ceci reflète bien la difficulté de prise en charge de cette présentation particulière, sans recommandations précises.

Enfin, notre analyse de survie met en évidence le pronostic favorable des patientes *de novo* OM. En effet, nous observons une SSP médiane de 23.9 mois, proche des 24.8 mois observés dans l'essai clinique PALOMA-2 chez les patientes RH+/HER2- traitées par palbociclib et letrozole en 1^{ère} ligne, représentant la meilleure SSP rapportée, alors

qu'aucune de nos patientes n'a bénéficié de ce « nouveau » traitement (63). De même, la SG médiane de 50.4 mois est nettement supérieure à ce qui est rapporté dans la littérature pour l'ensemble des patientes métastatiques, rapportée par exemple à 37.2 mois dans l'étude prospective observationnelle française ESME-MBC, incluant l'ensemble des patientes diagnostiquées pour un cancer du sein métastatique entre 2008 et 2014 (64). Toutefois, l'analyse des extrêmes (SSP : 1 – 221 mois ; SG : 2 - 221 mois) met en évidence une évolution variable des patientes *de novo* OM, certaines progressant rapidement (24/115 progressant dans la 1^{ère} année) tandis que d'autres présentent une maladie plus indolente (24/115 n'ayant jamais progressé durant un suivi de 24 à 221 mois). L'évolution variable de ces patientes et l'hétérogénéité des attitudes thérapeutiques soulignent l'intérêt d'identifier des facteurs pronostiques qui permettraient de mieux distinguer les patientes présentant une maladie OM vraie d'une maladie en cours de dissémination PM et ainsi proposer une prise en charge plus personnalisée.

L'identification de facteurs pronostiques est un élément essentiel permettant de guider la prise en charge thérapeutique des patientes atteintes de cancer du sein, que ce soit au stade localisé ou métastatique. Les données de la littérature démontrent cependant que certains facteurs associés à la survie dans le cancer du sein localisé ne sont plus relevant au stade métastatique (Tableau 1) (65,66). Le cancer du sein *de novo* OM représente une situation intermédiaire, il est donc important de rechercher les facteurs pronostiques spécifiques à celle-ci. Notre cohorte, bien que rétrospective, a l'avantage de représenter les patientes de la pratique courante, non sélectionnées pour un traitement.

Notre travail démontre que les facteurs pronostiques validés pour le cancer localisé tels que l'âge, le stade T/N ou le sous-type n'influencent pas la survie des patientes

de novo OM. L'extension métastatique, représentée par le nombre de lésions et de sites métastatiques atteints, que l'on pouvait penser déterminante, n'apparaît pas non plus associée au devenir de ces patientes. L'atteinte hépatique par exemple, fortement représentée dans notre cohorte et habituellement de pronostic péjoratif, n'influence pas la survie des patientes *de novo* OM. De même, les taux de LDH et de CA 15-3 ne sont pas associés au pronostic dans notre étude, indiquant que la charge tumorale n'est pas un bon reflet du devenir de cette maladie particulière. Ainsi, parmi les données disponibles en routine au diagnostic, seul le grade histopronostique SBR 3 est associé à une moins bonne SSP et SG en analyse multivariée, ce qui laisse penser que le devenir des patientes *de novo* OM est lié à l'agressivité de la maladie plus qu'à l'extension métastatique en soi.

L'analyse de l'impact pronostic de la stratégie thérapeutique est particulièrement intéressant et met en évidence un réel bénéfice à une prise en charge « agressive ». En effet, une chirurgie de la tumeur primitive et l'administration de polychimiothérapies améliorent la SSP de ces patientes. L'absence de bénéfice en SG pour la polychimiothérapie (proche de la significativité statistique, $p = 0.056$) pourrait s'expliquer par le manque de puissance de notre cohorte, les données manquantes réduisant l'effectif à 72 patientes pour l'analyse multivariée. Ces résultats représentent néanmoins un argument supplémentaire pour une prise en charge multimodale « agressive » chez les patientes *de novo* OM en état de le tolérer, option proposée dans les dernières recommandations de l'ESMO (35).

L'ensemble de nos données indique que le cancer du sein *de novo* OM représente vraisemblablement une entité à part entière avec des facteurs pronostiques propres. Comme précédemment évoqué, deux hypothèses pourraient expliquer la présentation et l'évolution particulières de cette maladie : un défaut d'acquisition d'une des étapes

de la cascade métastatique et/ou un certain contrôle de la dissémination par le système immunitaire. Nous avons exploré cette dernière par l'analyse de l'infiltrat immun des tumeurs primitives *de novo* OM, qui pourrait potentiellement ouvrir la porte à des traitements déjà disponibles, tels que les inhibiteurs de point de contrôle.

Infiltrat immunitaire dans le cancer du sein *de novo* oligométastatique : un acteur clé ?

Ces dernières années ont été le témoin de nombreux efforts visant à déterminer le rôle pronostic et prédictif de l'infiltrat lymphocytaire dans le cancer du sein. Il en ressort que la présence de TILs est associée à un taux plus élevé de réponse pathologique complète après chimiothérapie néo-adjuvante pour tous les sous-types et à une meilleure survie pour les sous-types HER2+ et TNBC aux stades localisé et métastatique (67).

Dans notre cohorte, la moitié des tumeurs primitives *de novo* OM sont dénuées de TILs et lorsque présents, ceux-ci se limitent principalement au stroma. La configuration spatiale de cet infiltrat immun ou la présence de TILs sur lames H&E n'ont pas démontré d'impact sur la survie (excepté un bénéfice en SSP par incrément de 10% de TILs). Ces résultats sont à nuancer par le faible effectif de patientes pour lesquelles du matériel tumoral était disponible (54/115) et par le fait que la majorité correspondait à une tumeur LUMINALE (38/54), pour lesquelles la valeur pronostique des TILs est encore controversée(68). Une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence de bénéfice en survie en présence de TILs correspond à la possibilité d'infiltration par des cellules immunosuppressives. En effet, les TILs peuvent avoir une activité pro- ou anti-tumorale, leur étude sur lames H&E ne permettant pas de les distinguer. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons donc réalisé un phénotypage des cellules immunitaires par IHCm.

L'IHCm est une technique particulièrement intéressante pour la caractérisation des TILs, avec de nombreux avantages par rapport aux techniques plus classiques d'étude des protéines *in situ*. Premièrement, elle permet le maintien de l'architecture tissulaire, permettant l'analyse des interactions cellulaires. De plus, elle permet une économie de matériel tumoral par rapport à l'IHC monoplex nécessitant la réalisation de coupes successives pour chaque marqueur. L'utilisation de fluorophores permet d'augmenter le nombre de marquages et de visualiser d'éventuelles co-expressions, rapidement limités avec les chromogènes qui posent le problème de chevauchement rendant la lecture de la lame difficile. Enfin, le Tyramide permet de détecter des signaux faibles grâce à une importante amplification du signal et d'empêcher leur dégradation au fur et à mesure des lavages successifs. Malgré les quelques difficultés techniques (décollement des tissus lors des bains successifs), notre travail démontre qu'il s'agit d'une technique réalisable sur échantillons FFPE de tumeur mammaire, même anciens (2000 à 2016).

L'IHCm montre que les tumeurs primitives *de novo* OM peuvent être infiltrées par l'ensemble des sous-types lymphocytaires de même que par de nombreux macrophages (CD68+), témoignant d'interactions complexes entre les différents acteurs du système immunitaire inné et adaptatif, les cellules tumorales et le micro-environnement tumoral comme illustré par la Figure 10 . Nos résultats suggèrent également que l'IHCm est plus sensible que l'œil de l'anatomopathologiste pour la détection des TILs, ce qui pourrait modifier la classification de certaines tumeurs par rapport à l'étude sur lames H&E.

L'analyse de l'impact pronostic de la composition de l'infiltrat immun révèle que la présence de lymphocytes T CD8+ et/ou T régulateurs FoxP3+ est associée à une meilleure survie. Alors que les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques sont classiquement

associés à un meilleur devenir dans le cancer du sein (69), le rôle des lymphocytes T régulateurs FoxP3+, habituellement considérés comme immunosuppresseurs, est plus controversé (70). L'association à un meilleur devenir en présence de lymphocytes T régulateurs FoxP3+ pourrait s'expliquer par une corrélation à l'infiltration par les lymphocytes T CD8+, comme décrit dans certaines études (71,72). De plus, certains travaux récents suggèrent que les lymphocytes T régulateurs FoxP3+ forment un groupe hétérogène de cellules à la fois immunosuppressives et anti-tumorales, avec une activité anti-tumorale notamment par expression d'Interferon gamma et d'Interleukin-17 (73). Comme pour les lymphocytes T régulateurs FoxP3+, l'infiltration par les lymphocytes B CD20+ dans le cancer du sein est associée à un devenir variable selon les études, avec une possible activité anti-tumorale par sécrétion d'anticorps et d'Interleukins et une possible activité immunosuppressive par inactivation des lymphocytes voisins par la voie du PD-1/PD-L1 (74). Dans notre étude, la présence de lymphocytes B CD20+ est un évènement rare et associé à une moins bonne SSP. Enfin, nous n'avons pas mis en évidence d'impact sur la survie pour les macrophages CD68+, un résultat qui pourrait s'expliquer par le fait que les macrophages associés aux tumeurs peuvent avoir à la fois une activité pro et anti-tumorale selon leur différenciation M1/M2 (75). De manière intéressante, l'infiltration par les lymphocytes T CD8+ reste significativement associée à une meilleure SG en analyse multivariée incluant le grade et les traitements malgré un effectif réduit. Bien qu'exploratoires, ces données soulignent le rôle potentiel du système immunitaire dans la présentation et le devenir de cette maladie et motive la poursuite des investigations en ce sens.

Conclusion et perspectives

Le cancer du sein *de novo* OM, malgré une incidence rare, représente une entité importante parmi les cancers du sein métastatique de par la possibilité d'obtention d'une rémission prolongée. Toutefois, la physiopathologie de cette présentation reste mal connue et des études dédiées sont nécessaires afin d'espérer mieux guider la prise en charge thérapeutique à l'avenir.

Notre travail permet de souligner que ces patientes représentent une entité particulière de cancer du sein, au pronostic plus favorable, avec une maladie plus indolente chez un nombre non négligeable de patientes. Bien que limitée par certains biais, tels que le caractère rétrospectif et hétérogène de la population ou encore l'absence de cas contrôles pour les analyses de l'environnement immunitaire, ce travail présente l'avantage d'étudier une cohorte non sélectionnée représentant des patientes *de novo* OM de la pratique courante. Malgré un effectif limité, certains facteurs associés au pronostic ont été mis en évidence, tels que le grade histopronostique SBR ou encore les traitements proposés. Cette étude suggère qu'un traitement multimodal agressif est à envisager au moins chez certaines patientes, comme proposé par les dernières recommandations de l'ESMO (35).

Notre travail révèle le rôle potentiel de la composition de l'infiltrat immun dans les tumeurs primitives *de novo* OM. Bien qu'exploratoire, l'impact sur la survie des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ pourrait représenter un critère anatomopathologique facilement évaluable en routine et reste à explorer. Enfin, l'IHCm pourrait être utilisée et optimisée afin d'approfondir le rôle du système immunitaire dans le cancer du sein *de novo* OM, notamment par une adaptation des cibles recherchées.

Références

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. nov 2018;68(6):394-424.
2. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1 janv 2016;25(1):16-27.
3. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. sept 2013;24(9):2206-23.
4. Cortet M, Bertaut A, Molinié F, Bara S, Beltjens F, Coutant C, et al. Trends in molecular subtypes of breast cancer: description of incidence rates between 2007 and 2012 from three French registries. *BMC Cancer*. 07 2018;18(1):161.
5. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016. [Internet]. [cité 24 juill 2016]. Disponible sur: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/results_merged/sect_04_breast.pdf
6. Valla M, Vatten LJ, Engstrom MJ, Haugen OA, Akslen LA, Bjørngaard JH, et al. Molecular Subtypes of Breast Cancer: Long-term Incidence Trends and Prognostic Differences. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 1 déc 2016;25(12):1625-34.
7. Howlader N, Cronin KA, Kurian AW, Andridge R. Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. juin 2018;27(6):619-26.
8. Partridge AH, Hughes ME, Warner ET, Ottesen RA, Wong Y-N, Edge SB, et al. Subtype-Dependent Relationship Between Young Age at Diagnosis and Breast Cancer Survival. *J Clin Oncol*. 20 2016;34(27):3308-14.
9. Aalders KC, Postma EL, Strobbe LJ, van der Heiden-van der Loo M, Sonke GS, Boersma LJ, et al. Contemporary Locoregional Recurrence Rates in Young Patients With Early-Stage Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 20 2016;34(18):2107-14.
10. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1 janv 1989;63(1):181-7.
11. de Boer M, van Dijck J a. a. M, Bult P, Borm GF, Tjan-Heijnen VCG. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *J Natl Cancer Inst*. 17 mars 2010;102(6):410-25.
12. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. janv 1994;24(1):41-7.

13. Bartlett JMS, Brookes CL, Robson T, van de Velde CJH, Billingham LJ, Campbell FM, et al. Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *J Clin Oncol*. 20 avr 2011;29(12):1531-8.
14. Colleoni M, Sun Z, Price KN, Karlsson P, Forbes JF, Thürlimann B, et al. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *J Clin Oncol*. 20 mars 2016;34(9):927-35.
15. Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, Ashfield A, Ogston S, Dewar JA, et al. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer*. 4 févr 2014;110(3):565-72.
16. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol*. août 1989;7(8):1120-8.
17. Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol*. 10 déc 2008;26(35):5697-704.
18. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 21 mai 2007;96(10):1504-13.
19. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 11 sept 2001;98(19):10869-74.
20. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, et al. Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *N Engl J Med*. 20 2019;380(25):2395-405.
21. Swenerton KD, Legha SS, Smith T, Hortobagyi GN, Gehan EA, Yap HY, et al. Prognostic factors in metastatic breast cancer treated with combination chemotherapy. *Cancer Res*. mai 1979;39(5):1552-62.
22. Stuart-Harris R, Shadbolt B, Palmqvist C, Chaudri Ross HA. The prognostic significance of single hormone receptor positive metastatic breast cancer: an analysis of three randomised phase III trials of aromatase inhibitors. *Breast*. déc 2009;18(6):351-5.
23. Emi Y, Kitamura K, Shikada Y, Kakeji Y, Takahashi I, Tsutsui S. Metastatic breast cancer with HER2/neu-positive cells tends to have a morbid prognosis. *Surgery*. janv 2002;131(1 Suppl):S217-221.
24. Robertson JF, Dixon AR, Nicholson RI, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Confirmation of a prognostic index for patients with metastatic breast cancer treated by endocrine therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;22(3):221-7.
25. Hortobagyi GN, Smith TL, Legha SS, Swenerton KD, Gehan EA, Yap HY, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. déc 1983;1(12):776-86.

26. Passarelli MN, Newcomb PA, Hampton JM, Trentham-Dietz A, Titus LJ, Egan KM, et al. Cigarette Smoking Before and After Breast Cancer Diagnosis: Mortality From Breast Cancer and Smoking-Related Diseases. *J Clin Oncol*. 20 avr 2016;34(12):1315-22.
27. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, Bhattacharyya A, Anderson AE, Xiao L, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol*. juill 2012;13(7):688-95.
28. Stephens RW, Brünner N, Jänicke F, Schmitt M. The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1-3):99-111.
29. Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 15 oct 2012;18(20):5701-10.
30. O'Leary B, Hrebien S, Morden JP, Beaney M, Fribbens C, Huang X, et al. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nat Commun*. 01 2018;9(1):896.
31. Prat A, Cheang MCU, Galván P, Nuciforo P, Paré L, Adamo B, et al. Prognostic Value of Intrinsic Subtypes in Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer Treated With Letrozole With or Without Lapatinib. *JAMA Oncol*. 1 oct 2016;2(10):1287-94.
32. King TA, Lyman JP, Gonen M, Voci A, De Brot M, Boafó C, et al. Prognostic Impact of 21-Gene Recurrence Score in Patients With Stage IV Breast Cancer: TBCRC 013. *J Clin Oncol*. 10 2016;34(20):2359-65.
33. Dawood S, Broglio K, Ensor J, Hortobagyi GN, Giordano SH. Survival differences among women with de novo stage IV and relapsed breast cancer. *Ann Oncol*. nov 2010;21(11):2169-74.
34. Jain SK, Dorn PL, Chmura SJ, Weichselbaum RR, Hasan Y. Incidence and implications of oligometastatic breast cancer. *JCO*. 20 mai 2012;30(15_suppl):e11512-e11512.
35. Cardoso F, Senkus E, Costa A, Papadopoulos E, Aapro M, André F, et al. 4th ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)†. *Ann Oncol*. 1 août 2018;29(8):1634-57.
36. Kobayashi T, Ichiba T, Sakuyama T, Arakawa Y, Nagasaki E, Aiba K, et al. Possible clinical cure of metastatic breast cancer: lessons from our 30-year experience with oligometastatic breast cancer patients and literature review. *Breast Cancer*. juill 2012;19(3):218-37.
37. Milano MT, Katz AW, Zhang H, Huggins CF, Aujla KS, Okunieff P. Oligometastatic breast cancer treated with hypofractionated stereotactic radiotherapy: Some patients survive longer than a decade. *Radiother Oncol*. févr 2019;131:45-51.
38. Meloni MF, Andreano A, Laeseke PF, Livraghi T, Sironi S, Lee FT, et al. Breast Cancer Liver Metastases: US-guided Percutaneous Radiofrequency Ablation—Intermediate and Long-term Survival Rates. *Radiology*. déc 2009;253(3):861.
39. Friedel G, Pastorino U, Ginsberg RJ, Goldstraw P, Johnston M, Pass H, et al. Results of lung metastasectomy from breast cancer: prognostic criteria on the basis of 467 cases of the International Registry of Lung Metastases. *European journal of cardio-thoracic surgery*. 2002;22(3):335-344.

40. Barral M, Auperin A, Hakime A, Cartier V, Tacher V, Otmezguine Y, et al. Percutaneous Thermal Ablation of Breast Cancer Metastases in Oligometastatic Patients. *Cardiovasc Intervent Radiol*. juin 2016;39(6):885-93.
41. Hellman S, Weichselbaum RR. Oligometastases. *J Clin Oncol*. janv 1995;13(1):8-10.
42. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. août 1989;8(2):98-101.
43. Weichselbaum RR, Hellman S. Oligometastases revisited. *Nat Rev Clin Oncol*. juin 2011;8(6):378-82.
44. Gupta GP, Massagué J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*. nov 2006;127(4):679-95.
45. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*. oct 1970;45(4):773-82.
46. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 19 mars 2004;22(1):329-60.
47. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. oct 2006;6(10):715-27.
48. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 29 2018;379(22):2108-21.
49. Pruneri G, Vingiani A, Denkert C. Tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. *The Breast*. 1 févr 2018;37:207-14.
50. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 29 sept 2006;313(5795):1960-4.
51. Ogiya R, Niikura N, Kumaki N, Bianchini G, Kitano S, Iwamoto T, et al. Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients. *Cancer Sci*. déc 2016;107(12):1730-5.
52. Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM, Ye X, Lu Y, Meeker A, et al. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Hum Pathol*. janv 2016;47(1):52-63.
53. Sobottka B, Pestalozzi B, Fink D, Moch H, Varga Z. Similar lymphocytic infiltration pattern in primary breast cancer and their corresponding distant metastases. *Oncoimmunology* [Internet]. 5 mai 2016 [cité 16 oct 2018];5(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4938373/>
54. Yang B, Chou J, Tao Y, Wu D, Wu X, Li X, et al. An assessment of prognostic immunity markers in breast cancer. *npj Breast Cancer*. 29 oct 2018;4(1):1-9.
55. Nederlof I, de Bortoli D, Bareche Y, Hooijer GKJ, Sotiriou C, van de Vijver MJ, et al. 30Comprehensive evaluation of methodology to assess abundance of immune infiltrates in breast cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 1 mai 2019 [cité 25 nov 2019];30(Supplement_3).

Disponible sur:

https://academic.oup.com/annonc/article/30/Supplement_3/mdz095.002/5488214

56. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* févr 2015;26(2):259-71.
57. Sledge GW. Curing Metastatic Breast Cancer. *JOP.* 1 janv 2016;12(1):6-10.
58. Gruosso T, Gigoux M, Manem VSK, Bertos N, Zuo D, Perlitch I, et al. Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. *J Clin Invest.* 01 2019;129(4):1785-800.
59. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides. :372.
60. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more « personalized » approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* mars 2017;67(2):93-9.
61. Fisher B, Jeong J-H, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. Twenty-Five-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Radical Mastectomy, Total Mastectomy, and Total Mastectomy Followed by Irradiation. *N Engl J Med.* 22 août 2002;347(8):567-75.
62. Ganguli A, DeKoven M, Bonthapally V, Lee WC, Ray S. P1-08-21: Demographic and Clinical Characteristics of Metastatic Breast Cancer Patients and Biomarker-Based Prevalence in the UK, Germany, France, Spain and Italy (EU-5). *Cancer Res.* 15 déc 2011;71(24 Supplement):P1-08-21-P1-08-21.
63. Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im S-A, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine.* 17 nov 2016;375(20):1925-36.
64. Gobbini E, Ezzalfani M, Dieras V, Bachelot T, Brain E, Debled M, et al. Time trends of overall survival among metastatic breast cancer patients in the real-life ESME cohort. *European Journal of Cancer.* 1 juin 2018;96:17-24.
65. Clark GM, Sledge GW, Osborne CK, McGuire WL. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. *J Clin Oncol.* janv 1987;5(1):55-61.
66. Leivonen MK, Kalima TV. Prognostic factors associated with survival after breast cancer recurrence. *Acta Oncol.* 1991;30(5):583-6.
67. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Seminars in Cancer Biology.* 1 oct 2018;52:16-25.
68. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* janv 2018;19(1):40-50.

69. Maimela NR, Liu S, Zhang Y. Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J*. 22 nov 2018;17:1-13.
70. Zhou Y, Shao N, Aierken N, Xie C, Ye R, Qian X, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells in patients with breast cancer: a meta-analysis. *J Cancer*. 1 nov 2017;8(19):4098-105.
71. Correale P, Rotundo M, Vecchio MD, Remondo C, Migali C, Ginanneschi C, et al. Regulatory (FoxP3+) T-cell Tumor Infiltration Is a Favorable Prognostic Factor in Advanced Colon Cancer Patients Undergoing Chemo or Chemoimmunotherapy. *Journal of Immunotherapy*. mai 2010;33(4):435-41.
72. Milne K, Köbel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, et al. Systematic Analysis of Immune Infiltrates in High-Grade Serous Ovarian Cancer Reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as Positive Prognostic Factors. *PLOS ONE*. 29 juill 2009;4(7):e6412.
73. deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. The Prognostic Value of FoxP3+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Cancer: A Critical Review of the Literature. *Clin Cancer Res*. 1 juin 2012;18(11):3022-9.
74. Shen M, Wang J, Ren X. New Insights into Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Breast Cancer: Clinical Impacts and Regulatory Mechanisms. *Front Immunol [Internet]*. 8 mars 2018 [cité 15 déc 2019];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5852074/>
75. Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van den Bossche J, Schouppe E, Mommer C, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7-9):861-7.

Annexe 1. Tableaux et Figures

Tableau 1. Etudes ayant identifié des facteurs pronostiques pour le cancer du sein *de novo* oligométastatique selon la définition de l'ESMO

Définition de la maladie oligométastatique	Nombre de patientes de novo / récidive	Traitement proposé	Données de survie	Facteurs pronostiques	Réf
1 – 5 lésions extra-crâniennes Dans 1 – 3 sites	8/40	SBRT hypofractionnée des métastases	OS médiane : -métastases osseuses exclusives : non atteinte (2.9 – 16.8 ans) -exclusion des métastases osseuses : 3.2 ans (0.5 – 17.9) OS à 5 ans : -métastases osseuses exclusives : 83% -exclusion des métastases osseuses : 31%	Atteinte uniquement osseuse (SG)	(37)
1 – 5 lésions hépatiques (27 ptes avec atteinte extra-hépatique rapportée, nombre de lésions non connu)	8 / 44	Radiofréquence hépatique +/- chir primitif (43/52) +/- chimio (40/52) +/- HT (10/52)	OS médiane 84.5 mois (45.4 – 166.2)	Taille des lésions métastatiques > 2.5cm (SG après radiofréquence)	(38)
1 – 5 lésions extra-crâniennes	20 / 59	Ablation thermique des métastases Traitement systémique (chimio ou HT) 79/79	OS à 2 ans : 95.5% DFS : -médiane 14.2 mois -2 ans : 30.4%	TNBC (survie sans maladie) Taille tumorale des métastases > 4cm (survie sans maladie)	(40)
1 à 3 lésions pulmonaires	Non précisé 407 patientes au total	Chirurgie pulmonaire +/- chirurgie primitif +/- TTT néo-adjuvant / adjuvant +/- TTT systémique palliatif	OS lésion unique : -Médiane 41 mois -5 ans : 44% OS 2 – 3 lésions : -Médiane 33 mois -5 ans : 25%	Chirurgie R0 (SG)	(39)

Tableau 2. Quantification des sous-types cellulaires au niveau total (stromal + intra-tumoral) par IHCm chez 15 patientes *de novo* oligométastatiques classées "cold" sur lames H&E

Patientes	CD4	CD8	CD20	FoxP3	CD68	CK	Autre
1	11%	6%	4%	2%	5%	59%	14%
2	4%	4%	1%	0%	6%	68%	18%
3	8%	2%	1%	3%	13%	53%	19%
4	5%	5%	1%	1%	5%	57%	27%
5	9%	6%	2%	2%	4%	50%	27%
6	7%	2%	0%	1%	6%	57%	28%
7	2%	3%	0%	1%	5%	59%	29%
8	17%	10%	4%	3%	4%	30%	33%
9	3%	1%	7%	0%	6%	49%	33%
10	11%	1%	2%	3%	4%	46%	34%
11	3%	2%	0%	1%	8%	47%	39%
12	8%	5%	2%	3%	13%	21%	48%
13	5%	1%	0%	1%	3%	38%	52%
14	18%	5%	0%	5%	8%	8%	56%
15	11%	4%	11%	1%	1%	9%	62%

Tableau 3. Quantification des sous-types cellulaires au niveau intra-tumoral par IHCm chez 14 patientes *de novo* oligométastatiques classées "stroma-restricted" sur lames H&E

Patientes	iCD4	iCD8	iCD20	iFoxP3	iCD68	iCK	iAutre
1	2%	6%	1%	1%	22%	65%	4%
2	1%	18%	1%	1%	3%	74%	2%
3	2%	4%	0%	1%	7%	63%	23%
4	7%	3%	1%	1%	10%	71%	8%
5	0%	0%	0%	0%	1%	91%	7%
6	3%	9%	0%	1%	4%	72%	12%
7	1%	1%	0%	0%	1%	94%	3%
8	4%	4%	0%	0%	6%	73%	13%
9	1%	1%	0%	1%	1%	81%	14%
10	5%	2%	1%	0%	2%	76%	14%
11	2%	1%	0%	1%	5%	77%	14%
12	2%	12%	0%	2%	7%	70%	6%
13	4%	8%	1%	0%	2%	61%	25%
14	2%	1%	0%	1%	2%	76%	17%

Figure 1. Rôle pro- et anti-tumoral des cellules du système immunitaire inné et adaptatif (extrait de Allard B. et al. Immuno-oncology-101: overview of major concepts and translational perspectives. Semin Cancer Biol. 2018 Oct)

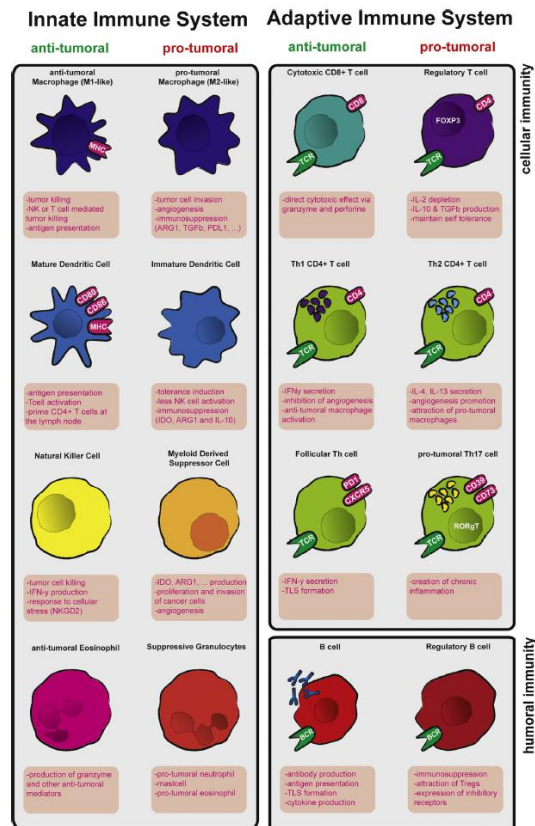


Figure 2. Diagramme de flux pour la cohorte *de novo* oligométastatique

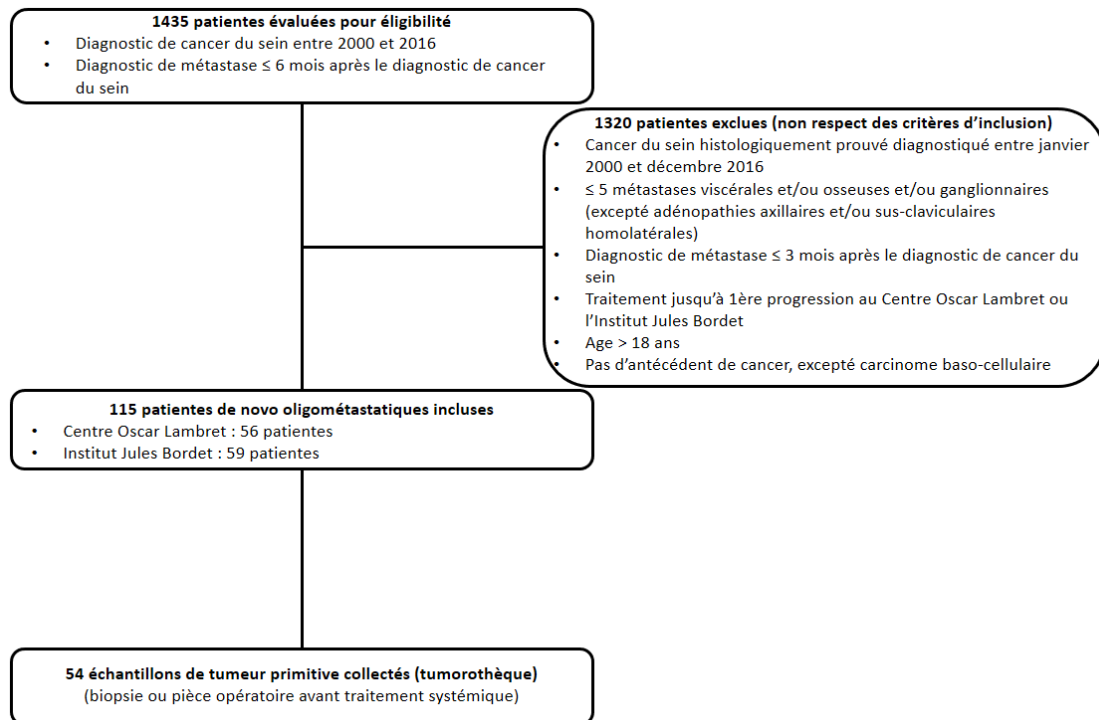
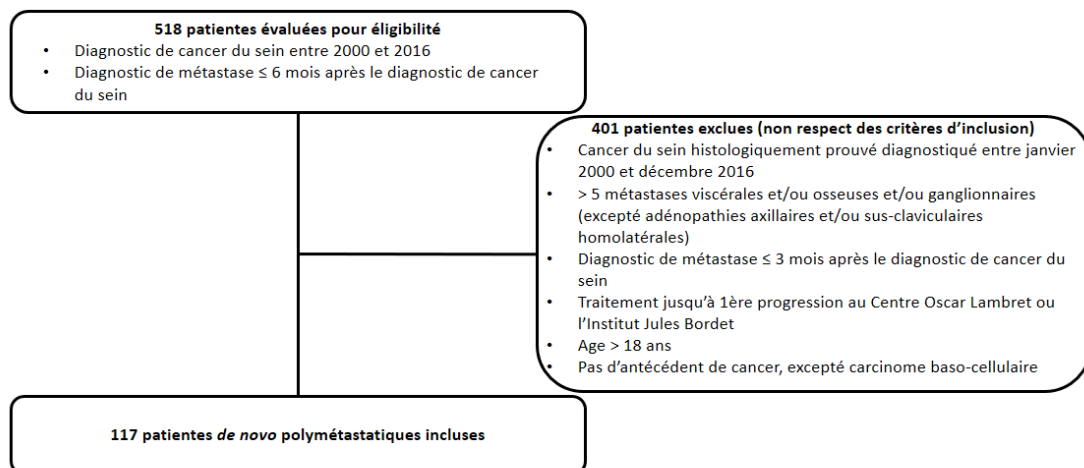


Figure 3. Diagramme de flux pour la cohorte *de novo* polymétastatique



Annexe 2 : Mise au point de la technique d'Immunohistochimie multiplex multispectrale

L'interprétation d'une lame d'immunohistochimie multiplex multispectrale nécessite dans un premier temps la mise au point d'une librairie spectrale qui permettra l'identification précise en fonction de son spectre d'émission de chaque fluorophore lors de l'étape d'«unmixing». Cette mise au point a été réalisée sur un tissu d'amygdale, ce dernier étant un organe lymphoïde particulièrement infiltré par tous les types de lymphocytes. Chaque fluorophore de notre kit Opal 7 Solid Tumor Immunology Kit (Akoya Biosciences) a ainsi été détecté après avoir été couplé à l'anticorps secondaire reconnaissant le CD20, un marqueur de lymphocytes B.

Le deuxième temps de la mise au point de la technique d'immunohistochimie multiplex multispectrale a consisté en la réalisation d'immunohistochimies monoplex pour chaque couple anticorps primaire – fluorophore sur tissu d'amygdale. Plusieurs concentrations d'anticorps primaires et de fluorophore ainsi que plusieurs temps d'incubation de l'anticorps secondaire ont ainsi été testés jusqu'à obtention d'une détection optimale de chaque couple anticorps primaire – fluorophore.

Le troisième temps de mise au point a consisté en la réalisation de la technique d'immunohistochimie multiplex multispectrale sur un tissu d'amygdale. Plusieurs concentrations d'anticorps primaires et de fluorophores ainsi que plusieurs temps d'incubation de l'anticorps secondaire ont ainsi été une nouvelle fois testés jusqu'à obtention d'une détection optimale de chaque couple anticorps primaire – fluorophore sur une même lame. Cette étape permet ainsi d'avoir un contrôle positif de qualité sur tissu d'amygdale qui sera utilisé lors de la réalisation de la technique sur tissu mammaire.

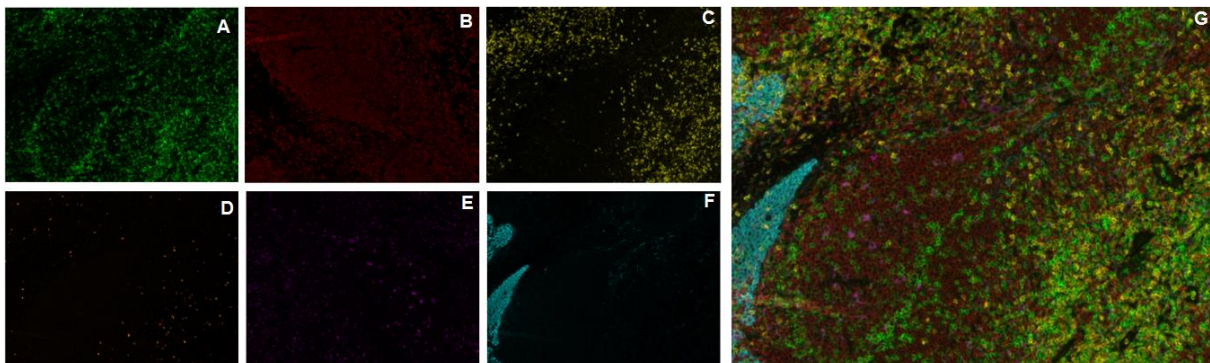


Figure 1. A-F : Immunohistochimies monoplex sur tissu amygdalien. G : Immunohistochimie multiplex sur tissu amygdalien

Annexe 3. Protocole d'Immunohistochimie multiplex multispectrale sur tissu mammaire

Préparation :

- Réalisation de lames superfrost plus/plus de 3,5µm d'épaisseur à partir de chaque bloc FFPE (possibilité de réaliser des lames plus épaisses en cas de pièce opératoire)
- Incubation « overnight » dans 37°C. Possibilité de chauffer les coupes à 60°C au chauffe-plaque durant 1h30 en cas de pièce opératoire afin d'améliorer l'adhérence
- Déparaffinage et réhydratation par passages successifs dans des solutions de xylène (3x10min), de concentrations décroissantes d'éthanol et d'eau distillée
- Fixation des coupes par NBF 4% 20min puis rinçage à l'eau distillée
- Récupération des épitopes par « primary heat-induced epitope retrieval », (HIER) dans une solution d'Antigen Retrieval AR9 diluée à 1 :10 dans de l'eau distillée à 1000 Watts jusqu'à ébullition (environ 1min30) puis 100 Watts durant 15min. Laisser refroidir à température ambiante 20min
- Blocage des sites non spécifiques par incubation avec de l'Antibody Diluent 10min à température ambiante

Cycle 1 :

- Incubation de l'anticorps primaire **anti-CD4 (160ng/mL) 1h30**. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'anticorps secondaire **Opal Polymer HRP 30min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'**Opal Fluorophore 520 dilué à 1 :100** dans de l'Amplification Diluent **10min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Retrait des anticorps par traitement au micro-ondes dans une solution d'Antigen Retrieval AR9 diluée à 1 : 10 dans de l'eau distillée à 1000 Watts jusqu'à ébullition (environ 1min30) puis 100 Watts durant 15min. Laisser refroidir à température ambiante 20min

Cycle 2 :

- Incubation de l'anticorps primaire **anti-CD8 (25.9ng/mL) 1h30**. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'anticorps secondaire **Opal Polymer HRP 30min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'**Opal Fluorophore 570 dilué à 1 :100** dans de l'Amplification Diluent **10min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Retrait des anticorps par traitement au micro-ondes dans une solution d'Antigen Retrieval AR6 diluée à 1 : 10 dans de l'eau distillée à 1000 Watts jusqu'à ébullition (environ 1min30) puis 100 Watts durant 15min. Laisser refroidir à température ambiante 20min

Cycle 3 :

- Incubation de l'anticorps primaire **anti-CD20 1h30**. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'anticorps secondaire **Opal Polymer HRP 10min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'**Opal Fluorophore 540 dilué à 1 :100** dans de l'Amplification Diluent **10min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Retrait des anticorps par traitement au micro-ondes dans une solution d'Antigen Retrieval AR6 diluée à 1 : 10 dans de l'eau distillée à 1000 Watts jusqu'à ébullition (environ 1min30) puis 100 Watts durant 15min. Laisser refroidir à température ambiante 20min

Cycle 4 :

- Incubation de l'anticorps primaire **anti-FoxP3 (1000ng/mL) 1h30**. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'anticorps secondaire **Opal Polymer HRP 30min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'**Opal Fluorophore 620 dilué à 1 :100** dans de l'Amplification Diluent **10min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Retrait des anticorps par traitement au micro-ondes dans une solution d'Antigen Retrieval AR6 diluée à 1 : 10 dans de l'eau distillée à 1000 Watts jusqu'à ébullition (environ 1min30) puis 100 Watts durant 15min. Laisser refroidir à température ambiante 20min

Cycle 5 :

- Incubation de l'anticorps primaire **anti-CD68 (25.9ng/mL) 1h30**. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'anticorps secondaire **Opal Polymer HRP 10min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'**Opal Fluorophore 650 dilué à 1 :100** dans de l'Amplification Diluent **10min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Retrait des anticorps par traitement au micro-ondes dans une solution d'Antigen Retrieval AR6 diluée à 1 : 10 dans de l'eau distillée à 1000 Watts jusqu'à ébullition (environ 1min30) puis 100 Watts durant 15min. Laisser refroidir à température ambiante 20min

Cycle 6 :

- Incubation de l'anticorps primaire **anti-panCK 1h30**. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'anticorps secondaire **Opal Polymer HRP 10min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Incubation de l'**Opal Fluorophore 690 dilué à 1 :100** dans de l'Amplification Diluent **10min** à température ambiante. Rinçage au TBST Wash Buffer 3x2min
- Retrait des anticorps par traitement au micro-ondes dans une solution d'Antigen Retrieval AR6 diluée à 1 : 10 dans de l'eau distillée à 1000 Watts jusqu'à ébullition (environ 1min30) puis 100 Watts durant 15min. Laisser refroidir à température ambiante 20min

Spectral DAPI :

- Rinçage à l'eau distillée 2min puis au TBST Wash Buffer 2min.
- Incubation dans du **DAPI 5min** à température ambiante
- Rinçage au TBST Wash Buffer 2min puis à l'eau distillée 2min

Montage par application du milieu de montage et application d'une lamelle

AUTEUR : Nom : CHRETIEN

Prénom : Sebastian

Date de soutenance : 29 septembre 2020

Titre de la thèse : Analyse translationnelle d'une cohorte de cancer de sein *de novo* oligométastatique

Thèse - Médecine - Lille 2020

Cadre de classement : Oncologie Médicale

DES + spécialité : Oncologie Médicale

Mots-clés : cancer du sein *de novo* oligométastatique ; TILs ; IHC multiplex multispectrale

Résumé

Contexte Le cancer du sein *de novo* oligométastatique (OM), défini par la présence de ≤ 5 lésions métastatiques au diagnostic, est une présentation rare de la maladie. Peu d'études se sont intéressées à cette présentation clinique et leurs résultats sont biaisés par une sélection des patientes et une définition variable de la maladie OM. Le système immunitaire pourrait jouer un rôle dans la présentation et le devenir de ces patientes.

Méthodes Cette étude rétrospective a inclus 115 patientes présentant un cancer du sein *de novo* OM et 117 patientes *de novo* polymétastatique (PM) traitées entre 2000 et 2016 au Centre Oscar Lambret et à l'Institut Jules Bordet. Les caractéristiques d'intérêt au diagnostic ainsi que les stratégies thérapeutiques et les données de survie ont été collectées. L'infiltrat immun des tumeurs primitives *de novo* OM a été évalué par quantification des TILs (Tumor-Infiltrating Lymphocytes, $n=54/115$) et caractérisé par immunohistochimie multiplex multispectrale (IHCm, $n=31/115$) permettant l'identification des lymphocytes T CD4+, CD8+ et FoxP3+, B CD20+ et des macrophages CD68+.

Résultats Les patientes *de novo* OM ont une meilleure survie sans progression et globale, respectivement 23.9 et 54.9 mois, par rapport aux patientes *de novo* PM. Leur présentation se différencie principalement par des taux plus faibles de LDH et CA 15-3 ainsi que par une infiltration moins importante de différents sites métastatiques. Les tumeurs primitives *de novo* OM ont une infiltration médiane par des TILs de 5%, avec 50% des tumeurs sans aucune infiltration. L'analyse par IHCm montre une infiltration possible par tous les sous-types de cellules immunes, avec une prédominance pour les lymphocytes T CD4+/CD8+ et les macrophages CD68+ (médianes de 8, 4 et 5% respectivement). Seuls les lymphocytes T CD8+ et FoxP3+ sont associés à une meilleure survie en analyse univariée, tandis que les lymphocytes B CD20+ intra-tumoraux sont corrélés à une moins bonne SSP. En analyse multivariée, un grade 3 est associé à une moins bonne survie tandis que la chirurgie mammaire et l'utilisation de polychimiothérapie sont associés à une meilleure survie.

Conclusion Notre travail suggère que le cancer du sein *de novo* OM est une entité particulière au pronostic plus favorable. Il souligne l'importance d'une stratégie thérapeutique plus « agressive » chez les patientes en état de le supporter. La composition de l'infiltrat lymphocytaire semble jouer un rôle dans le devenir de ces patientes.

Composition du Jury :

Président : Professeur Nicolas PENEL

Assesseurs : Professeur Éric LARTIGAU, Professeur Laurent MORTIER, Docteur Laurence BUISSERET

Directeur de thèse : Docteur Laurence BUISSERET