2023
22 au 24 novembre
CARREFOUR PATHOLOGIE

Analyse spatiale des résidus tumoraux post-chimiothérapie néoadjuvante dans le cancer du sein triple négatif: focus sur les cas de rechute métastatique rapide

Myriam Kossaï[1,4], Judith Passildas-Jahanmohan[2], Nathalie Lacrampe[1], Ioana Molnar[2], Catherine Abrial[2], Marie-Ange Mouret-Reynier[3], Xavier Durando[2,3,4], Frédérique Penault-Llorca[1,4], Nina Radosevic-Robin[1,4]

[1] Département d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, [2] Division de Recherche Clinique, [3] Département d'Oncologie, Centre Jean Perrin, [4] UMR 1240 INSERM/IMoST, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Centre Jean PERRIN unicancer Clermont Auvergne Métropole
Inserm UMR 1240 IMoST Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques
UCA UNIVERSITÉ Clermont Auvergne

CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF (CSTN)

- 15% des Cancers du sein
- RE-/RP-/HER2-
- Hétérogénéité majeure
- Pronostic péjoratif du à fort potentiel métastatique

Traitement

Chimiothérapie néoadjuvante
+ Immunothérapie

↓

Chirurgie +/- conservatrice
Radiothérapie

Résidu tumoral → Chimiothérapie adjuvante*

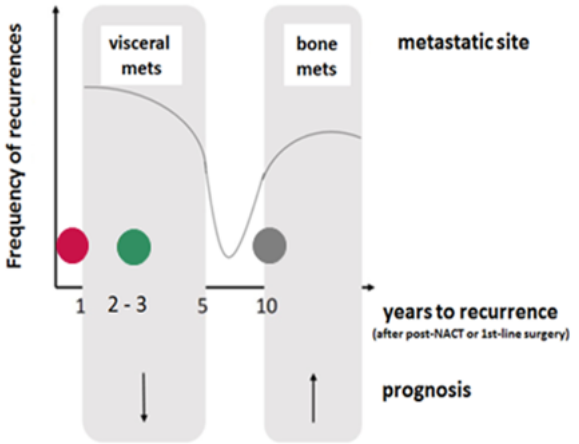
Absence de résidu → Immunothérapie

*Sauf si mutation *BRCA* (10-15%) → anti PARP

Dent et al, Clin. Cancer Res. 2007,Saraiva et coll. ESMO Open 2017; Cortazar P et al . Lancet. 2014 ; Yau C et al. Lancet Oncol. 2022

CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF (CSTN)

- 15% des Cancers du sein
- RE-/RP-/HER2-
- Hétérogénéité majeure
- Pronostic péjoratif du à fort potentiel métastatique



- **RECHUTE RAPIDE (RR)**
- RECHUTE STANDARD (RS)
- RECHUTE TARDIVE

Et pas de rechute (NR)

Traitement

Chimiothérapie néoadjuvante + Immunothérapie

↓

Chirurgie +/- conservatrice
Radiothérapie

Résidu tumoral → Chimiothérapie adjuvante*

Absence de résidu → Immunothérapie

*Sauf si mutation *BRCA* (10-15%) → anti PARP

▪ RECHUTE RAPIDE

- Rechute métastatique dans l'année qui suit la chirurgie post CTNA, ou progression pendant CTNA
- Absence de biomarqueur diagnostique/prédictif de risque de RR
- Hyperprolifératifs, TME froid (Radosevic-Robin et al, NPJ Breast Cancer 2021)
- Evolution fatale
- Pas de traitement spécifique (cibles Th inconnues)

Dent et al, Clin. Cancer Res. 2007,Saraiva et coll. ESMO Open 2017; Cortazar P et al . Lancet. 2014 ; Yau C et al. Lancet Oncol. 2022

Facteurs de risque actuels

- Critères cliniques et histologiques **au diagnostic**
  - Age, classification TNM
  - Index mitotique/Ki67/grade EE histopronostique
- Examen anatomopathologique du résidu post-CTNA **sur la pièce opératoire:**
  - Réponse pathologique complete : pCR
  - Residual cancer burden : RCB
- TILs et RCB-TILs

Ces facteurs sont insuffisants

D'autres biomarqueurs sont nécessaires

Pourquoi les résidus post CTNA ?

nature reviews clinical oncology 2016

Biomarkers of residual disease after neoadjuvant therapy for breast cancer

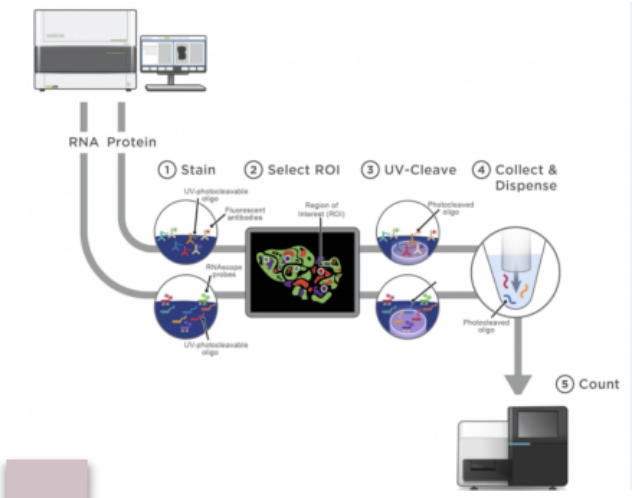
Frederique Penault-Llorca[1,2] and Nina Radosevic-Robin[1,2]

• DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.1

- Modification de la biologie de la tumeur post CTNA
  - Potentiels clones résistants
- Modification quantitative et qualitative
  - Variation de l'expression génique ++ importante
    - Cycle cellulaire/PI3K-mTOR/DNA *repair*/ …
    - CNV et mutations de *MYC, MCL1, JAK2* et *CCND1*
    - Sous-types moléculaires (Lehmann)
    - Transition épithélio-mésenchymateuse induite par CTNA
  - Variation des populations immunes intra-tumorales

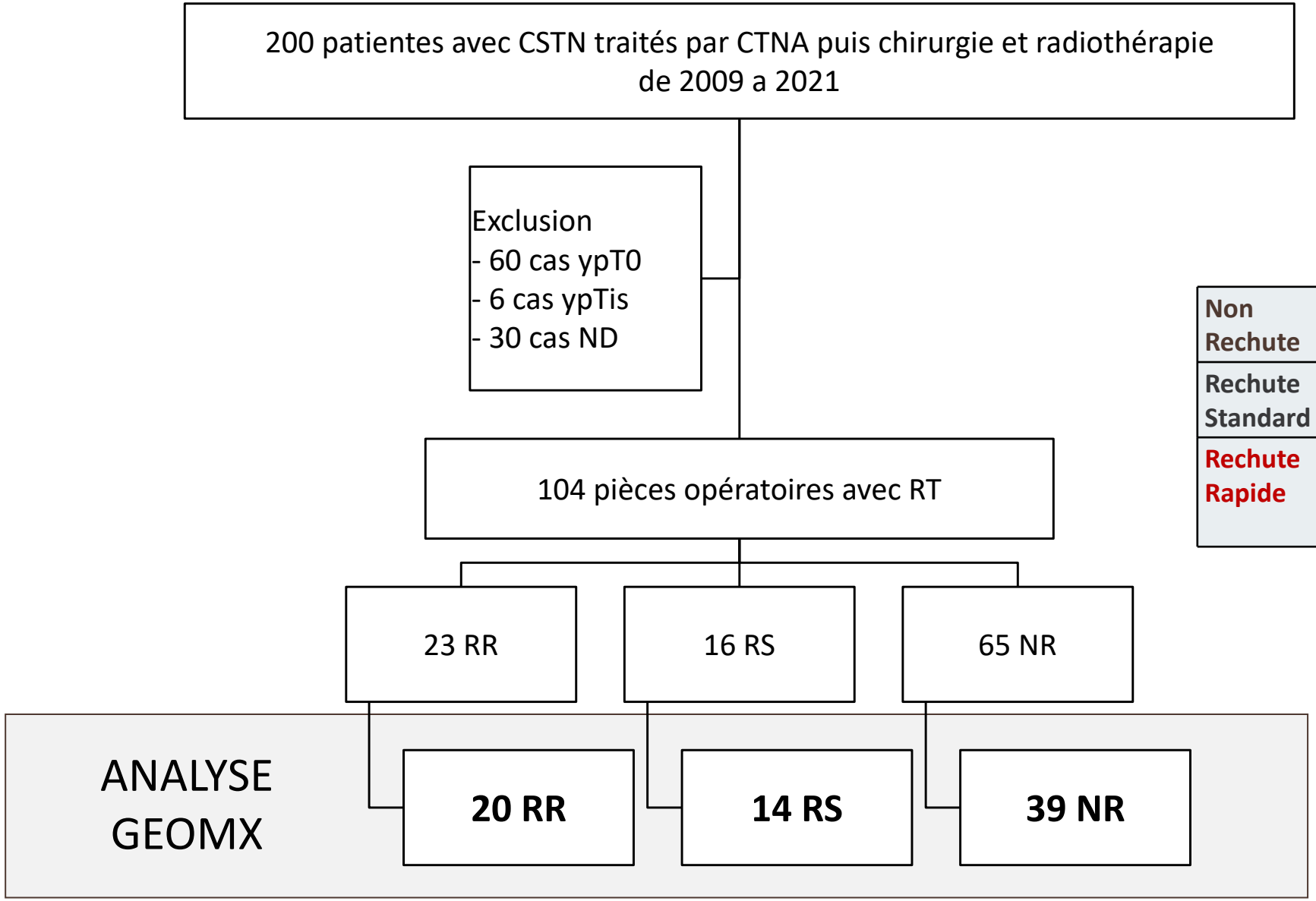
Analyse spatiale et protéique

- Etude rétrospective monocentrique (200 cases)
- Caractérisation spatiale et protéique des CSTN à l'aide du ***GeoMx® Digital Spatial Profiler*** (NanoString Technologies)
- En utilisant les PO post CTNA
- Analyse des TILs
- Analyse IHC complémentaire



Identifier des marqueurs spécifiques ou de potentielles cibles dans les CSTN de rechute rapide

FLOW CHART



Non Rechute	**NR**	Pas de récidive
Rechute Standard	**RS**	Rechute entre 12 mois et 60 mois après la chirurgie post CTNA
Rechute Rapide	**RR**	Rechute ou progression dans l'année qui suit la chirurgie post CTNA

ypT0: pas de résidu tumoral; RT: résidu tumoral; ypTis: carcinome *in situ* après CTNA; ND: non disponible

Caractéristiques clinico-pathologiques des patients

		Rechute Rapide	Rechute Standard	Non rechute
Nombre de cas		20	14	39
Catégorie RCB	1	0	1 (8%)	5 (13%)
	2	10 (50%)	9 (64%)	27 (69%)
	3	10 (50%)	4 (28%)	7 (18%)
ki67	0 - <29%	6 (30%)	5 (36%)	14 (36%)
	≥ 30% - < 79%	5 (25%)	5 (36%)	10 (26%)
	≥ 80%	9 (45%)	4 (29%)	11 (28%)
Score HER2	0	14 (70%)	7 (50%)	21 (54%)
	HER2low	6 (30%)	7 (50%)	18 (46%)
TILs Haut	≥ 10%	7 (35%)	6 (30%)	23 (77%)
TILs Bas	<10%	11 (65%)	8 (70%)	16 (33%)
PD-L1 CT	0	16 (80%)	14 (100%)	32 (82%)
	<1%	3 (15%)	0	2 (5%)
	≥1%	1 (5%)	0	5 (13%)
PD-L1 CI	0	11 (65%)	10 (71%)	26 (67%)
	<1%	3 (15%)	0	3 (9%)
	≥1%	6 (30%)	3 (29%)	10 (26%)
Sox10	<5%	11 (65%)	6 (30%)	24 (62%)
	≥5%	9 (45%)	8 (70%)	15 (38%)

Cas de Rechute Rapide

- CSTN NS
- RCB2 (50%) et RCB3 (50%)
- Ki67 >30% dans 70% des cas

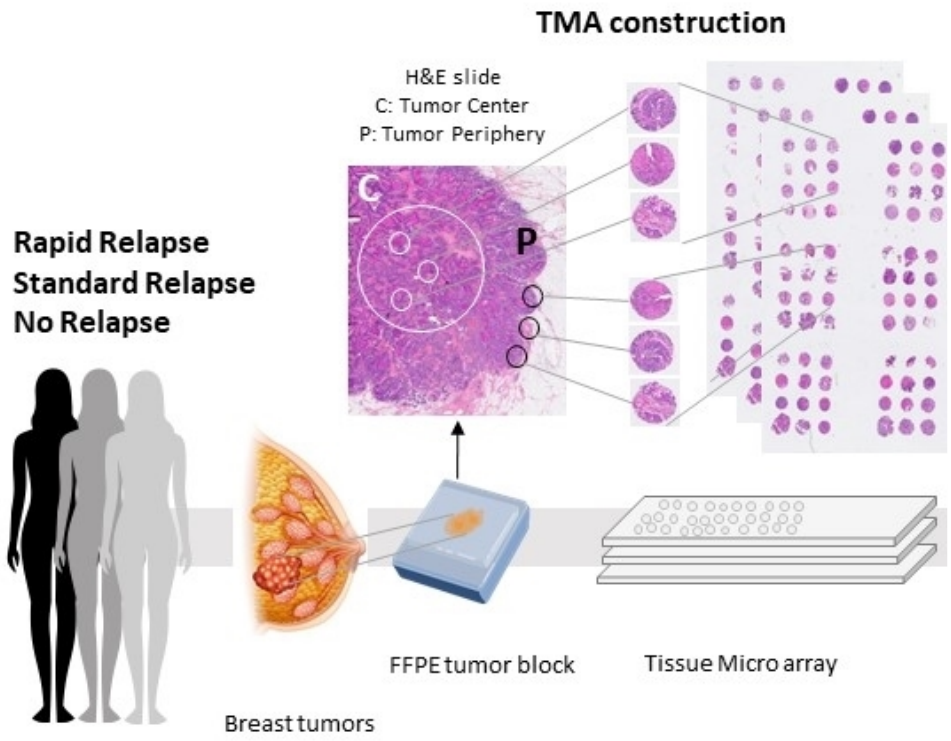
- HER2 70% négatifs
- PD-L1 : 60% négatifs

- Peu de TILs

		RR (n,%)	SR (n,%)	NR (n,%)
		n=20	n=14	n=39
TILs after treatment (on the resected specimen)	median (range)	5% (1% - 50%)	5% (2% - 60%)	11%(1% - 90%)

Evaluation des TILs sur piece opératoire

Analyse spatiale : Worflow de l'étude



TMA slide preparation

N = 104 patients

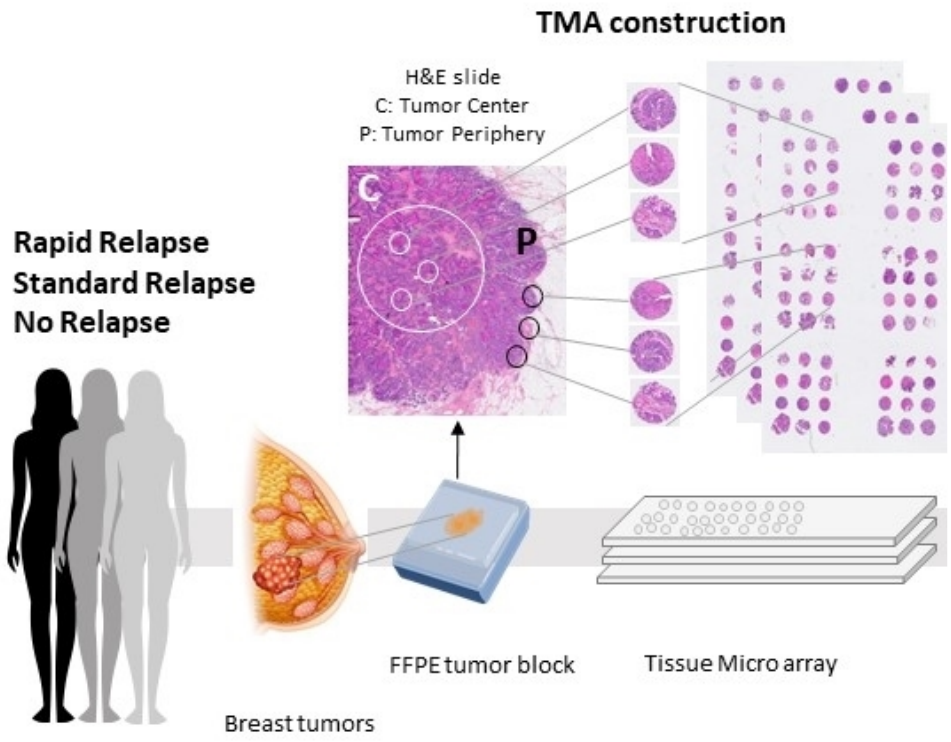
N = 269 tumor cores

After Quality Control

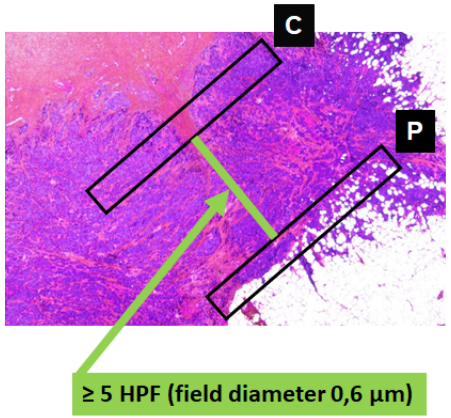
N = 73 patients

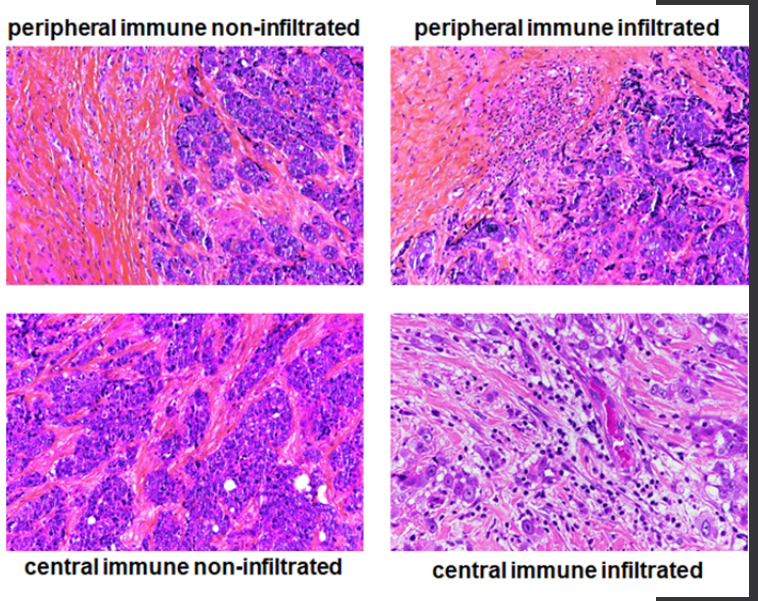
N = 215 tumor cores analyzed

Analyse spatiale : Worflow de l'étude

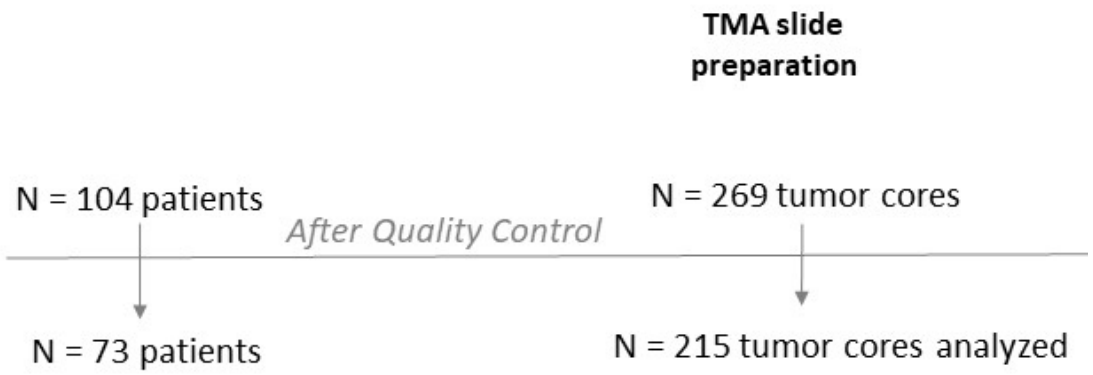


- Choix des zones d'intérêt

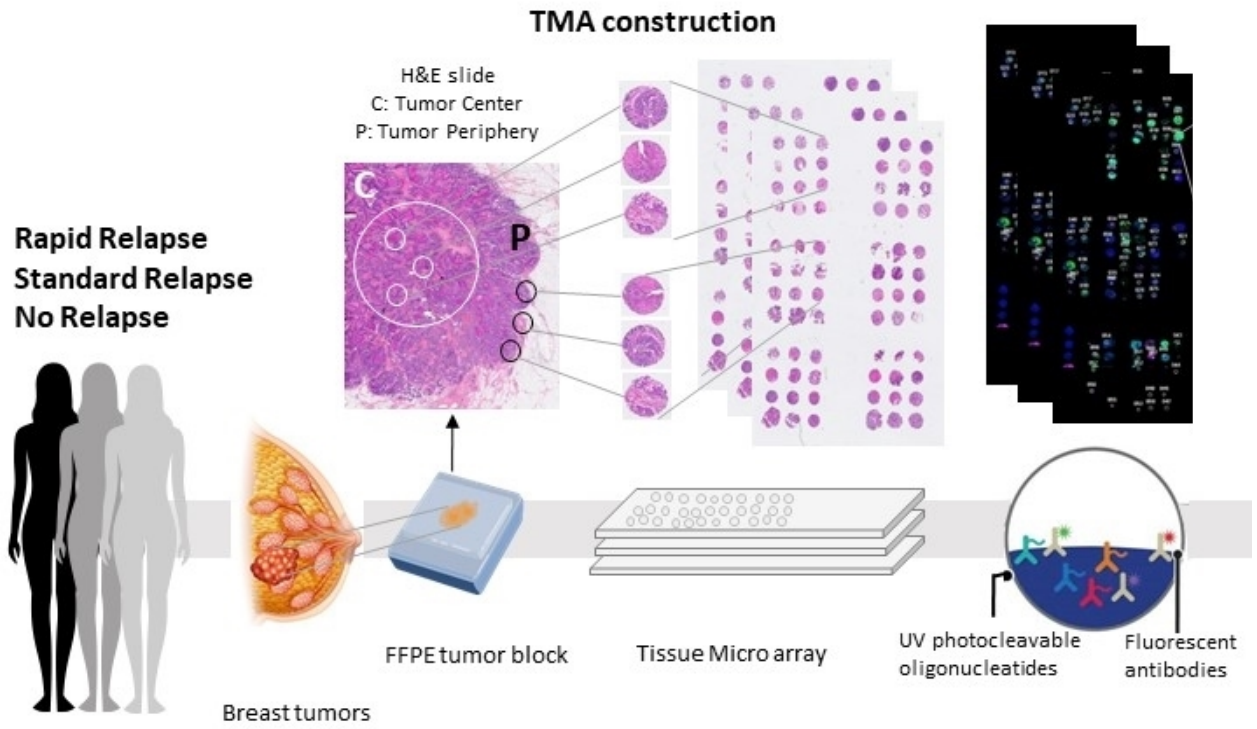




- Evaluation des TILs
- IHC complémentaire



Analyse spatiale : Worflow de l'étude



TMA slide preparation

Staining

N = 104 patients

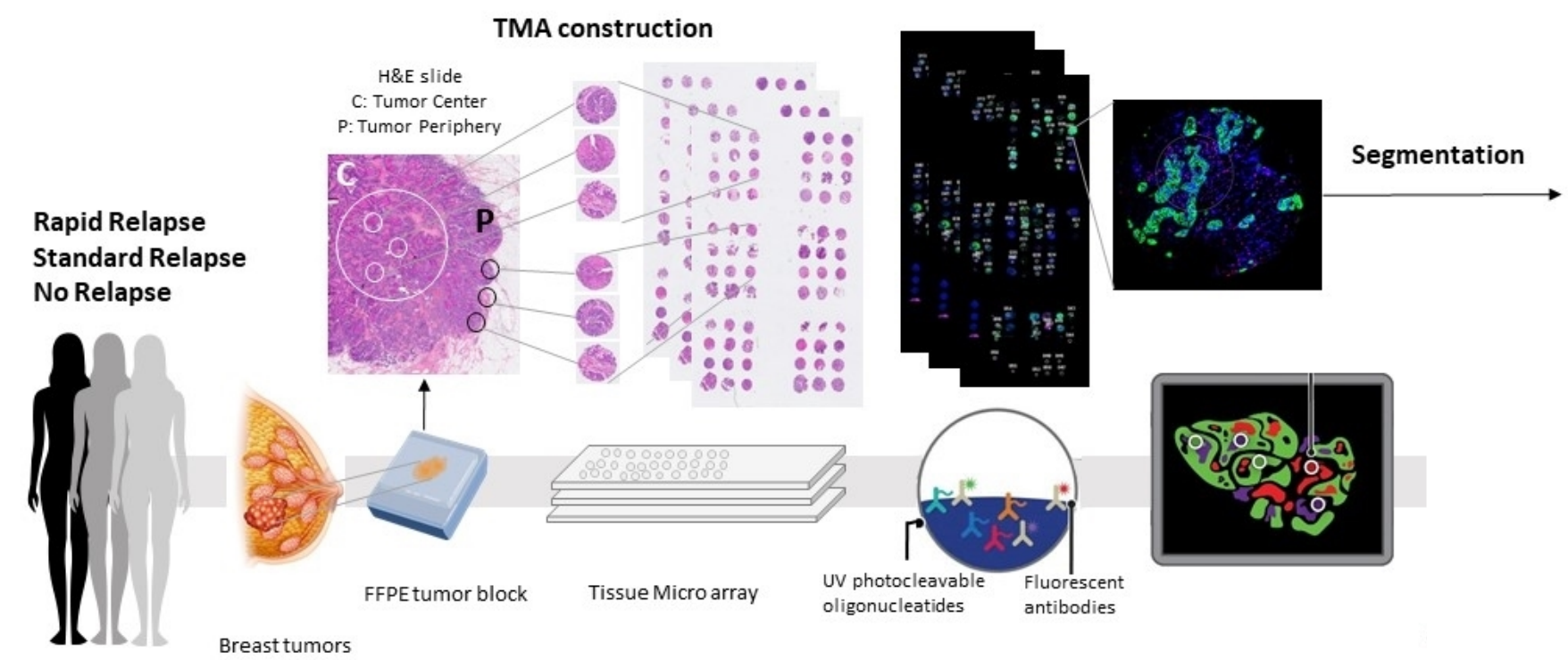
N = 269 tumor cores

After Quality Control

N = 73 patients

N = 215 tumor cores analyzed

Analyse spatiale : Worflow de l'étude



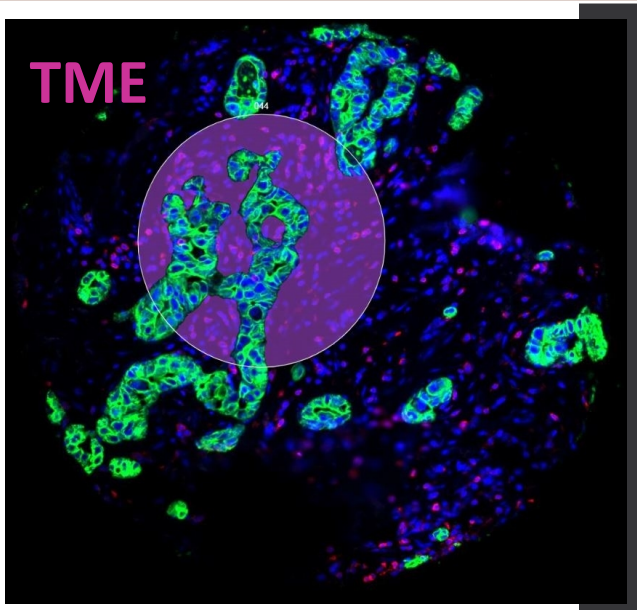
TMA slide preparation | **Staining** | **ROI Selection**

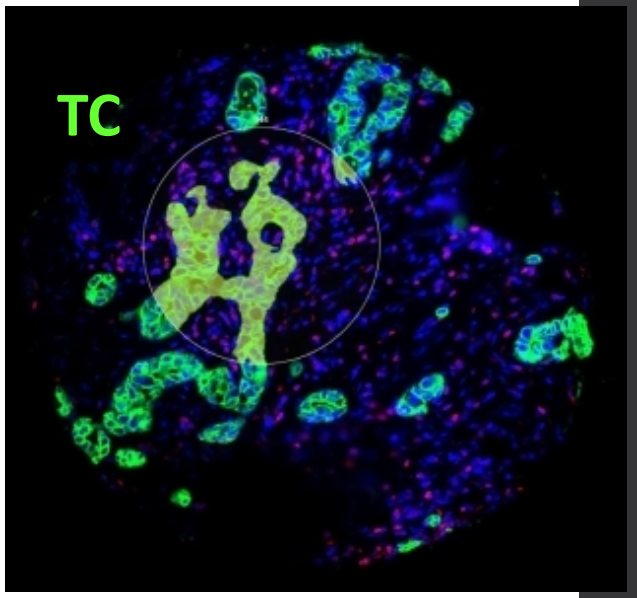
N = 104 patients → N = 73 patients

After Quality Control

N = 269 tumor cores → N = 215 tumor cores analyzed

N = 215 ROIs → N = 212 ROIs analyzed

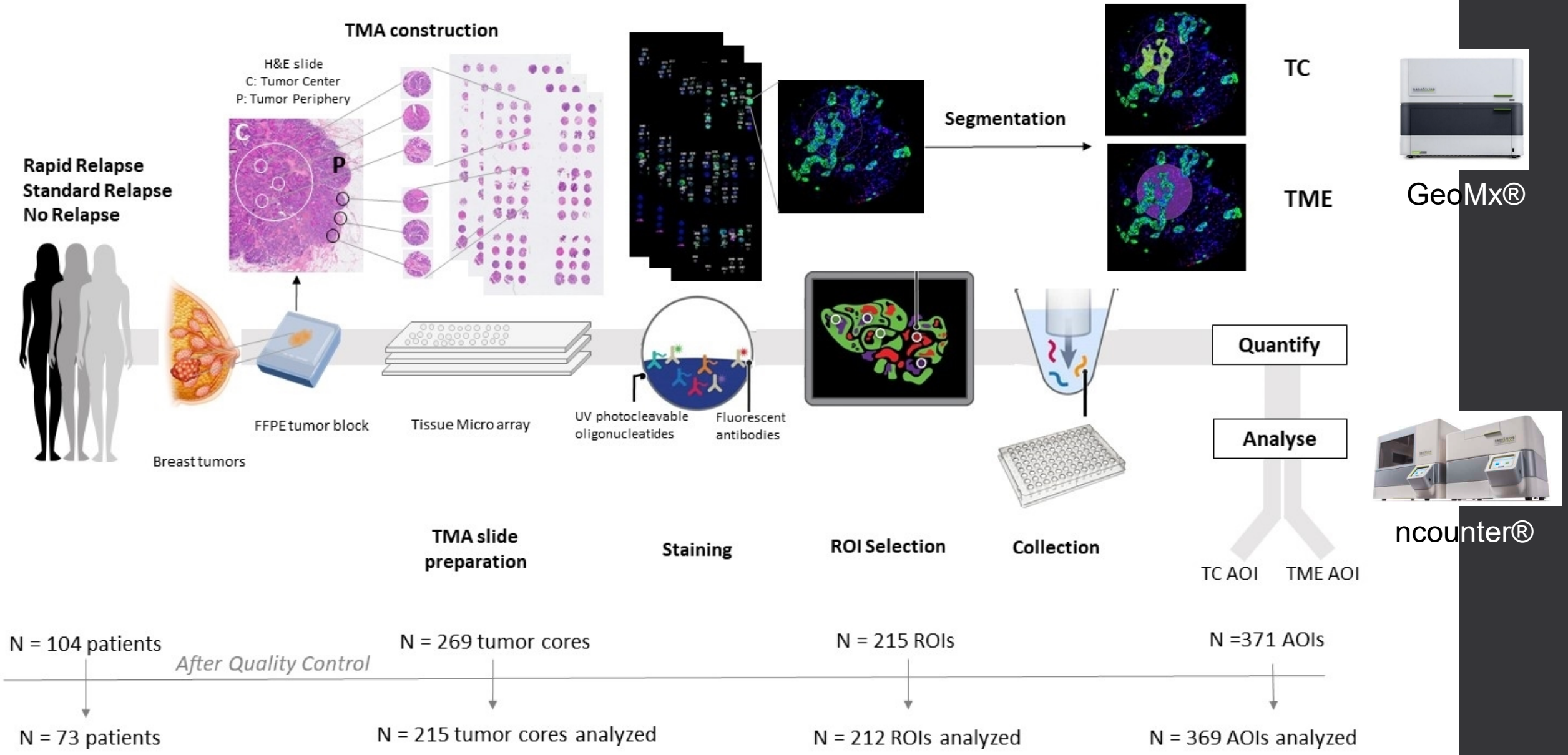




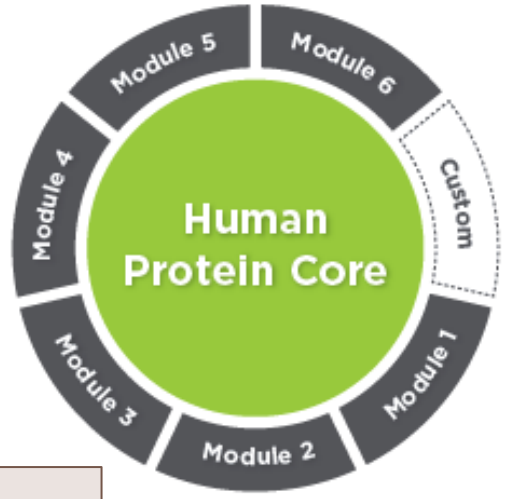
300 µm AOIs

AOI: Area of interests; TC: contingent tumoral; TME: microenvironnement tumoral

Analyse spatiale : Worflow de l'étude



Analyse spatiale



- Immune Cell Profiling Panel
- IO Drug Target Panel
- Immune Activation Status Panel
- Immune Cell Typing Panel
- Pan-Tumor Panel
- MAPK Signaling Panel
- PI3K/AKT Signaling Panel
- Cell Death Panel

EXPRESSION de 45 PROTEINES,
Impliquées dans la réponse immune anti-tumorale

Immune Cell Profiling Panel *Human Protein Core*					
Beta-2-microglobulin	CD3	CD56	CTLA4	GZMB	PD-1
CD11c	CD4	CD68	Pan-cytokeratin	HLA-DR	PD-L1
CD20	CD45	CD8	Fibronectin	Ki-67	SMA

BACKGROUND	NORMALIZATION
Ms IgG2a	Histone H3
Ms IgG1	S6
Rb IgG	GAPDH

Immune Cell Typing Panel *Human Protein Module*		IO Drug Target Panel *Human Protein Module*		Cell Death Panel *Human Protein Module*	
CD14	FAPalpha	4-1BB	LAG3	BAD	GZMA
CD163	FOXP3	ARG1	OX40L	BCL6	p53
CD34		B7-H3	STING	BCLXL	PARP
CD45RO		GITR	TIM-3	BIM	Cleaved Caspase 9
CD66b		IDO1	VISTA	CD95/Fas	Neurofibromin-1

Analyse Spatiale

Nombre de segments générés via le GeoMx DSP par localisation dans chaque groupe clinique

	Number of cases	Segments (AOIs)	Number of cases per localization	
Non Rechute	39	165	TC : 79	Periphery : 34
				Center: 45
			TME : 86	Periphery : 39
				Center : 47
Rechute Standard	14	65	TC : 33	Periphery : 13
				Center: 20
			TME : 32	Periphery : 13
				Center : 19
Rechute Rapide	20	139	TC : 68	Periphery : 26
				Center: 42
			TME : 71	Periphery : 27
				Center : 44

Méthode statistique de comparaison de l'expression protéique

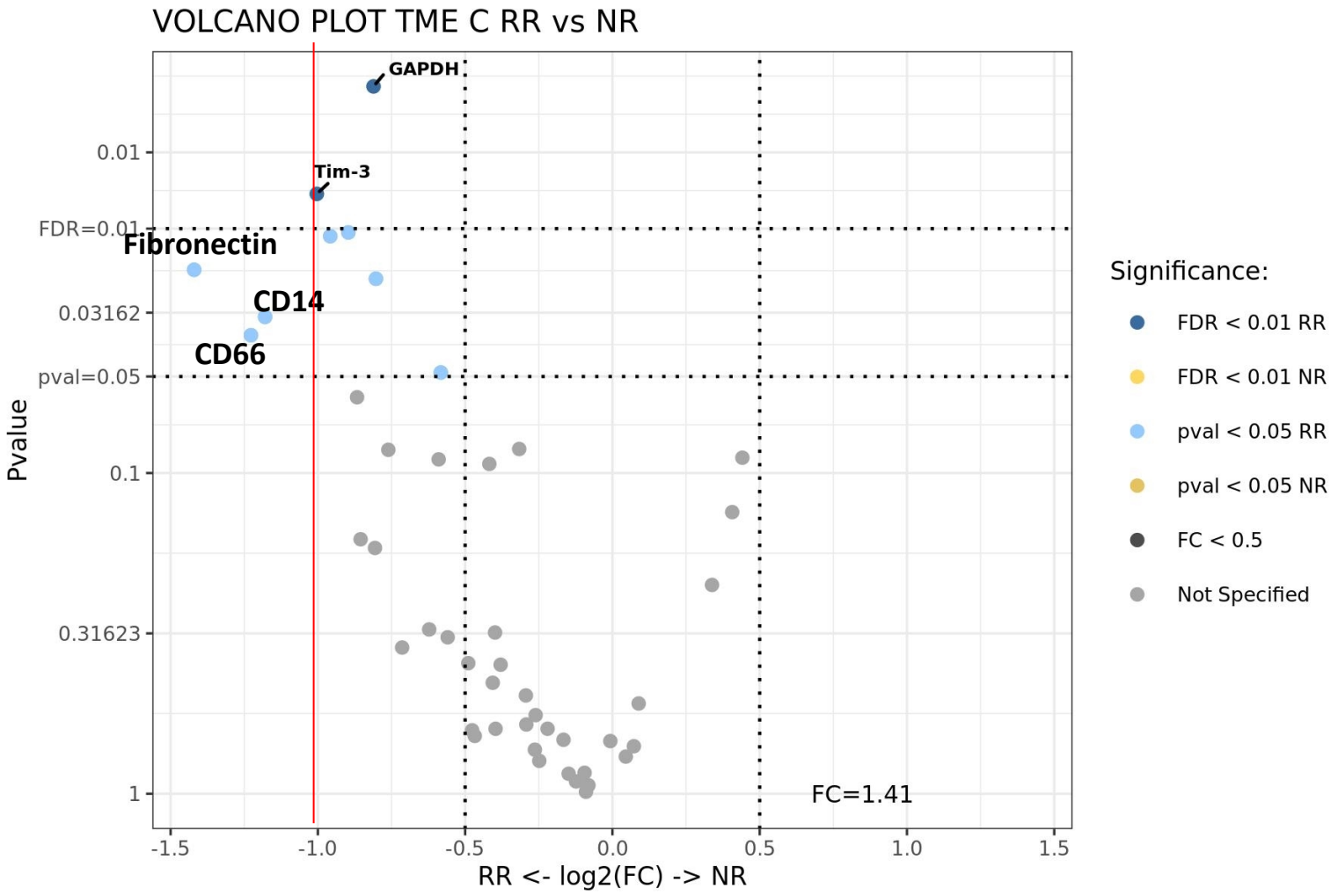
- Les comparaisons de l'expression des biomarqueurs protéiques individuels ont été mesurées en tant que **log2 fold-change (FC)** pour les groupes RR : NR, RR : SR et SR : NR.
- Un **modèle linéaire à deux variables** a été utilisé pour ajuster les données sur les protéines afin que l'effet de récurrence (récurrence vs. non-récurrence) puisse être ajusté en fonction des différences entre les patients.
- Pour ajuster les tests multiples, la **méthode Benjamini et Hochberg** (1995) a été utilisée pour contrôler le **taux de fausse découverte (FDR)**.

Comparaison des groupes

- Comparaison sans segmentation
- Comparaison après segmentation
- Comparaison en fonction du taux de TILs
- Comparaison en fonction en fonction du RCB

Analyse Spatiale

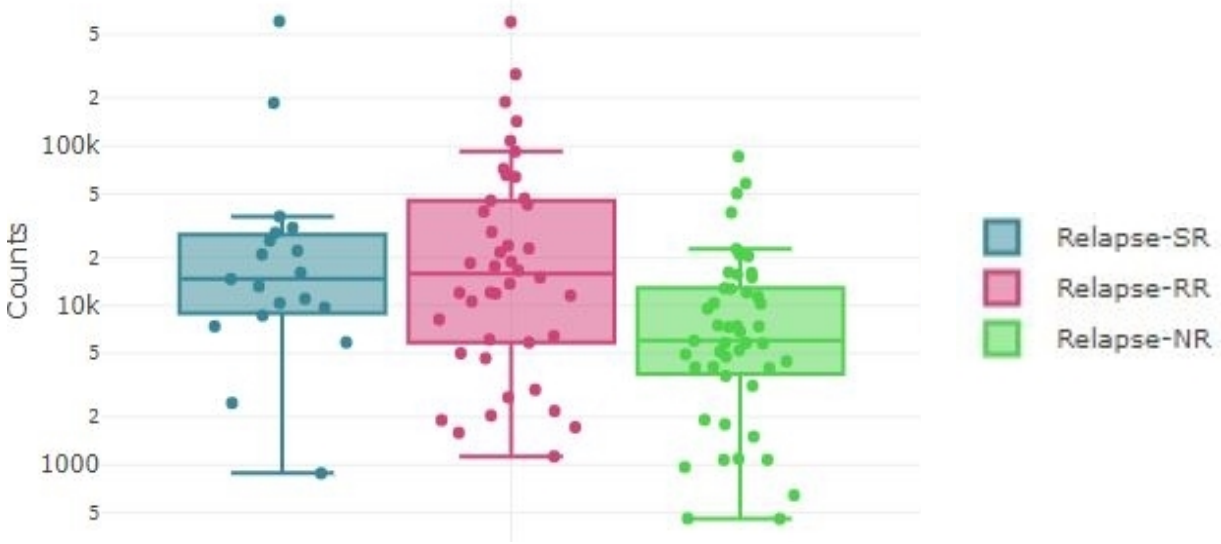
Comparaison des comptes de protéines dans le TME (centre tumoral) entre les groupes cliniques



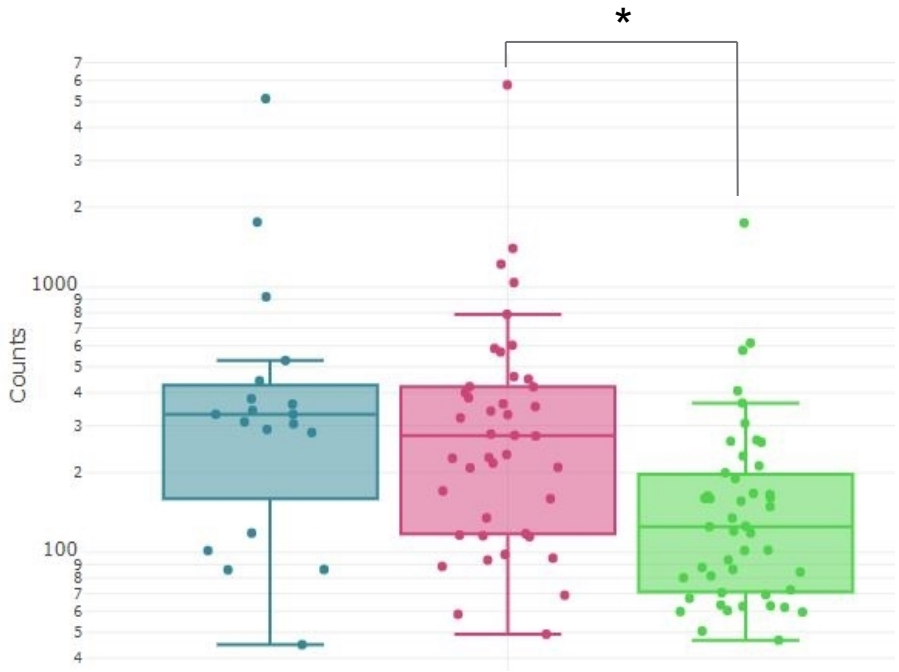
Volcan plot illustrant les protéines différentiellement exprimées entre les cas de Rechute Rapide (RR) et les cas de Non Rechute (NR) dans le microenvironnement tumoral (TME) au centre de la tumeur.
p<0.05; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).

Analyse Spatiale

Comparaison des comptes de protéines dans le TME (centre tumoral) entre les groupes cliniques



Fibronectin protein counts in TME C between clinical groups.
p<0.05; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).



Tim-3 protein counts in TME C between clinical groups.
p<0.05; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).

Analyse Spatiale

Comparaison des comptes de protéines dans le TME entre les groupes cliniques

Spatial profiling type	**TME (187)**	
Clinical groups (Nb of AOIs)	**RR (69)**	**NR (86)**
Differential protein counts	No difference	
Spatial profiling type	TME C (108)	
Clinical groups (Nb of AOIs)	RR (42)	NR (47)
Differential protein counts	Tim-3*, CD14, CD66b Fibronectin	
Spatial profiling type	TME P (79)	
Clinical groups (Nb of AOIs)	RR (27)	NR (39)
Differential protein counts	No difference	

Mesenchymal diffentiation/wound healing, immune activation, immune inhibition, myeloid cells and activation

p<0.05; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).

Analyse Spatiale

Comparaison des comptes de protéines dans le TME entre les groupes cliniques

Spatial profiling type	**TME (187)**			
Clinical groups (Nb of AOIs)	**RR (69)**	**NR (86)**	**SR (32)**	**NR (86)**
Differential protein counts	No difference		Tim-3, CD66b, SMA, CD34	
Spatial profiling type	TME C (108)			
Clinical groups (Nb of AOIs)	RR (42)	NR (47)	SR (19)	NR
Differential protein counts	Tim-3*, CD14, CD66b Fibronectin		Tim-3, LAG3, CD66b, Fibronectin, CD34, CC9	
Spatial profiling type	TME P (79)			
Clinical groups (Nb of AOIs)	RR (27)	NR (39)	SR (13)	NR (39)
Differential protein counts	No difference		SMA, CD66b	

Mesenchymal diffentiation/wound healing, immune activation, immune inhibition, myeloid cells and activation

p<0.05; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).

Analyse Spatiale

Comparaison des comptes de protéines dans le TME entre les groupes cliniques

Spatial profiling type	**TME (187)**					
Clinical groups (Nb of AOIs)	**RR (69)**	**NR (86)**	**SR (32)**	**NR (86)**	**RR (69)**	**SR (32)**
Differential protein counts	No difference		Tim-3, CD66b, SMA, CD34		No difference	
Spatial profiling type	TME C (108)					
Clinical groups (Nb of AOIs)	RR (42)	NR (47)	SR (19)	NR	RR (42)	SR (19)
Differential protein counts	Tim-3*, CD14, CD66b Fibronectin		Tim-3, LAG3, CD66b, Fibronectin, CD34, CC9			CD8
Spatial profiling type	TME P (79)					
Clinical groups (Nb of AOIs)	RR (27)	NR (39)	SR (13)	NR (39)	RR (27)	SR (13)
Differential protein counts	No difference		SMA, CD66b		OX40L	

Mesenchymal diffentiation/wound healing, immune activation, immune inhibition, myeloid cells and activation

p<0.05; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).

Analyse Spatiale

Comparaison des comptes de protéines dans le TC entre les groupes cliniques

Spatial profiling type	**TC (178)**					
Clinical groups (Nb of AOIs)	**RR (66)**	**NR (79)**	**SR (33)**	**NR (79)**	**RR (66)**	**SR (33)**
Differential protein counts		PanCK	Tim-3			*CD66b*, FAP-alpha, SMA, PanCK
Spatial profiling type	TC C (105)					
Clinical groups (Nb of AOIs)	RR (40)	NR (45)	SR (20)	NR (45)	RR (40)	SR (20)
Differential protein counts		CD45* SMA, *CD95/Fas**, BCLXL, PanCK	*GITR*, Tim-3, *CTLA4* *CD66b*, CD34, CC9			STING, Tim-3, *CTLA4*, *CD66b*, SMA*, FAP-alpha, CD34, BIM, PanCK
Spatial profiling type	TC P (73)					
Clinical groups (Nb of AOIs)	RR (26)	NR (34)	SR (13)	NR (34)	RR (26)	SR (13)
Differential protein counts	No difference		No difference		No difference	

Mesenchymal diffentiation/wound healing, immune activation, immune inhibition, myeloid cells and activation

$p<0.05$; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).

Analyse Spatiale

Comparaison des comptes de protéines dans le TC entre les groupes cliniques

Spatial profiling type	TC (178)					
Clinical groups (Nb of AOIs)	**RR (66)**	**NR (79)**	**SR (33)**	**NR (79)**	**RR (66)**	**SR (33)**
Differential protein counts		PanCK	Tim-3			
Spatial profiling type	TC C (1					
Clinical groups (Nb of AOIs)	RR (40)	NR (45)	SR (20)	NR (45)	RR (40)	SR (20)
Differential protein counts		CD45* SMA, *CD95/Fas**, BCLXL, PanCK	*GITR*, Tim-3, *CTLA4* *CD66b*, CD34, CC9			STING, Tim-3, *CTLA4*, *CD66b*, SMA*, FAP-alpha, CD34, BIM, PanCK
Spatial profiling type	TC P (73)					
Clinical groups (Nb of AOIs)	RR (26)	NR (34)	SR (13)	NR (34)	RR (26)	SR (13)
Differential protein counts	No difference		No difference		No difference	

- **Tim-3 chekpoint immunitaire**
- exprimé dans les cellules T épuisées et d'autres cellules immunes.
- Cible émergente

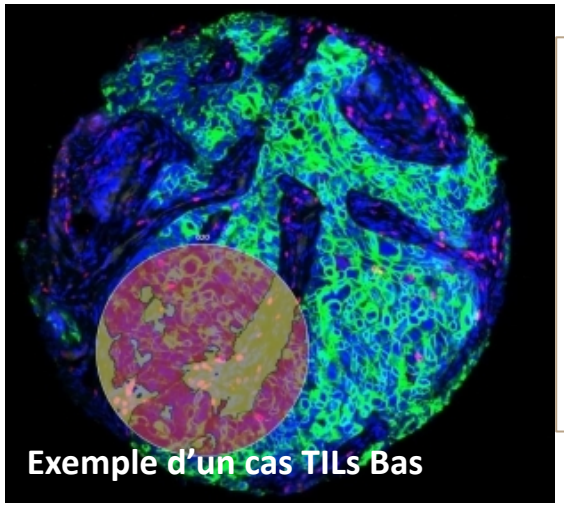
Mesenchymal diffentiation/wound healing, immune activation, immune inhibition, myeloid cells and activation

$p<0.05$; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).

Analyse Spatiale

Comparaison des groupes selon le statut des TILs

	RR	RS	NR
TILs Haut ≥ 10%	11	6	21
TILs Bas < 10%	7	8	18



- *Comparaison des cas de TILs Bas :*
  - **IDO1, Tim-3** dans **RS** vs **NR** dans le **TME (C et P)**
  - **Tim-3** dans **RR** vs **NR** dans **TME-C**
  - **GADPH dans RR** vs **NR** dans **TME-P**

- *Comparaison des cas de TILs Haut :*
  - peu de différence entre les groupes
  - expression plus marquées de protéines liées à la réponse anti-tumorale dans **NR**

Analyse Spatiale

Comparaison des groupes selon le RCB

	RCB1		RCB2		RCB3	
NR	5		27		7	
	TILs L	TILs H	TILs L	TILs H	TILs L	TILs H
	3	2	12	15	1	6
SR	1		9		4	
	TILs L	TILs H	TILs L	TILs H	TILs L	TILs H
	0	1	6	3	2	2
RR	0		10		10	
			TILs L	TILs H	TILs L	TILs H
			6	4	7	3

RCB

- Sans segmentation
- Avec segmentation TME et TC
- TILs Haut and TILs Bas

Analyse Spatiale

Comparaison des groupes selon le RCB

RCB2			
TME		**TC**	
RR (35)	NR (61)	RR (30)	NR (58)
GADPH		IDO1	SMA, PanCK
TILS Haut			
TME		**TC**	
RR (16)	NR (34)	RR (12)	NR(33)
IDO1		IDO1	*CD95/fas*
TILS bas			
TME		**TC**	
RR (19)	NR (27)	RR (18)	NR(25)
Ki67, GADPH, OX40L, SMA			BCL6, SMA

Mesenchymal diffentiation/wound healing, immune activation, immune inhibition, myeloid cells and activation

$p<0.05$; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).

Analyse Spatiale

Comparaison des groupes selon le RCB

RCB2			
TME		TC	
RR (35)	NR (61)	RR (30)	NR (58)
GADPH		IDO1	SMA, PanCK
TILS Haut			
TME		TC	
RR (16)	NR (34)	RR (12)	NR(33)
IDO1		IDO1	*CD95/fas*
TILS bas			
TME		TC	
RR (19)	NR (27)	RR (18)	NR(25)
Ki67, GADPH, OX40L, SMA			BCL6, SMA

Mesenchymal diffentiation/wound healing, immune activation, immune inhibition, myeloid cells and activation

RCB3			
TME		TC	
RR (34)	NR (19)	RR (36)	NR (15)
CD34			CD45, CD8, CD3, GZMA, CD4, HLA-DR, CD68, CD56, PD-1, B2 microglobulin, FAP-apha, CD11c,BCLXL, *CD95/Fas*
TILS Haut			
TME		TC	
RR (11)	NR (14)	RR(12)	NR(33)
GITR, *FoxP3*, SMA		IDO1	*CD95/fas*
TILs Bas			
TME		TC	
RR (23)	NR (5)	RR(23)	NR(5)
	VISTA,CD163, GZMA, FAP-alpha, BCL6		GZMA, VISTA, CD45, CD3, CD4, HLA-DR, CD56, CD68, CD20, CD163, LAG3, B2microglobulin, PD-1, FAP-alpha, CD14, CD11c, *CD95/fas*

p<0.05; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).

Analyse Spatiale

Comparaison des groupes selon le RCB

RCB2			
TME		TC	
RR (35)	NR (61)	RR (30)	N
GADPH		IDO1	SM Pa
TILS Haut			
TME		TC	
RR (16)	NR (34)	RR (12)	I
IDO1		IDO1	*CD95/fas*
TILS bas			
TME		TC	
RR (19)	NR (27)	RR (18)	NR(25)
Ki67, GADPH, OX40L, SMA			BCL6, SMA

Mesenchymal diffentiation/wound healing, immune activation, immune inhibition, myeloid cells and activation

RCB3			
TME		TC	
RR (24)	NR (10)	RR (26)	NR (15)
			, CD4,
			, FAP-
			95/Fas
GITR, *FoxP3*, SMA		IDO1	*CD95/fas*
TILs Bas			
TME		TC	
RR (23)	NR (5)	RR(23)	NR(5)
	VISTA,CD163, GZMA, FAP-alpha, BCL6		GZMA, VISTA, CD45, CD3, CD4, HLA-DR, CD56, CD68, CD20, CD163, LAG3, B2microglobulin, PD-1, FAP-alpha, CD14, CD11c, *CD95/fas*

p<0.05; *designed proteins that remained significant after Benjamini-Hochberg adjustment (Padj < 0.01).

- IDO1 exprimée par nombreuses cellules immunes après induction par l'IFN-ϒ, entre autres synthétisé, par TILs
- **IDO1 réduit la réponse immunitaire** aux tumeurs via l'induction de facteurs immunosuppresseurs (tels que FoxP3, IL-10, TGF- β) et facilite l'échappement tumoral

Liu et al. J of Hematol Oncol, 2018

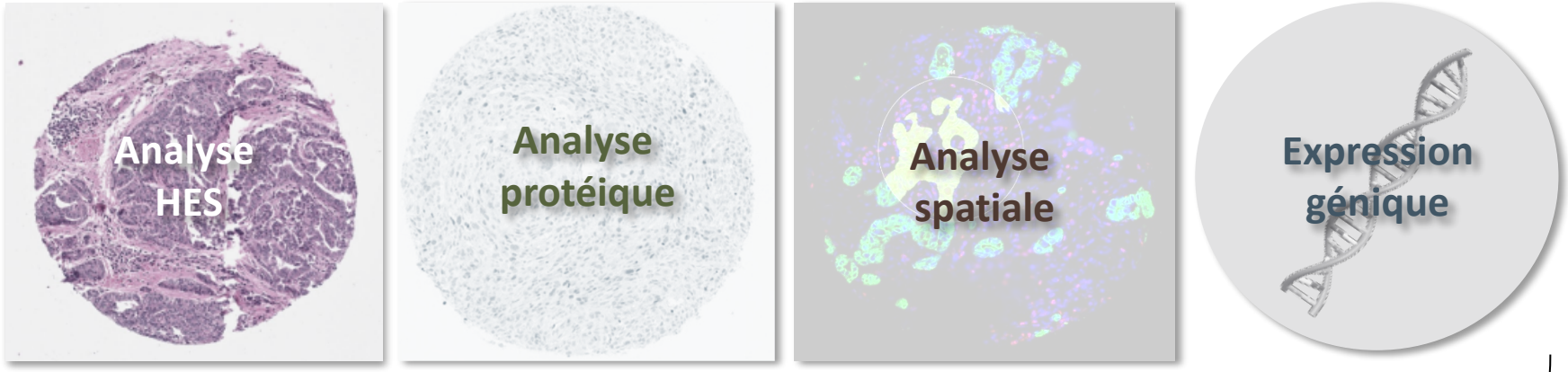
DISCUSSION - CONCLUSION

- Etude portant sur une petite cohorte, mais la première s'intéressant au profil spatial des cas de RR.
- **Hétérogénéité** intra-groupe observée même au sein de cette petite cohorte.

- La stratification par **taux de TILs** a montré des différences, bien que le nombre de cas soit faible.
- La stratification par **catégorie de RCB** semble révéler des différences plus importantes (probablement parce que la RCB est un classificateur plus robuste que le niveau de TIL).
- Les différences RR vs SR sont moins importantes.

- **Tim-3** et **IDO1** et **Fibronectine,** potentielles cibles à approfondir.

- Un **plus grand nombre de cas** et **d'autres approches** sont nécessaires pour compléter la caractérisation des RR et trouver un ou plusieurs biomarqueurs communs à tous les cas de Rechute Rapide.



Caractéristiques spécifiques des CSTN de Rechute Rapide identifiables dès la biopsie diagnostique

2023
22 au 24 novembre
CARREFOUR PATHOLOGIE

MERCI POUR VOTRE ATTENTION

Centre Jean PERRIN
unicancer Clermont Auvergne Métropole

Inserm
UMR 1240
IMoST
Imagerie Moléculaire et Stratégies Théranostiques

UCA
UNIVERSITÉ Clermont Auvergne