

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Mulumba Tshibwabwa, Rolly

Promoteur(s) : Josse, Claire

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/14865>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Étude de la relation entre les éosinophiles et les autres cellules immunitaires dans le cancer du sein.

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du grade de Master en Sciences Biomédicales à finalité recherche multidisciplinaire

Par Rolly Mulumba Tshibwabwa

Promoteur : Docteur Claire Josse

Superviseur : Thiry Jérôme



Université de Liège Faculté de Médecine
Année académique 2021 – 2022

Remerciements

Sans vous, l'aboutissement de ce travail de fin de cycle ne serait pas possible. Vous témoigner ma gratitude est la moindre de chose que je puisse faire.

Avant tout je tiens tout d'abord à remercier profondément mon promoteur, Le Dr Claire Josse de m'avoir permis de réaliser ce travail par son soutien et ses conseils tout au long de ce travail de fin de cycle. J'aimerais aussi exprimer ma gratitude au corps enseignant de l'université de Liège et aux personnels administratifs qui m'ont accompagné durant ce cursus.

Je tiens à remercier mon superviseur de stage, Thiry Jérôme ainsi que tous les membres du laboratoire d'Oncologie Médicale du Professeur G. Jerusalem de l'Université de Liège pour leurs bienveillances, leurs conseils, leurs suggestions et leurs confiances durant cette étude. Ils m'ont permis d'avoir un environnement de travail propice et chaleureux.

Je serais ingrat de ne pas aussi remercier les différentes plateformes du Giga Science de l'université de Liège pour les coupes histologiques et le séquençage de nos tumeurs nécessaires à cette étude.

Je remercie aussi toutes les personnes qui de prêt ou de loin ont contribué à l'accomplissement de ce travail par leurs encouragements, leurs conseils et autres. Ce travail de fin d'étude est aussi votre.

Je tiens à dédier ce travail au Dr Grégoire Tshibuabua, mon père, qui m'a toujours montré le chemin et accompagné toute ma vie durant ; et à le remercier ainsi que ma mère et toute ma famille pour avoir participé au fondement de cet accomplissement ouvrant les portes vers de nouveaux défis.

Enfin, je tiens à témoigner une profonde gratitude à mon épouse qui a toujours cru en moi, m'a toujours soutenu et a fait preuve de patience durant ces dernières années.

Abstract

Cancer and cardiovascular diseases are currently the world's leading causes of death. In woman worldwide, breast cancer is the most often diagnosed cancer, and the fifth leading cause of cancer-related death in both sexes.

Several immune system actors are involved in the responses to diseases in the immune system. These immune system players are the subject of several studies aimed at improving disease treatment. Eosinophils, an immune cell known for their roles in allergies and parasitic infections, have been shown *in vivo* to have a pro- and antitumoral effect in cancer. However, there are few data on this subject for breast cancer.

Retrospective studies, including two conducted by our lab, the University de Liège's Laboratory of Medical Oncology, have revealed the potential of the number of circulating eosinophils at the time of diagnosis and during patient follow-up as a prognostic and predictive factor for treatment response. In general, a higher rate of circulating eosinophils is associated with a better prognosis and predicts a better response to chemotherapy. In this end-of-cycle work, we looked at the effect of lowering the number of circulating eosinophils on tumoral and stromal immune cells infiltration, as well as the expression of immune modulators in a mouse model of breast cancer made up of two groups of mice. The first group of mice was given an anti-IL-5 antibody treatment to reduce the number of circulating eosinophils cells, EOS- group (n=12). The second group of mice is received an isotype IgG1 treatment that had no effect on the number of circulating eosinophils cells, EOSnorm (n=12).

In the first portion of our research, we used immunohistochemistry (IHC) on tumor slices to examine infiltration at the tumor, stroma, and total amount of immune actors between the EOS- and EOSnorm groups, as well as the metastasis+ (n=7) and metastasis- (n=17) groups. The second portion of this end-of-study project was devoted to tumor sequencing in order to evaluate RNA-seq for investigating tumor infiltration by immune cells and to corroborate the findings made by IHC.

Our findings showed that in the EOS- group, there were more eosinophils in the tumor (p-value: 0,0205), the stroma (p-value: 0,0449), and the whole lame (p-value: 0,0332) associated with a low rate of lymphocyte T CD8 (p-value: 0,0449) and neutrophils (p-value: 0,0332) at the stromal level. Furthermore, a higher number of neutrophils were seen in the metastases-group at the stroma level (p-value: 0,0131) and on the whole lame (p-value: 0,0008).

These findings suggest that a decrease in the number of circulating eosinophils would increase their infiltration into tumor tissue, but that would cause a decrease in the infiltration of other immune cells.

Résumé

Actuellement, le cancer et les maladies cardiovasculaires sont les principales causes de mortalité dans le monde. Le cancer du sein est le plus diagnostiqué des cancers chez la femme, et la 5^e cause de mortalité liée au cancer dans les deux sexes.

Le système immunitaire comporte plusieurs acteurs immunitaires impliqués dans les réponses contre les maladies. Ces acteurs immunitaires font l'objets de diverses études dans le but d'améliorer le traitement des maladies. Les éosinophiles, un acteur immunitaire connu pour leurs implications dans les allergies et les infections parasitaires, ont montré *in vivo* une double action dans le cancer : pro et antitumorale. Cependant peu de données à ce sujet sont disponible pour le cancer du sein.

Des études rétrospectives dont deux effectuées par notre laboratoire, le laboratoire d'Oncologie Médicale de l'Université de Liège, ont mis en évidence le potentiel du nombre d'éosinophiles circulants au moment du diagnostic et durant le suivi des patients, comme facteur pronostique et prédictif de la réponse au traitement. En général, un taux élevé d'éosinophiles circulants est associé à un meilleur pronostic et est prédictif d'une meilleure réponse au traitement chimiothérapeutique. Nous avons, lors de ce travail de fin de cycle, étudié l'impact de la réduction du nombre d'éosinophiles circulants sur l'infiltration tumorale et stromale des cellules immunitaires et l'expression des modulateurs immunitaires dans un modèle murin du cancer du sein composé de deux groupes de souris. Le premier groupe de souris a reçu un traitement à l'anticorps anti-IL-5 pour réduire le nombre d'éosinophiles circulants : le groupe EOS- (n=12). Le second groupe de souris a reçu un traitement à l'isotype IgG1 sans impact sur le nombre d'éosinophiles circulants : le groupe EOSnorm (n=12).

Dans la première partie de notre étude, nous avons réalisé des immunohistochimies (IHC) sur des coupes de tumeurs afin de comparer l'infiltration au niveau de la tumeur, du stroma et de la lame totale des acteurs immunitaires entre les groupes EOS- versus EOSnorm et les groupes métastase+ (n=7) versus métastase-(n=17). La seconde partie de ce travail de fin d'étude a été consacré au séquençage des tumeurs afin d'évaluer le RNA-seq pour explorer l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires et de confirmer les observations obtenues par IHC.

Nos résultats ont montré une plus grande présence d'éosinophiles dans la tumeur (p-value : 0,0205), dans le stroma (p-value : 0,0449) et sur la lame entière (p-value : 0,0332) dans le groupe EOS- associé à un faible taux de lymphocyte T CD8 (p-value : 0,0449) et de neutrophiles (p-value : 0,0332) au niveau stromal. De plus, une plus grande présence de neutrophiles a été observé dans le groupe métastases- dans le stroma (p-value : 0,0131) et sur la lame entière (p-value : 0,0008).

Ces résultats suggèrent que la baisse du taux d'éosinophiles circulants accroîtrait leur infiltration dans le tissu tumoral mais que cela s'accompagnerait d'une réduction de l'infiltration d'autres cellules immunitaires.

Table des matières

Introduction	1
Le cancer du sein.....	1
Épidémiologie	1
Facteurs de risques	1
Dépistage, diagnostic, classification et pronostique.....	2
Prise en charge du cancer de sein.....	8
Le système immunitaire et le cancer : focus sur les éosinophiles	9
Introduction	9
Les cellules immunitaires circulantes et infiltrants la tumeur	10
Les éosinophiles	12
Les éosinophiles et le cancer du sein.....	15
L'éosinophilie tissulaire associée aux tumeurs (TATE).....	15
Les éosinophiles circulants.....	17
Objectif	19
Matériels et méthodes	22
Immunohistochimie	22
Préparation des échantillons.	22
Principe générale de l'immunohistochimie	22
RNA-sequencing.....	24
Préparation des échantillons	24
Principe général du RNAseq.....	24
Analyse statistique	28
Résultats	29
Immunohistochimie	29
Validation de la quantification par le logiciel QuPath.....	30
Quantification des lames marquées à l'anticorps anti-RNase III.....	31
Quantification des lames marquées à l'anticorps anti-CD8.....	32
Quantification des lames marquées à l'anticorps anti-Elastase	33
Quantification des lames marquées aux anticorps anti-Granzyme B, anti-FOXP-3, anti PD-1 et anti-PDL-1	34
Résumé de la quantification IHC.....	35
RNA sequencing	36
Quantification et Contrôle de la Qualité de l'ARN extrait	36
Contrôle qualité du séquençage	38

Analyse des données du séquençage	39
Discussions et Perspectives	46
Références	

Liste des abréviations

1. AJCC: American Joint Committee on Cancer
2. ANDc; Acide désoxyribonucléique complémentaire
3. ANOVA : Analysis of Variance
4. ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
5. Babl/c: Bagg and Albino phenotype c
6. BCS: breast cancer Surgery
7. BRCA: Breast Related Cancer Antigens
8. CAF: cancer associated fibroblast
9. Carcinoma NOS: carcinoma Not Otherwise Specified (non spécifié)
10. CDK4/6: cyclin-dependent kinases 4 and 6
11. CD 4 ou 8 : Cluster de différenciation 4 ou 8
12. CCL : C-C Motif Chemokine Ligand
13. CCR: C-C Motif Chemokine Receptor
14. CHEK2: Checkpoint Kinase 2
15. CPM : Count per million
16. *CTLA-4* : *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*
17. CT-scan: Computed Tomography scanner
18. CXCL : C-X-C motif Ligand
19. DC : dendritic cells
20. DPP4: Dipeptidyl Peptidase
21. ECP : Eosinophil Cationic Protein
22. EDN : Eosinophil-Derived Neurotoxin
23. EOS : éosinophile
24. EPO : Eosinophil Peroxidase
25. ER: Estrogen Receptor
26. *ERBB*: *human epidermal growth factor receptor (EGFR) family*
27. *ESMO*: *EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY*
28. EUSOBI: European Society of Breast Imaging
29. FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
30. FGF: Fibroblast Growth Factor
31. *FISH*: fluorescence in situ hybridization
32. GEP : gene expression profiles
33. GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
34. *HER2*: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*
35. HIF1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1- α
36. HRP: Horseradish Peroxidase
37. ICI : immune check point inhibitor (inhibiteurs de point de contrôle immunitaire)
38. IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase
39. IgG1: Immunoglobulin G
40. IGF1 : Insulin Growth Facteur 1 (facteur de croissance insulino dépendant)
41. *IHC*: *Immunohistochimie*
42. IL: Interleukin
43. iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase
44. *Ki-67*: *marker of proliferation Ki-67*
45. Kyn: Kynurenine
46. Luc: Luciférase
47. Lymphocyte NK: lymphocyte Natural Killer
48. MBP : Major Basic Protein
49. MBP : Major Basic Protein
50. MicroARN : micro Acide Ribonucléiques
51. MMTV-PyMT : mouse mammary tumor virus-polyoma middle tumor-antigen
52. MPO: Myeloperoxidase
53. MRI : Magnetic Resonance Imaging (imagerie par résonance magnétique)
54. NGF : Nerve Growth Factor
55. NGS : Next Generation Sequencing

56. NLR : neutrophile/lymphocytes ratio
57. MLR : monocyte/lymphocyte ratio
58. TCR: T-cell receptor
59. TLR : Toll-like Receptors
60. PALB2: Partner and Localizer of BRCA2
61. PBS: Phosphate Buffered Saline
62. PCNA : Proliferating cell nuclear agent
63. pCR : pathological complete response
64. PDGF : Platelet Derived Growth Factor
65. PD1 : Programmed death receptor
66. PDL-1 : Programmed death-ligand 1 (ligand de mort cellulaire programmée)
67. PgR: Progesterone Receptor
68. PLR : plaquette/neutrophile ratio
69. PPR : pattern recognition receptors
70. PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog
71. RANTES: Regulated upon Activation Normal T
72. REC: Relative Eosinophil Count
73. RIN : RNA Integrity Number
74. RLC: Relative Lymphocyte count
75. RNAseq : ribonucleic acid sequencing
76. ROS: Reactive Oxygen Species
77. Siglec-8: Sialic acid-binding Ig-like lectin 8
78. SVR : support vector regression
79. TAMs : Tumor-Associated Macrophage
80. TATE: Tumor-Associated Tissue Eosinophilia
81. TGF- β : Transforming growth factor beta (facteur de croissance transformant beta)
82. *TIM-3: T cell Immunoglobulin and Mucin domain-containing protein 3*
83. TIL: Tumor Infiltrating Lymphocyte
84. TME : tumor micro-environnement
85. TMM : Trimmed Mean of M value
86. *TNBC: Triple Negative Breast cancer*
87. TNM: Tumor Node Metastasis
88. Treg : lymphocyte T régulateur
89. Trp : Tryptophan
90. VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction

Le cancer du sein

Épidémiologie

Le cancer et les maladies cardiovasculaires sont les principales causes de mortalités précoces dans 127 pays du monde avec une prédominance du cancer dans 57 pays dont la chine¹. Selon le Global Cancer Statistiques 2020, le cancer est la principale cause de mortalité avant l'âge de 70 ans dans près de 185 pays dans le monde et occuperait la troisième place dans 23 autres pays^{2,3}.

Le cancer du sein est le plus diagnostiqué des cancers dans le monde avec plus de 2,3 millions de nouveaux cas diagnostiqués par an dans les deux sexes ; cela représente 11,7 % de tous les cas de cancer diagnostiqués. En termes de mortalité dans les deux sexes, il occupe la 5^e position (6,9%) alors que chez les femmes, le cancer du sein reste la principale cause de mortalité dans le monde avec près de 685 000 morts en 2020³.

En Belgique, le cancer du sein fait 96 nouveaux cas et 44 décès par 100 000 habitants par an avec un taux de survie de 91.1 % sur 5 ans dépendant du stade lors du diagnostic. Moins de 10% des patients atteints du cancer du sein développent des métastases^{2,4}.

L'incidence du cancer du sein dans les pays développés a connu une baisse et/ou une stabilisation à partir de la fin des années 90 début 2000 d'abord chez les femmes de 45 ans puis chez celles de 50 ans ; cela est attribuable à une meilleure sensibilisation au dépistage mammographique, et la réduction d'usage d'hormonothérapies postménopause³.

En général, le taux de mortalité lié au cancer du sein dans le monde tend à baisser grâce aux avancées thérapeutiques dues à la recherche et aux différents programmes de sensibilisation au dépistage⁵.

Facteurs de risques

La courbe d'incidence du cancer de sein au cours des différentes phases de la vie chez la femme dépend de son statut endocrinologique et des différents programmes de dépistage. Il a été démontré que cette courbe a tendance à croître exponentiellement avant la ménopause puis se stabiliser peu après la ménopause pour à nouveau croître vers 60 ans.

Les œstrogènes sont transformés en métabolites qui peuvent être génotoxiques et mutagènes. Ces métabolites induisent le cancer du sein par inhibition de l'apoptose et stimulation de la croissance cellulaire. De ce fait, une exposition prolongée aux œstrogènes induit une augmentation du risque de développer le cancer du sein⁶.

En outre, une ménarche précoce ou une ménopause tardive, un traitement hormonal substitutif ainsi qu'une nulliparité ou une première grossesse tardive et l'absence d'allaitement accroissent le risque de développer le cancer du sein. Par exemple, le risque de développer le cancer du sein est deux fois plus grands chez les femmes ayant eu leur premier enfant à l'âge de 30 ans par rapport à celles ayant eu leur premier enfant à 20 ans⁷.

L'hygiène de vie influe sur le risque de développer le cancer du sein : une alimentation riche en graisses et pauvre en fibres ainsi que la consommation d'alcool, le manque d'activité physique, les syndromes métaboliques et l'obésité accroissent le risque de développer un cancer mammaire. L'obésité s'accompagne notamment d'une augmentation du facteur de croissance *IGF1 (Insulin Growth Factor 1)* qui contribue à la stimulation de la croissance cellulaire. De plus, l'obésité augmente la production d'œstrogènes au niveau des tissus adipeux en augmentant l'activité de l'aromatase^{8,9}. L'exposition précoce ou fréquente aux rayonnements tels que des radiologies thoraciques fait aussi partie des facteurs à risque de développer un cancer mammaire.

Bien que la majorité des cas de cancer du sein soit sporadique, il existe un taux non négligeable, 5-10%, des cas liés à une prédisposition génétique avec une forte incidence héréditaire chez les sujets dont l'un des membres de la famille a développé un cancer du sein⁷. Ces prédispositions génétiques touchent dans la plupart des cas les gènes *BRCA (Breast Related Cancer Antigens) 1 et 2*¹⁰. Cependant, il existe d'autres facteurs héréditaires tels que les mutations du gène *ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated)*, du gène *Checkpoint Kinase 2 (CHEK2)*, du gène *PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2)*, du syndrome de *Li-Fraumeni* (mutation *p53*), du syndrome de *Cowden (PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) mutation)* et le syndrome de *Peutz-Jeghers*¹¹.

Dépistage, diagnostic, classification et pronostique

Dépistage

Les facteurs environnementaux ainsi que le mode de vie constituent des facteurs de risque de développer un cancer du sein ; et sont potentiellement impliqués dans environ 90-95% des cas¹². L'élimination de ces facteurs de risque, comme méthode primaire de prévention, permettrait de réduire la morbidité et la mortalité liées au cancer du sein.

Cependant, cette première méthode de prévention reste insuffisante. De ce fait, une seconde méthode de prévention, le dépistage, permettant la détection précoce du cancer ou des lésions prédisposant au cancer du sein, a été mis en place. Le dépistage a l'avantage de réduire le taux de mortalité lié au cancer du sein mais aussi de favoriser l'usage des traitements moins agressifs pour les patients, car le cancer est détecté à un stade moins avancé¹².

En termes de dépistage, le standard est la mammographie. Sa précision dépend de la densité du tissu mammaire. Les femmes jeunes ont des seins à tissus plus denses que les femmes plus âgées ; la sensibilité de détection de la mammographie est moindre dans les tissus denses. Pour pallier cet inconvénient, la mammographie associée à une échographie s'est avérée être une alternative efficace et permet d'avoir des meilleurs résultats.

En effet, une étude randomisée, comparant la sensibilité de la mammographie seule versus une combinaison avec l'échographie, a montré une sensibilité globale de 81,3 % chez les femmes aux seins denses et de 95,0 % chez les femmes aux seins non denses lors de la combinaison de la mammographie et de l'échographie contre 61,5% chez les femmes aux seins denses et de 86,6% chez les femmes aux seins non denses lors de la mammographie chez les femmes entre 40 et 49 ans¹³.

D'autre part, la tomosynthèse mammaire numérique est une technique permettant une reconstitution 3D du sein. La tomosynthèse s'avère être un atout majeur et innovateur car selon une étude récente, la combinaison de la tomosynthèse à la mammographie accroît la spécificité et la sensibilité du dépistage¹⁴.

En Belgique, le KCE (*Belgian Health Care Knowledge Centre*) recommande une mammographie tous les deux ans entre 50 et 69 ans sauf en cas de risque familiale¹. De plus, afin d'améliorer la sensibilité du dépistage, le *European Society of Breast Imaging (EUSOBI)* recommande une mammographie annuelle chez les femmes entre 40 et 49 ans considérées à risque moyen, une mammographie biannuelle chez les femmes entre 50 et 69 ans considérées à haut risque avec double lecture des résultats ; et aussi une mammographie biannuelle pour les 70 ans et plus¹⁵.

L'American Cancer Society guidelines recommande pour les sujets à haut risque, un dépistage par MRI (*magnetic resonance imaging*) une fois par ans à partir de 25 ans ou 10 ans avant l'âge d'apparition de la tumeur chez le plus jeune sujet familial diagnostiqué. La catégorie à haut risque comprend les sujets ayant des antécédents familiaux importants, ceux ayant une mutation du gène *BRCA*, les sujets porteurs du *syndrome Li-Fraumeni*, *Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome* ainsi que les sujets ayant subis des radiographies thoraciques antérieure fréquente entre 10 et 30 ans¹⁶.

A ce jour, il n'existe pas de biomarqueur sanguin capable d'être utilisé en dépistage ou diagnostic du cancer du sein par manque de spécificité et/ou de sensibilité. Cependant, plusieurs études sont en cours afin de mettre en place une signature de plusieurs biomarqueurs pouvant faciliter le dépistage. Parmi ces études, une étude de recherche translationnelle sur le cancer du sein à l'université de Liège a permis d'identifier une signature de 8 microARNs comme outils de diagnostic ; alors qu'une autre a établi une signature métabolique plasmatique propre au sujet ayant le cancer de sein^{17,18}. La validation dans des cohortes plus grandes de ces résultats offrirait à la science des outils de diagnostic et de suivi sans effets secondaires comme les ionisations suites à la mammographie et cela indépendamment de l'expérience du technologue d'imagerie médicale ainsi qu'une possibilité d'automatiser l'analyse.

¹ <https://kce.fgov.be/en/publications/all-reports/the-right-to-be-forgotten-in-breast-cancer-new-propositions>

Diagnostic, classification et pronostique

Le diagnostic d'une tumeur mammaire est établi à partir d'un examen physique, la palpation mammaire et des aisselles, associé à l'imagerie du sein et des ganglions lymphatiques axillaires, une mammographie et une échographie bilatérale des seins. Un cancer du sein est suspecté quand une masse hyperdense hypoéchogène avec des bords spiculés et des calcifications internes est détecté lors de ces examens, ainsi qu'une dissémination potentielle dans les ganglions¹⁹.

La MRI n'est recommandée que pour des cas particuliers tels que des cas familiaux associés à des mutations *BRCA*, en cas d'incohérence entre l'imagerie conventionnelle et l'examen clinique ou avant et après un traitement chimiothérapique. Si une invasion métastatique distante est suspectée ou en présence d'une tumeur agressive : un CT-scan du corps entier, une scintigraphie osseuse et éventuellement une MRI cérébrale sont envisagés¹⁹.

Revisité récemment par l'AJCC-8th edition (*American Joint Committee on Cancer*), le système TNM (*Figure 1*) permet définir l'extension de la pathologie²⁰ :

- T : renseigne sur les propriétés de la tumeur primitive ; sa taille et sa relation avec les organes adjacents ;
- N : renseigne sur les éventuelles métastases au niveau des ganglions lymphatiques ; micro-métastase, le nombre et l'emplacement des ganglions impliqués ;
- M : renseigne sur le nombre de métastases à distance.

En fonction de la taille de la tumeur, de la présence ou non des métastases ainsi que l'implication des différents ganglions, le système TNM permettra de distinguer les différents stades d'extension de la maladie : avant le traitement (*cTNM*), après l'intervention chirurgicale (*pTNM*) et après un traitement néoadjuvant (*ypTNM*)²⁰.





Tumor size	Tumor size < 2 cm	Tumor size 2-5 cm	Tumor size > 5 cm	Tumor extends to skin or chest wall
T	 T1	 T2	 T3	 T4
Lymph Nodes	N0 No lymph node metastasis	N1 Metastasis to ipsilateral, movable, axillary LNs	N2 Metastasis to ipsilateral fixed axillary, or IM LNs	N3 Metastasis to infraclavicular/supraclavicular LN, or to axillary and IM LNs
Metastasis	M0 No distant metastasis	M1 Distant metastasis	LNs= Lymph Nodes; IM= Internal Mammary	
M				

Figure 1: Représentation simplifiée du système TNM ²¹. T1 : tumeur de taille inférieure à 2 cm ; T2 : tumeur de taille comprise entre 2 et 5 cm ; T3 : tumeur de taille supérieure à 5 cm ; T5 : la tumeur commence à envahir les tissus sous-jacents ; N0 : aucun ganglion atteint, N1 : métastase mobile, ipsilatérale sur les ganglions lymphatiques axillaires ; N2 : métastase fixe ipsilatérale sur les ganglions lymphatiques axillaires ou mammaires internes ; N3 : métastase sur les ganglions lymphatiques infra ou supra claviculaire ou sur les ganglions lymphatiques axillaires ou mammaires internes ; M0 : pas de métastase à distance et M1 : métastases à distance.

Il existe plusieurs types histologiques de cancer de sein dont deux sont majoritaires : carcinome invasif non spécifié (NOS) anciennement appelé le carcinome canalaire qui représente ± 75 % des cas et le carcinome lobulaire représentant ± 15 % des cas. Les autres types histologiques sont rares et possèdent leurs propres caractéristiques morphologiques.

Avant tout traitement, il est recommandé d'effectuer un examen anatomopathologique. Pour ce faire, un échantillon est obtenu par biopsie durant l'échographie ou avec guidage stéréotaxique de la sonde. Il faut avoir au moins deux à trois prélèvements et toutes les lésions doivent être biopsiées¹⁹. L'échantillon va subir une série d'analyses visant à inclure ou exclure la présence d'un carcinome canalaire *in situ*, définir le grade de la tumeur et le type histologique par des examens immunohistochimiques et histologiques afin d'orienter au mieux le choix thérapeutique pour le patient ¹⁹.

Afin de fournir une meilleure option thérapeutique aux patients, l'*American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist* recommande l'évaluation par immunohistochimie de l'expression des récepteurs d'œstrogène (ER), de progestérone (PgR) et le récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2)^{22,23}. Différentes limites de positivité sont établies pour les paramètres explorés. Cette classification basée sur les récepteurs définit 3 groupes de patientes dont les traitements diffèrent : hormono-sensible ER+/HER2-, ER-/HER2+ et triple négatifs (TNBC=triple negative breast cancers). Les groupes ER+/HER2- et ER-/HER2+ peuvent être également divisés en 2 autres groupes de pronostiques différents en fonction de l'expression de PgR et de Ki-67.

Un cancer peut être qualifié d'hormono-sensible pour autant qu'une détection par immunohistochimie (IHC) pour les récepteurs aux œstrogènes (ER) et/ou les récepteurs de la progestérone (*PgR*) donnent au moins 1 % des cellules tumorales exprimées *ER* et *PgR* ; cela représente approximativement 80 % des cancers, qui peuvent être traités par des thérapies endocrines²⁴.

Un cancer peut être considéré comme positif pour le *HER2* pour autant qu'une détection par IHC et/ou par FISH (*fluorescence in situ hybridization*) donne 10 % des cellules tumorales positives par l'IHC ou une amplification de *HER* est détectée par FISH. Les cancers *HER* positifs représentent environ 20 % des cas et peuvent être traités par anticorps monoclonaux spécifiques²³.

L'antigène *Ki-67* exprimé durant toutes les phases du cycle cellulaire à l'exception de la phase G0. Bien que sa quantification ne soit pas recommandée en routine, l'antigène *Ki67* permet d'estimer le nombre de cellules tumorales ayant une activité mitotique. Le *Ki67* est surtout utilisé comme facteur de pronostic, pour orienter le traitement (adjuvant ou néoadjuvant) et prédire la réponse au traitement pour les cancers hormono-sensible (*ER+/HER2-*). En effet, un taux élevé de *Ki67* après un traitement néoadjuvant du cancer *ER-/HER2+* et *ER-/HER2-* est associé à un pronostic défavorable pour le patient²⁵.

L'évaluation morphologique du degré de différenciation de la tumeur mammaire repose sur trois paramètres : le pourcentage de formation de tubules, le degré de pléomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses sur une zone bien définie de l'échantillon. Cela permet de classer les tumeurs en trois catégories appelées grade de Bloom pour établir le pronostic ainsi que de prédire la progression de la tumeur²⁶.

Il existe également une classification des tumeurs basées sur l'expression génique et obtenue par analyse de différents ADNc par microarrays. Cette analyse permet la classification des tumeurs mammaires en 5 groupes qui recourent les groupes précédemment décrit (*Figure 2*)²⁷ :

- Le *Basal-like* ayant comme particularité une expression élevée de cytokératine 5 et 17, de laminine et de la protéine de liaison aux acides gras ; aussi appelé TNBC dans la classification basée sur les récepteurs car les IHC et FISH sont négatives pour *ER*, *PgR* et *HER2*.
- Le *ERBB2+* (*HER2+*) basée sur une surexpression du gène *ERBB* sans expression de *ER* et *PgR* ; ce groupe correspond au groupe *ER-/HER+* dans la classification basée sur les récepteurs.
- Le Luminal A avec une haute expression des récepteurs *ERα* et de *PgR* mais une faible expression de *Ki67* sans surexpression de *HER2* ; ce groupe correspond au groupe *ER+/HER2+* dans la classification basée sur les récepteurs ;
- Le Luminal B pouvant être divisé en deux sous types dont l'un est *HER2-* avec une faible expression de *ER* et *PgR* mais une haute expression de *Ki67*. Ce sous-groupe présente un moins bon pronostic que le second qui est *HER2+* avec une expression de *ERα* et négatif pour *PgR* et *Ki67* aussi appelé Luminal C ;
- Le Normal breast-like caractérisé par une expression anormalement élevée des gènes du tissu adipeux et d'autres gènes non épithéliaux. Ce groupe ne correspond à aucun des groupes de la classification par les récepteurs.

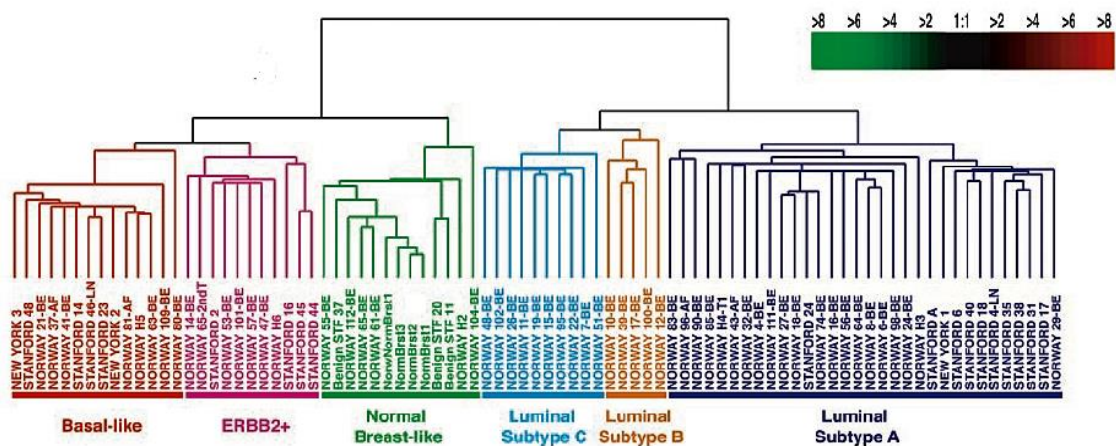


Figure 2: Classification moléculaire du cancer du sein : clustering hiérarchique des gènes selon l'étude réalisée en 2001 analysant l'ADNc par microarrays. 5 groupes de cancer du sein. On distingue : le groupe Basal-like correspondant au TNBC, ERBB2+ correspondant au HER2+, le sous type luminal correspondant au ER+ avec le luminal B pouvant avoir un HER2+ ou HER2-, et le normal breast like n'ayant pas de correspondance dans la classification basée sur les récepteurs.²⁷

A ce jour, il existe 5 tests basés sur les techniques de biologie moléculaire permettant l'analyse des profils génétiques du cancer de sein : MammaPrint (Agendia, Amsterdam, The Netherlands), Oncotype-Dx Recurrence Score (Genomic Health, Redwood City, CA), Prosigna (PAM 50 ; NanoString Technologies, Seattle, WA), Endopredict (Myriad Genetics Salt Lake City, UT) et Breast Cancer Index (Biotheranostics, Inc., San Diego, CA). Ces tests identifiants des signatures géniques ont permis de comparer les traitements entre et à travers les différents sous types de cancer du sein²⁸.

Le sous type Luminal A est le plus fréquent, le moins agressifs et de bas grade comparé aux autres sous types. Les différents sous types moléculaires et leurs équivalent histologiques n'ont pas le même pronostic ni la même approche thérapeutique, et encore moins la même réponse au traitement : une sensibilité aux traitements hormonaux pour les sous-types Luminal A et B, une sensibilité aux molécules anti-HER2+ pour le sous type ERBB2+ et certains du sous type Luminal B, et une haute sensibilité à la chimiothérapie pour le sous type TNBC²⁹. Cependant, bien qu'ils soient moins agressifs, les sous-types Luminal ont un taux de récurrence plus élevé après 5-20 ans de suivi en comparaison aux autres sous types (HER2+ et TNBC)³⁰.

Afin de mieux définir et prédire l'approche thérapeutique, des facteurs pronostiques liés à la survie du patient et prédictifs liés à l'efficacité du traitement sont pris en compte. Plusieurs facteurs sont considérés à la fois comme pronostiques et prédictifs, nous pouvons citer entre autres : l'âge du patient avec un mauvais pronostic pour les femmes en dessous de 50 ans, la taille de la tumeur, le statut d'envahissement des ganglions lymphatiques auxiliaires, le grade histologique et le pouvoir mitotique (Ki67) ainsi que le statut hormonal (ER et PgR) et HER2 qui est aussi considéré comme facteur prédictifs etc³¹.

Le taux d'infiltration lymphocytaire de la tumeur (TILs) est un biomarqueur pronostique et la prédictif de la réponse au traitement pour le cancer du sein. Bien qu'il ne soit pas encore d'usage partout en routine clinique, il a été démontré que les tumeurs mammaires ayant un taux élevé de TILs ont un meilleur pronostic de survie et une meilleure réponse au traitement dans les différents sous-types moléculaires³².

Prise en charge du cancer de sein

La prise en charge thérapeutique vise à améliorer l'état du patient en termes de guérison et de survie globale ainsi que l'amélioration de l'état fonctionnel et la qualité de vie du patient. Chaque patient doit être associé au processus décisionnel de sa prise en charge¹⁹. Cette prise en charge est une procédure complexe combinant des interventions locales (chirurgie et radiothérapie), systémiques (chimiothérapie, thérapie endocrine, thérapie ciblée) et d'autres mesures de renforcement. L'orientation de la décision thérapeutique se base sur plusieurs facteurs incluant la taille et la localisation de la tumeur, l'âge du patient et le statut ménopausique, le stade et grade de la tumeurs grâce à l'utilisation des biomarqueurs prédictifs (*ER*, *PgR*, *Ki67*, *HER2* et la signature génique)¹⁹.

Interventions locales : la chirurgie et la radiothérapie

A ce jour, la norme des soins pour le traitement du cancer de sein au stade précoce est la chirurgie mammaire conservatrice (BCS) et ce comprenant la tumorectomie et la quadrantectomie associées à la radiothérapie pour les tumeurs plus étendues¹⁹.

Une radiothérapie du sein entier après BCS réduit de $\pm 15\%$ le risque de rechute sur 10 ans et $\pm 3\%$ le risque de mortalité sur 15 ans³³. En effet, une étude démontre une nette amélioration en termes de survie globale et relative lors de l'usage de BCS combiné à la radiothérapie comparée à la mastectomie pour les cancers au stade T1-2 N0-1 M0 avec une amélioration sur la survie à 10 ans sans métastases à distances pour les cancers au stade T1 N0 uniquement³⁴.

Pour les patients à hauts risques, ceux ayant une implication d'au moins 4 ganglions lymphatiques, ceux avec une marge de résection positive² et ceux au stade T3-T4 indépendamment du statut ganglionnaire : il est recommandé de pratiquer une radiothérapie après la mastectomie. En effet, une radiothérapie après la mastectomie dans ce cas réduit de 10% le risque de récurrence à 10 ans et de 8% le risque de mortalité à 20 ans. Et enfin, une irradiation ganglionnaire est recommandée en cas d'implication des ganglions. Après une dissection des ganglions lymphatiques auxiliaires, une biopsie du ganglion sentinelle est réalisée et une irradiation de la partie résiduelle de l'aisselle est en en cas de résultats positifs de la biopsie³⁵.

Intervention systémique : (Néo) Adjuvant et la chimiothérapie

La chimiothérapie adjuvante est un traitement ayant pour but de réduire le risque de rechute, elle débute au plus tard 12 semaines après la chirurgie avec des meilleurs résultats prouvés lorsqu'elle débute à 4 semaines pour le cancer du sein au stade II-III, les *HER2+* et les TNBC. D'autres part, la chimiothérapie néoadjuvante est un traitement pré-chirurgical visant à réduire l'extension de la chirurgie lorsqu'une mastectomie est requise pour des cas de tumeurs de grandes tailles par exemple, ou des tumeurs *HER2+* ou encore TNBC. Cependant, leur prescription tient compte des facteurs de risques de rechute, des facteurs biologiques (*ER*, *PgR*, *Ki67*, etc.), du grade histologique et de l'âge ainsi que la comorbidité du patient et la signature génique¹⁹.

² Une marge de résection positive veut dire que le chirurgien laisse volontairement du tissu tumoral lors de la chirurgie ; il coupe dans la tumeur plutôt qu'autour de la tumeur.

Lorsque la tumeur est de grande taille ou a atteint le ganglion lymphatique auxiliaire mais qu'elle est sensible à la chimiothérapie, cas des tumeurs TNBC et *HER2+*, une approche par chimiothérapie néoadjuvante suivie d'une BCS est à préconiser plutôt qu'une simple mastectomie. La tumeur doit être marquée et une MRI effectuée avant et après le début de la prise en charge¹⁹.

Les sous-types Luminal sont plus sensibles à la thérapie endocrinine qu'à la chimiothérapie mais en cas de tumeur agressive (stade T3 ou plus) ou lorsqu'au moins 4 ganglions lymphatiques sont touchés, la chimiothérapie est le traitement recommandé. La chimiothérapie est plus efficace dans ce cas en combinaison avec des inhibiteurs de *CDK4/6*, dans les cancers métastatiques^{36,37}. Les sous-types TNBC ont une meilleure sensibilité à la chimiothérapie qui est le traitement de premier choix pour ce type de cancer. Pour les cancers *HER2+* y compris le sous-groupe Luminal B/*HER2+*, le protocole de soin est la chimiothérapie associée à des molécules anti-*HER2* tel que le *Trastuzumab* et l'hormonothérapie pour les types Luminal B¹⁹.

Bien que le cancer du sein soit considéré comme faiblement immunogène³, des études récentes montrent que l'immunothérapie serait efficace sur les formes TNBC. Plusieurs études sont en cours afin d'affiner le protocole de traitement et le rendre plus personnalisé en le combinant avec d'autres inhibiteurs.

Le système immunitaire et le cancer : focus sur les éosinophiles

Introduction

L'hypothèse initialement émise par Burnet et al., selon laquelle le système immunitaire reconnaît et élimine les cellules naissantes transformées, l'immunosurveillance a évolué vers un concept plus global « *l'immunoédition* » où le système immunitaire influe sur le développement et la progression du cancer. Cette influence par un mécanisme dynamique facilite la transformation cellulaire, prévient ou contrôle la croissance tumorale et façonne l'immunogénicité tumorale par trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'évasion. Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont des acteurs majeurs dans le processus de *l'immunoédition*. Les lymphocytes T CD8+ sont capables de reconnaître les antigènes tumoraux par les récepteurs TCR (*T cell receptor*) et sécréter des granules cytotoxiques, alors que les lymphocytes T CD4+ permettront la prolifération et l'activation lymphocytaire³⁸. Cependant, une activation prolongée et chronique du système lymphocytaire conduit à un épuisement du système par boucles de contrôles négatives induisant l'épuisement lymphocytaire, l'activation des lymphocytes Treg ou encore l'activation des points de contrôle immunitaire³⁹.

De plus, les cellules cancéreuses peuvent par elles-mêmes inhiber la réponse immunitaire à différents points de contrôle en exprimant ou sécrétant certaines molécules comme le *PDL-1* (*Programmed death ligand-1*), le *TGF-β1* (*Transforming growth factor beta1*) et l'interleukine 10 (*IL-10*) ainsi que le iNOS (*inductible Nitric Oxyde Synthase*).

³ La capacité qu'a un corps étranger à induire la réponse immunitaire.

L'administration d'inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI) a permis d'observer des rémissions durables dans plusieurs types de cancer. Cependant pour le cancer du sein en général, et le TNBC en particulier, le traitement aux ICIs n'est efficace qu'en association avec une chimiothérapie : néoadjuvante pour les cancer primaires ou adjuvante pour les cancers métastatiques⁴⁰. Plusieurs études cliniques en cours se concentrent sur des nouvelles thérapies ciblant les ICIs. Nous pouvons citer : l'Ipilimumab (antigène lymphocytaire cytotoxique), le Nivolumab et le Pembrolizumab (des protéines *PD1*, *Programmed death*) ou l'Atézolizumab, le Durvalumab et l'Avelumab (des *PDL-1*)^{41,42}.

Les cellules immunitaires circulantes et infiltrants la tumeur

Le nombre de cellules immunitaires circulantes est associé à la réponse à la chimiothérapie et au pronostic des cancers du sein. Un taux élevé de lymphocytes circulants est corrélé avec un risque de rechute diminué et à des faibles taux de mortalité pour les cancers de sein de type TNBC⁴³. De plus, il a récemment été prouvé que le NLR (*neutrophils lymphocytes ratio*) constitue un facteur pronostic. En effet, un NLR élevé est associé à des caractéristiques tumorales plus agressives ; les PLR (*platelet neutrophil ratio*) et MLR (*monocytelymphocyte ratio*) seraient aussi liés à des pronostics défavorables pour le patient^{44,45}.

Les lymphocytes infiltrants les tumeurs (*TILs*) sont présents dans de nombreuses tumeurs solides⁴⁶. Dans le cancer du sein, les *TILs* influent sur la réponse au traitement chimiothérapique néoadjuvant. Les sous-types *TNBC* et *ER-/HER2+* ont tendance à avoir un nombre de *TILs* plus élevé en comparaison aux sous-types *ER+/PgR+*. En fonction de leur localisation, un taux de *TILs* élevés est associé à un nombre de réponses pathologiques complètes (*pCR*) plus élevé : dans le sous-type *TNBC*, l'infiltration stromale et tumorale sont associées à des *pCR* élevées lorsque l'immunothérapie est associée au traitement néoadjuvant⁴⁷ alors que dans les sous-types Luminal, seule l'infiltration intratumorale est associée à un nombre élevé de *pCR*⁴⁸.

Il existe différentes populations de lymphocytes infiltrants ayant chacune leur propre contribution à la réponse au traitement. Les lymphocytes T CD8+ par exemple sont souvent associés à un pronostic favorable alors que les lymphocytes Treg eux sont associés à un pronostic défavorable. De plus, la chimiothérapie induit une diminution des cellules Treg mais pas des CD8+⁴⁹. Une diminution significative de cellule FoxP3+ (lymphocyte Treg) a été constatée dans la cohorte des patients avec un taux de *pCR* élevé comparée aux patients ne répondants pas aux traitements^{39,49}. Un continuum phénotypique est observé dans les lymphocytes associés à la tumeur. Des taux variables de PD-1 ainsi que des récepteurs co-inhibiteurs tels que cellules *TIM-3* (*T cell immunoglobulin and mucin domain 3*) ou *CTLA-4* (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) ont été constatés ; à savoir que des taux élevés de ces protéines sont associés à un épuisement des lymphocytes⁵⁰.

L'infiltration tumorale ne se limite pas aux *TILs* mais inclut d'autres types cellulaires tels que les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes B et les cellules NK (*Natural Killer*), les cellules dendritiques, les basophiles et les éosinophiles. Une étude analysant le profil d'expression de 11 000 cancers du sein pour 22 types de cellules immunitaires par déconvolution informatique via l'algorithme CIBERSORT a constaté que les cellules Treg et les macrophages étaient associés à des diagnostics défavorables indépendamment du statut *ER*.

Dans les cancers *ER-*, une faible infiltration immunitaire est associée avec le moins bon pronostic alors qu'un meilleur pronostic est associé à une forte infiltration des lymphocytes CD8+ et T mémoire. De plus, la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante est associée à une infiltration de cellules T helper (Th) et B mémoire. En revanche, les macrophages M2 sont associés à un manque de réponses complètes⁵¹.

Les cellules NK, impliquées dans l'immunité innée, semblent être responsables de l'élimination des cellules initiatrices de tumeurs d'une part ; et d'autre part, les cellules NK peuvent fournir une activité antitumorale par la sécrétion des cytokines et chimiokines permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires⁵². Les cellules dendritiques (DCs) en présentant l'antigène au lymphocyte T ou en engendrant l'expression des récepteurs co-stimulants comme le CD80 et CD86, permettent l'amorçage, la migration et la maturation des lymphocytes T⁵². Cependant, il existe plusieurs sous-types de DCs ayant des actions différentes ; par exemple l'infiltration tumorale par les DC CD103+ induit la réponse T cytotoxique anti tumorale alors que les plasmacytoïdes inhibent la croissance tumorale en activant les cellules NK et T CD8+. En revanche, une étude a montré que la présence des DC CD123+ était associée à une infiltration ganglionnaire de la tumeur et un grade tumoral élevé ainsi qu'un pronostic défavorable⁵³.

En fonction de l'anoxie tissulaire, de l'inflammation et des niveaux élevés d'acide lactique, les macrophages sont recrutés au site tumoral par les cytokines du microenvironnement tumoral⁵⁴. Les TAMs (*Tumor associated macrophage*) se différencient en fonction du microenvironnement tumoral ce qui conduit à une différenciation cellulaire hétérogène. Les TAMs peuvent jouer un double rôle dans le cancer : les M1 seraient associés à une activité antitumorale alors que les M2 à une activité pro tumorale et liée à un mauvais pronostic⁵⁴.

L'implication des neutrophiles dans les cancers reste controversée. D'une part, les neutrophiles peuvent induire la mort des cellules tumorales en sécrétant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des protéases, des chimiokines et des cytokines ; et d'autre part, ils sont considérés comme pro-tumorigènes en favorisant l'invasion tumorale et la progression métastatique. Bien que la présence de neutrophiles dans le tissu tumoral mammaire primaire soit faible, les neutrophiles secrètent des leucotriènes qui ont un effet tumorigène sur les cellules cancéreuses ; cela favorise l'implantation des cellules cancéreuses au niveau pulmonaire et donc, les métastases au niveau pulmonaire. De plus, une étude a souligné le rôle des neutrophiles dans l'inhibition des lymphocytes T CD8+⁵².

En induisant la lyse cellulaire et en modulant la réponse immunitaire, les éosinophiles sont considérés comme des cellules multifonctionnelles pouvant avoir une double activité pro et/ou anti tumorale.

Les éosinophiles

Physiologie et fonctions des éosinophiles

Les éosinophiles se reconnaissent par leur noyau bilobé et leur cytoplasme rempli de granules sécrétoires positifs à la coloration acidophile. Ils sont essentiellement connus pour leur implication dans la réponse contre les parasites, et les allergies³⁹.

Les éosinophiles représentent 1 à 5 % des globules blancs circulants et sont principalement présents dans les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus, le tractus gastro-intestinal, les voies respiratoires, le tissu adipeux, l'utérus et le sang⁵⁵. Les éosinophiles se différencient à partir des progéniteurs myéloïdes exprimant CD34 par l'action de plusieurs facteurs de transcriptions (GATA-1, PU.1 et CCAAT/*enhancer-binding protein*) et de cytokines (GM-CSF, IL-3 et IL-5)⁵⁶. Leur migration tissulaire dépend principalement l'éotaxine-1 (C-C motif chimiokine ligand 11 ou CCL11) se liant au récepteur CCR3 (*C-C motif chimiokine receptor*) qui est exprimé par les éosinophiles, les basophiles, les T helper et les cellules épithéliales des voies respiratoires. L'IL-5 et l'IL-33 sont également importantes dans la régulation de la migration des éosinophiles : l'IL-33 accroît la sécrétion de l'éotaxine-1, alors que l'IL-5 améliore la sensibilité des éosinophiles à l'éotaxine-1 et favorise leur survie⁵⁵. D'autres éotaxines telles que CCL24, CCL26 et CCL25 (*Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted*, RANTES) sont également impliquées dans le recrutement des éosinophiles³⁹.

L'activité cytotoxique des éosinophiles est due à la sécrétion par les granules cytoplasmiques des protéines basiques majeures 1 et 2 (MBP-1, MBP-2), de la protéine cationique des éosinophiles (ECP), de la neurotoxine dérivée des éosinophiles (EDN) et de l'éosinophile peroxydase (EPO). D'autres part, les éosinophiles secrètent également de nombreux facteurs afin de maintenir leur activation et leur recrutement : les cytokines induisant la réponse T helper (Th)1 (IL-2, IL-12, IFN- γ) ou la réponse Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et IL-25), les médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique, les facteurs de croissance (GM-CSF, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), etc.), et les chimiokines⁵⁷. De plus, les éosinophiles agissent en sécrétant l'ADN mitochondriale avec les protéines de granules pour former des pièges à ADN facilitant l'immobilisation et l'élimination des microorganismes extracellulaires⁵⁸.

Chez l'homme, l'un des marqueurs spécifiques des éosinophiles est la Siglec-8, lectine 8 de type Ig liant l'acide sialique (Siglec-F chez la souris) exprimée à la surface cellulaire de manière proportionnelle à la maturation des éosinophiles. Siglec-8 est un récepteur immunorégulateur inhibiteur, capable d'induire l'apoptose des éosinophiles lorsqu'il est lié à son ligand⁵⁹. Les éosinophiles expriment différents récepteurs impliqués dans l'immunité innée et adaptative : les récepteurs *Toll-like* (TLR), les récepteurs activés par la protéase (PAR), les récepteurs des médiateurs lipidiques (leucotriènes, facteur d'activation des plaquettes, prostaglandine), les récepteurs du complément, et les récepteurs de chimiokines (CCR1, CCR2, CCR3, CXCR3) sont impliqués dans l'immunité innée alors que les récepteurs de l'immunité adaptative sont les récepteurs Fc (IgE, IgA et IgG), les récepteurs à histocompatibilité majeure I et II (MHC I et II), les molécules de costimulation des lymphocytes T (CD86, CD40, CD40L, CD28), les récepteurs des cytokines, et le complexe TCR $\gamma\delta$ /CD3 ainsi que les PPR (*pattern recognition receptors*) (Figure 3)⁵⁷.

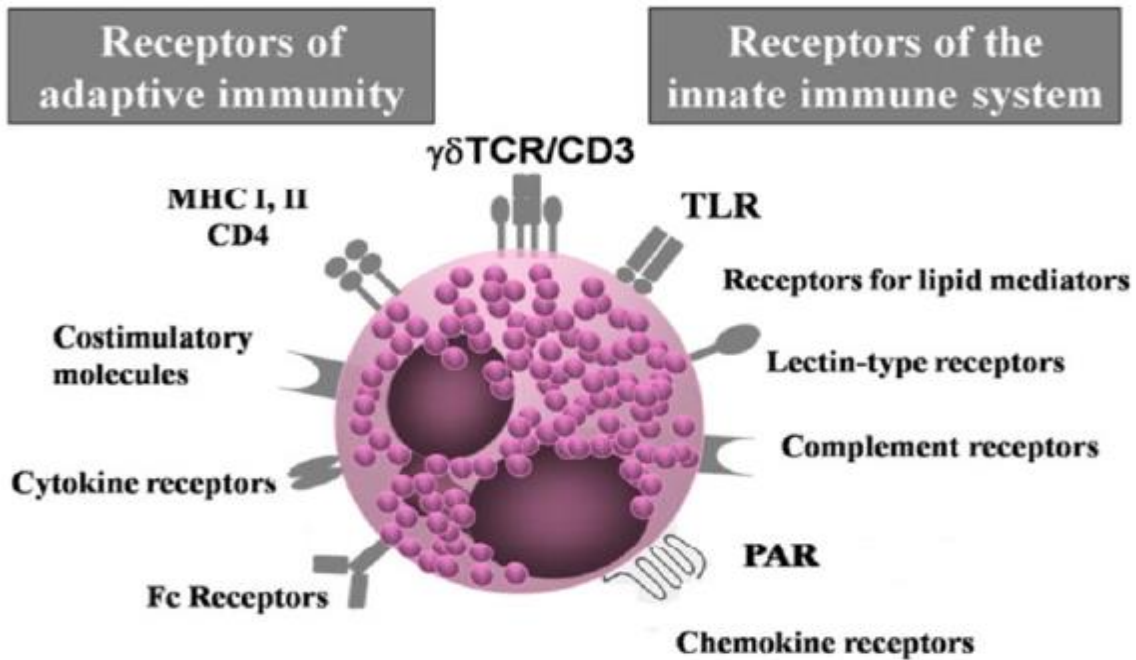


Figure 3: Illustration des principaux récepteurs exprimés à la surface des éosinophiles impliqués dans l'immunité innée et adaptative⁵⁷.

Rôle des éosinophiles dans le cancer

L'implication pro ou anti tumorale des éosinophiles dans le cancer est connue et a été décrite depuis plus de 100 ans⁶⁰.

Il semble que la migration des éosinophiles au site tumorale soit liée d'une part à des facteurs chimiotactiques comme les éotaxines, RANTES et les DAMPs (*damage-associated molecular pattern*) sécrétés par les cellules nécrotiques ; et d'autre part la sécrétion, par les lymphocytes du microenvironnement tumoral (TME) et les cellules tumorales, d'IL-5 et GM-CSF^{56,57}. Généralement l'accumulation des éosinophiles est associée à un pronostic favorable⁵⁶.

Activités antitumorales des éosinophiles

L'activité antitumorale des éosinophiles peut être directe ou indirecte. L'action directe se fait via la libération des granules cytotoxiques, et l'action indirecte en modulant la réponse immunitaire notamment par attraction des lymphocytes T CD8+ qui inhibent le développement tumoral^{57,61}. L'inflammation et les fonctions phagocytaires sont favorisées par la polarisation des macrophages en sous-type M1 induit par les éosinophiles (*Figure 4*)⁶¹.

Des études réalisées *in vivo* dans des modèles murins montrent une activité antitumorale des éosinophiles. Dans un modèle murin du cancer de sein utilisant les cellules EMT6, l'administration des inhibiteurs de DPP4 a conduit à l'accumulation intratumorale de CCL11 induisant une chimiotaxie des éosinophiles et la réduction de la croissance tumorale⁶². L'administration d'IL-33, lors d'une expérience sur un modèle de cancer du sein murin métastatique utilisant les cellules cancéreuses 4T1, a conduit au recrutement des cellules NK dans les poumons, grâce à la production de CCL5 par les éosinophiles et les cellules T CD8+ ainsi qu'à l'activation des cellules NK via l'augmentation de l'expression d'IL-33⁴². Une étude récente sur un modèle murin utilisant l'implantation orthotopique des cellules EO771, a montré que le traitement anti CTLA4 induit une augmentation des vaisseaux sanguins intra tumoraux et une meilleure efficacité du traitement⁶³.

Dans plusieurs modèles murins de tumeur, incluant des modèles de cancer du sein, il a été démontré que l'administration intraveineuse ou intrapéritonéale d'IL-25 (IL-17E) induisait une réaction antitumorale seule ou en association avec un traitement via l'expansion des éosinophiles par la production d'IL-5⁶⁴. La réponse à l'immunothérapie est perdue lors de la déplétion des éosinophiles durant une étude sur les modèles murins des cancers du sein primitifs et métastatiques⁶⁵.

Mattes et al. ont montré dans un modèle murin du mélanome que l'infiltration par les éosinophiles et leur dégranulation permettent aux cellules Th2 d'inhiber l'invasion métastatiques par les lymphocytes T cytotoxiques⁶⁶. L'action antitumorale des éosinophiles via les lymphocytes T CD8+ est pilotée par l'axe facteur de régulation 5 GM-CSF-interféron (IRF5) et peut être contre-réglée par IL-10. Enfin, une étude a montré l'impact de la radiothérapie sur éosinophiles : la radiothérapie accroît l'infiltration par les éosinophiles qui ont une activité antitumorale⁶⁷.

Activités pro-tumorales des éosinophiles

A contrario, les éosinophiles peuvent exercer une activité pro-tumorale par l'action de la métalloprotéinase 9 (MMP9) qui favorise le développement des métastases à distance. Les éosinophiles peuvent aussi induire la prolifération des fibroblastes et l'angiogenèse par l'action des facteurs de croissance et des cytokines tels que le facteur de croissance tumoral bêta 1 (TGFβ-1), CCL18, facteur de croissance des fibroblastes (FGF), facteur de croissance nerveuse (NGF), facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), IL-8, IL-6 et VEGF. De plus, via l'action d'IL-4 et IL-13, les éosinophiles peuvent induire une polarisation des macrophages en phénotype M2 qui a une activité immunosuppressive (Figure 4)⁵⁷.

Des études montrent un rôle pro-tumoral des éosinophiles. La stimulation de la moelle osseuse par IL-33 induisant l'augmentation des éosinophiles semble accélérer la progression tumorale et le développement des métastases dans le modèle murin pour le cancer du sein^{68,69}. Une récente étude montre que le gène IL-33 est up-régulé dans les fibroblastes associés au cancer (CAF) dans les métastases pulmonaires dans le modèle murin *MMTV-PyMT*. Cela entraîne le recrutement des cellules inflammatoires, notamment les éosinophiles, aux sites des métastases. L'inhibition *in vivo* d'IL-33 a conduit à l'inhibition des métastases et la réduction du recrutement des cellules inflammatoires⁷⁰. Une autre étude a montré que myéloperoxydase (MPO) et l'EPO favorisent le dépôt de collagène, la migration fibroblastique et l'angiogenèse conduisant à la croissance tumorale et l'apparition des métastases⁷¹.

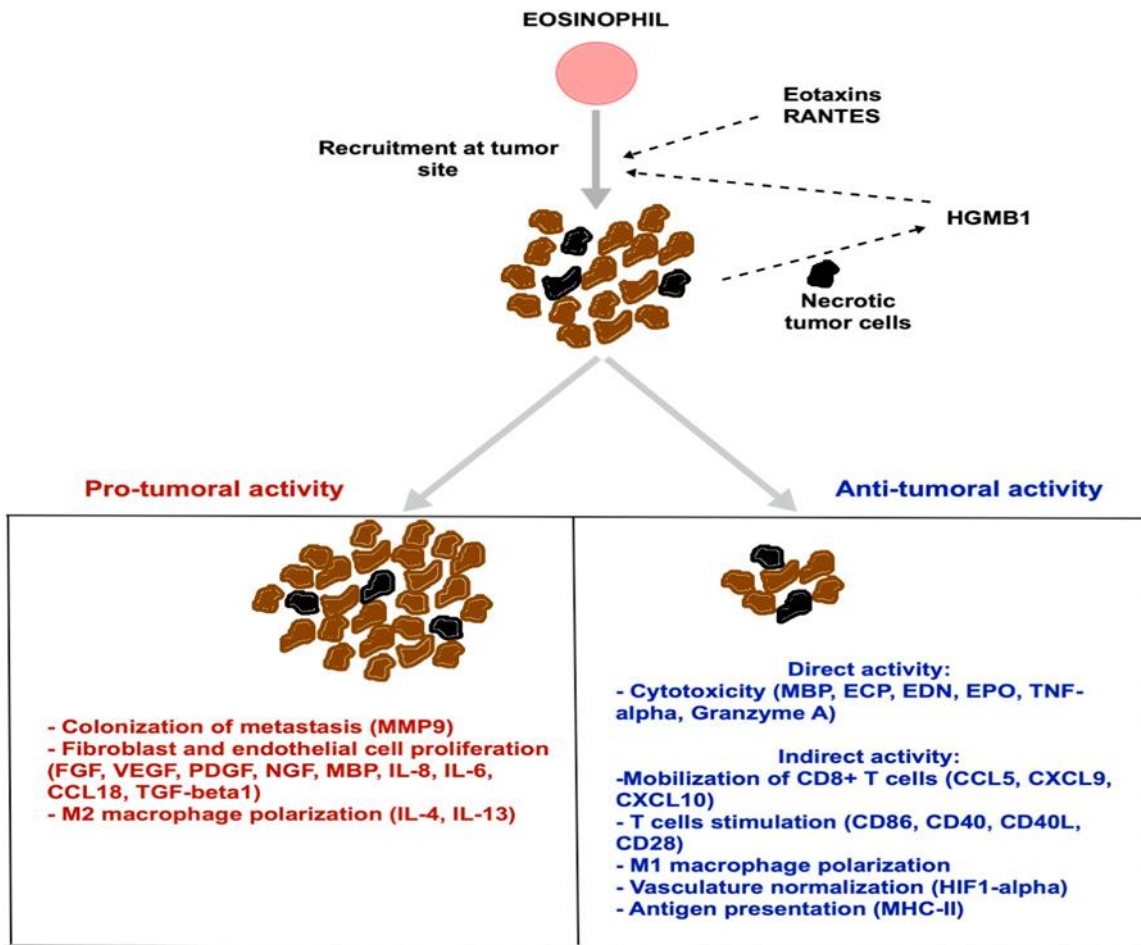


Figure 4: Les éosinophiles sont recrutés au site tumoral par l'action des molécules chimioattractantes et peuvent avoir une action pro ou antitumorale³⁹.

Les éosinophiles et le cancer du sein.

L'éosinophilie tissulaire associée aux tumeurs (TATE)

L'éosinophilie tissulaire associée aux tumeurs (TATE) a fait l'objet de plusieurs études dont une méta-analyse récente montrant que la TATE était associée à un bon pronostic dans les tumeurs solides⁷². Lors d'une étude analysant le transcriptome de 11 000 cas de cancer du sein utilisant l'algorithme CIBERSORT, les auteurs ont constaté une association entre l'infiltration des éosinophiles et un meilleur pronostic pour les patients ER+. Cependant aucune association n'a pu être montrée entre la TATE et la réponse au traitement néoadjuvant⁵¹.

Plus récemment, une équipe a réalisé une autre étude du même type sur les échantillons de cancer de sein du TCGA (Atlas de 100 génomes du cancer) pour les signatures des éosinophiles de 1069 patients par l'algorithme CIBERSORT⁷³. Les auteurs ont détecté une TATE chez 3.7% des patients de la cohorte et ce majoritairement dans le sous-type Luminal. Les patients TATE positifs avaient une prévalence des cellules auxiliaires folliculaires T et des monocytes par rapport au cancer sans infiltration d'éosinophiles mais ils avaient une moins bonne représentation de cellules T CD4+, des lymphocytes B naïfs et des mastocytes. Dans cette étude, la TATE était associée à une meilleure survie sans récurrence mais aucune association avec la survie générale n'a pu être observée (Figure 5)⁷³.

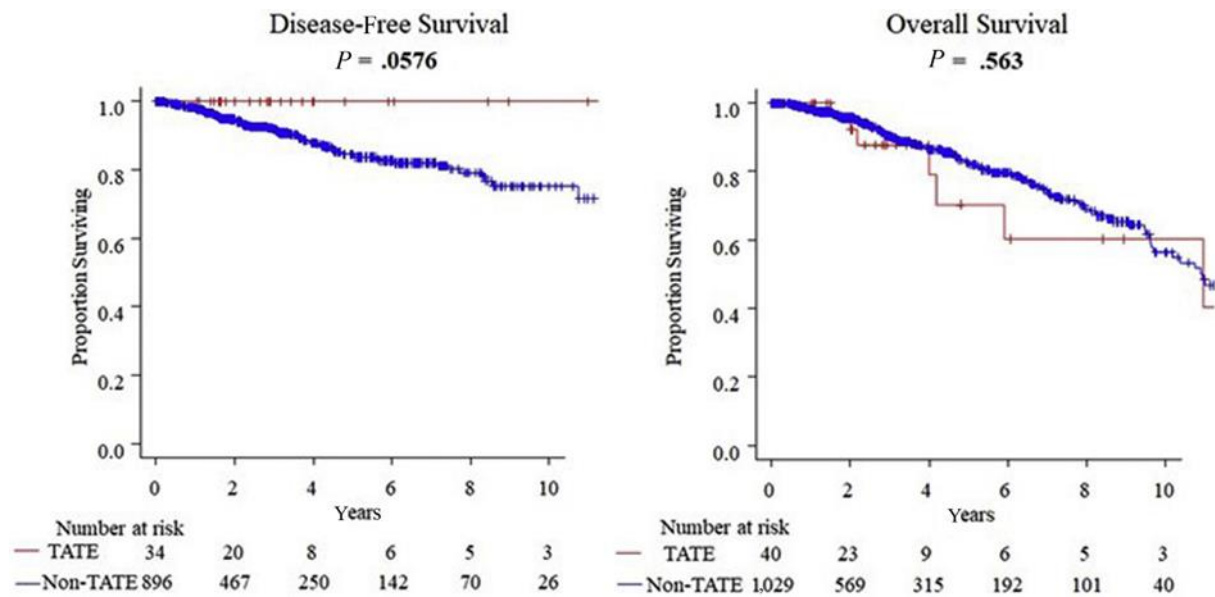


Figure 5: Courbe de Kaplan-Meier comparant la survie sans récurrence et la survie générale entre les groupes TATE positifs et sans TATE. La TATE est associée à une meilleure survie sans récurrence⁷⁴.

Une autre étude a utilisé des anticorps anti-EPO (*eosinophil peroxidase*) pour évaluer la TATE par IHC. Les auteurs ont constaté une infiltration stromale des éosinophiles dans la plupart des cancers, dont les cancers du sein. De plus, les cancers avec une forte expression du récepteur ER avaient un nombre plus faible d'éosinophiles dans le stroma, sans association avec l'expression des récepteurs PgR et HER2+. De plus, une corrélation positive a été observée entre l'infiltration intra-tumorale et/ou stromale avec le stade tumoral et la taille de la tumeur primitive, mais pas avec le grade de la tumeur⁷⁵.

Lors du congrès de l'ESMO 2020, une étude présentée a montré pour les tumeurs biopsiées qu'une augmentation de la signature génique des éosinophiles était associée à une réponse aux traitements durant l'immunothérapie bloquant les points de contrôle immunitaire (ICI) ; et par un modèle murin, cette étude a pu mettre en évidence le rôle fonctionnel des éosinophiles durant les traitements ICI⁶⁵.

Dans notre laboratoire d'Oncologie Médicale (Professeur G. Jerusalem, Université de Liège), une IHC utilisant des anticorps anti-MBP (protéine de base majeure - expression spécifique dans les granules d'éosinophiles) sur les tissus tumoraux de 70 patientes atteintes d'un cancer du sein pour lesquelles les nombres relatifs d'éosinophiles circulants (REC) étaient disponibles, a montré que :

- 1,12 % des cellules du stroma étaient des éosinophiles, et elles infiltrèrent toutes les tumeurs.
- Le nombre d'éosinophiles infiltrants est plus faible chez les patients avec un REC élevé.
- Une infiltration par les éosinophiles élevée est associée avec une moins longue durée de survie sans récurrence.

Les éosinophiles circulants

A ce jour, il existe assez peu d'informations sur la relation entre le nombre d'éosinophiles circulants dans le cancer du sein et le devenir des patients³⁹. Une étude datant de 1983 sur 419 patients atteints du cancer de sein de différents sous-types sans informations sur leur traitement, a trouvé une relation positive entre un taux élevé d'éosinophiles au moment du diagnostic et un faible taux de récurrence chez ces patients. Les auteurs ont établi la corrélation entre les lymphocytes et le nombre d'éosinophiles : les patients avec un faible nombre d'éosinophiles avaient tendance à avoir un faible nombre de lymphocytes⁷⁶. A contrario, une étude rétrospective récente a évalué la valeur pronostique de différents paramètres du sang périphériques chez 62 patients HER2+ traités par le Trastuzumab. Cette étude a conclu que les patients avec un faible taux d'éosinophiles au moment du diagnostic avaient un meilleur taux de survie sans récurrence⁷⁷.

Récemment, notre laboratoire a mené une analyse rétrospective évaluant le REC et RLC (nombres relatifs des lymphocytes circulants) sur 112 patients TNBC et ER-/HER2+ recevant un traitement néoadjuvant. L'équipe du Professeur Jerusalem a observé un meilleur taux de réponse pathologique complète et une amélioration de la survie spécifique au cancer du sein chez les patients avec un REC et un RLC élevé⁷⁸. Dans une seconde étude, la valeur pronostique des éosinophiles circulants dans le cancer du sein a été étudiée dans une cohorte plus grande (930 patients au stade précoce). L'étude a montré une association entre un REC élevé et un meilleur pronostic dans tous les sous-types cancéreux, et plus particulièrement chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie ni d'anti-HER2. De manière intéressante, il semble que la présence de la tumeur elle-même peut affecter le nombre d'éosinophiles circulants : une élévation du REC est observée juste après chirurgie. Le nombre d'éosinophiles circulants reste ensuite stable au cours du temps chez les patients n'ayant pas eu de rechute durant les 10 ans de suivis mais diminue chez les patients qui développent les métastases lors d'une rechute (*Figure 6*)⁷⁴.

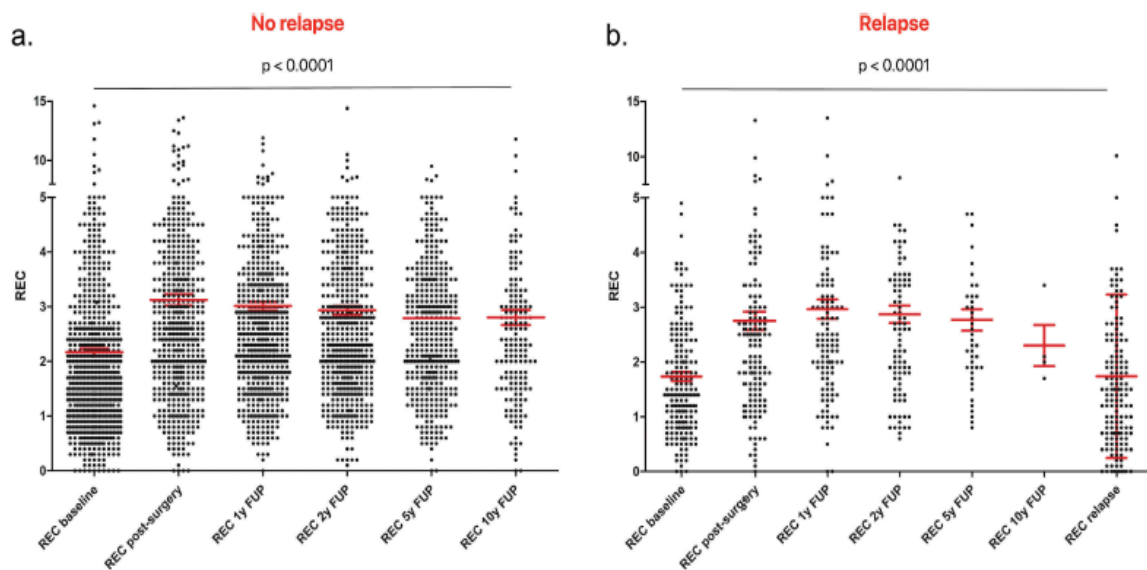


Figure 6: Scatter dot plot du REC au différent point de suivi. En a. le groupe des patients n'ayant pas expérimenté de récurrence ; En b. le groupe des patients ayant eu des récurrences⁷⁴.

Ces résultats suggèrent que le REC pourrait être un nouveau biomarqueur pronostique pour la survie dans tous les sous-types de cancer du sein et prédictif de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante chez les patients TNBC et ER-/HER2+. De plus, ces études font penser à une implication de la tumeur dans la modulation du nombre d'éosinophiles périphériques, qui pourrait être liée à l'infiltration tumorale par les éosinophiles ou à une modification de la différenciation des cellules immunitaires induite par la tumeur.

Objectif

L'élimination des cellules cancéreuses par les lymphocytes T CD8+ est le principe fondamental de l'immunologie cancéreuse. Cependant, les cellules T CD8+ peuvent voir leurs activités affectées par différents mécanismes. Ces mécanismes immunosuppresseurs sont des cibles thérapeutiques potentielles^{46,49}. De nombreux types de cellules immunitaires ont la capacité d'infiltrer la tumeur, mais nous nous focaliserons sur les éosinophiles dans ce travail. En effet, les études rétrospectives précédentes réalisées au sein de notre laboratoire à l'Université de Liège, ainsi que d'autres études, ont démontré que le nombre d'éosinophiles circulants pouvait être considéré comme des facteurs pronostiques dans le cancer du sein^{51,65,73-78}. De plus, ils apparaissent comme les nouveaux biomarqueurs et/ou cibles pour l'immunothérapie dans d'autres types de cancer tels que le mélanome, les cancers du rein ou du poumon⁷⁹.

Les éosinophiles semblent jouer un rôle opposé dans le cancer, D'une part, les éosinophiles joueraient un rôle antitumoral directement par l'action de leurs granules cytotoxiques ou indirectement en modulant l'activité d'autres cellules immunitaires par la sécrétion des cytokines et chimiokines ; d'autre part, les éosinophiles joueraient un rôle pro-tumoral en favorisant l'angiogenèse ou la polarisation des macrophages en phénotype M2 par exemple. Ce double rôle pourrait être la conséquence de l'existence de différentes sous-populations des éosinophiles comme cela a déjà été vu pour d'autres cellules telles que les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles⁷⁹⁻⁸².

Les tissus mammaires des patients cancéreux présentent dans 88% des cas un dépôt de peroxydases d'éosinophiles détectables à l'intérieur et autour de la tumeur ; ce dépôt ne se retrouve pas chez les patients sains⁸³. Dans notre laboratoire, des immunohistochimies ont été réalisées pour 70 tissus tumoraux des patients pour lesquels le REC était disponible ; en utilisant comme anticorps primaire un *anti-MBP* (*major basic protein* spécifique des granules des éosinophiles) 1.2% des cellules stromales étaient des éosinophiles. Ces éosinophiles infiltraient les tumeurs ; étonnamment, le nombre d'éosinophiles infiltrants les tumeurs étaient inversement corrélés au REC. L'équipe du Prof. Jerusalem a également constaté qu'il existait une relation inverse entre l'infiltration tumorale par les éosinophiles et la survie sans récurrence.

Pour élucider si les modulations du nombre d'éosinophiles circulants observées au cours de la maladie sont une conséquence des perturbations induites par la tumeur, ou si les éosinophiles participent activement au développement du cancer du sein et de ses métastases, l'équipe a réalisé une expérience en modèle murin, avant mon arrivée au laboratoire. Des cellules 4T1-LUC ont été implantées dans la glande mammaire de 2 groupes de 12 souris BALB/c. L'injection des cellules 4T1 dans le coussin mammaire induit un cancer du sein mimant le cancer du sein TNBC. Tout au long du développement tumoral, le premier groupe a reçu des injections d'anticorps dirigés contre la cytokine IL-5 (anti-IL-5) pour diminuer le nombre d'éosinophiles circulants, **groupe EOS-**, et le second groupe a reçu des injections d'anticorps isotype contrôle (IgG1) et conserve un nombre d'éosinophiles circulants normal, **groupe EOSnorm**. Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes (EOS- versus EOSnorm) en termes de développement de la tumeur primaire. En revanche l'invasion métastatique au niveau pulmonaire était plus importante dans le groupe où le nombre d'éosinophiles était diminué, groupe EOS- (anti-IL-5).

Durant ce travail de fin de cycle, nous allons tenter de confirmer la relation inverse entre le REC et l'infiltration tumorale des éosinophiles mais aussi étudier la relation entre les éosinophiles et les autres cellules immunitaires dans le cancer du sein.

Pour ce faire, nous allons analyser les tissus tumoraux provenant de l'expérience précédente réalisée au sein du laboratoire sur le modèle murin du cancer de sein afin (*Figure 7*) :

- De comparer l'infiltration tumorale et stromale d'éosinophiles entre les deux groupes principaux EOSnorm (n=12) versus EOS- (n=12) ainsi qu'entre les sous-groupes métastase+ (les souris ayant eu des métastase, n=7) versus métastases- (les souris n'ayant pas eu des métastase, n=17) par immunohistochimie ;
- D'étudier l'impact de la réduction des éosinophiles circulants sur l'infiltration stromale et tumorale d'autres cellules (les lymphocytes T CD8+, les neutrophiles et les lymphocytes Treg) et modulateurs immunitaires tels que PD-1 et PD-L1 par immunohistochimie entre les différents groupes ;
- D'évaluer l'efficacité du RNA-seq comme méthode de choix pour étudier l'infiltration tumorale des cellules immunitaire et de confirmer les résultats de l'IHC et de RNA-seq.

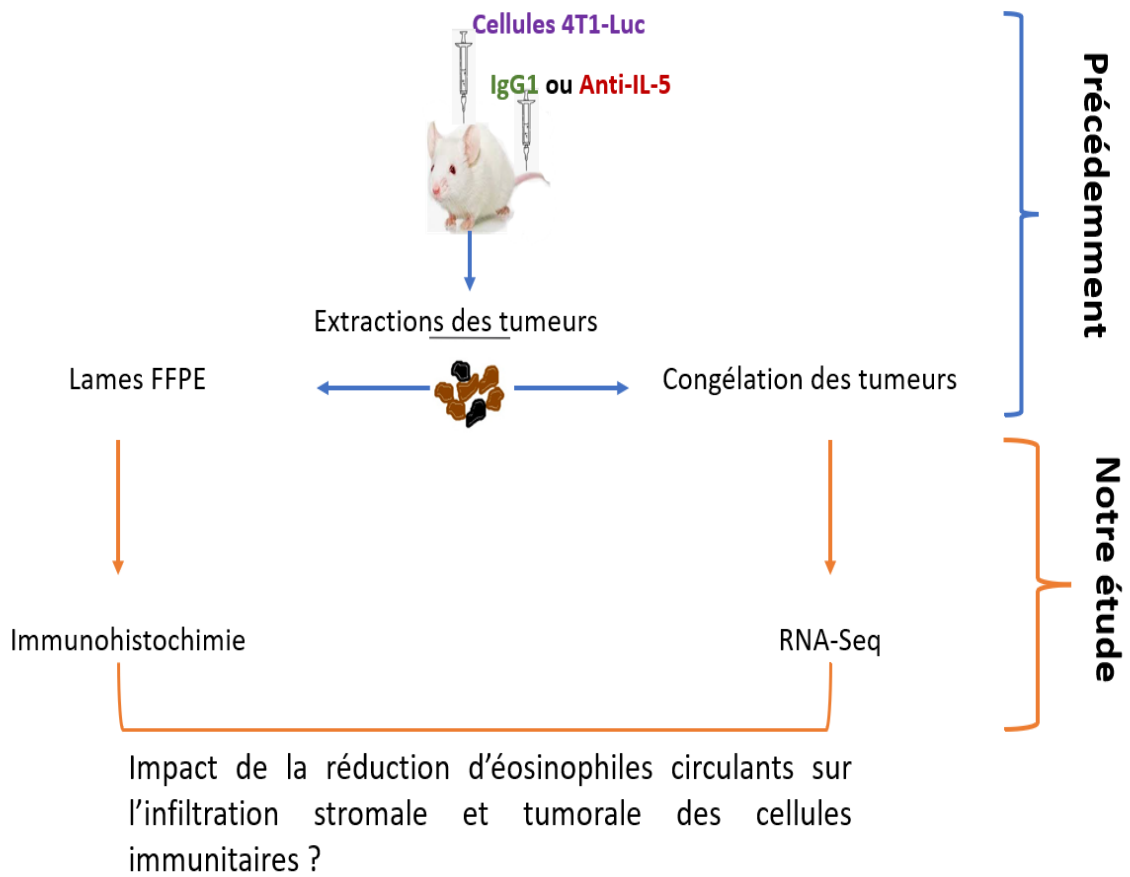


Figure 7: Objectifs et stratégie du travail de fin de cycle. Les tumeurs obtenues précédemment ont été divisées pour réaliser : 1) des lames FFPE et 2) du tissu congelé. Ces tumeurs fixés ou congelés sont utilisés durant notre étude pour les immunohistochimies et le RNA-seq respectivement afin d'atteindre nos objectifs.

Matériels et méthodes

Immunohistochimie

Préparation des échantillons.

Lors d'un projet précédant évaluant l'impact de la modulation du taux d'éosinophiles sur le développement de la tumeur primaire et l'invasion métastatique, 24 souris femelles BALB/c de 5 semaines avec une transplantation orthotopique de cellules mammaires cancéreuses 4T1⁸⁴ exprimant la luciférase (4T1-Luc) ont été nécessaires pour former deux groupes. Dans un premier groupe, groupe EOS- : 12 souris ont subi un traitement à base d'anticorps anti IL-5 (InVivoMAb anti-mouse/human IL-5, BioXCell, Lebandon, NH USA) afin de baisser le taux d'éosinophiles circulants ; dans le second groupe, EOSnorm : 12 autres souris ont subi un traitement contrôle à l'isotype IgG1 (InVivoMAb rat IgG1 Isotype control, BioXCell). La transplantation orthotopique des cellules 4T1-Luc est effectuée sur les souris après modulation du taux d'éosinophiles c'est-à-dire que l'implantation des cellules cancéreuses s'est faite sur des souris ayant au préalable reçu l'anticorps anti-IL-5 ou IgG1.

Les tumeurs de ce précédant projet sont prélevées lors du sacrifice, c'est-à-dire 1 cm³ pour la tumeur primaire ou 2 cm³ pour la somme de la lésion primaire et des métastases ou lors de l'apparition d'ulcération tumorale sur ces souris, et vont servir d'échantillon à notre étude. Pour chacune de souris, 20 coupes FFPE⁴ sériées vont être réalisées et une partie du tissu restant est congelée. Ce protocole a été validé par le comité d'éthique sous la référence 19-2172. Les souris sont classées en 4 groupes : groupe EOSnorm n=12 (souris ayant reçus un traitement à l'isotype IgG1), groupe EOS- n=12 (souris ayant reçus l'Ac anti IL-5), groupe métastase- n=17 (souris n'ayant pas eu de métastases) et groupe métastase+ n=7 (souris ayant développés des métastases)

Principe générale de l'immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) est une technique permettant une réaction immunologique sur une coupe histologique dans le but de mettre en évidence l'expression d'un antigène sur un tissu fixé sur une lame.

Le processus de l'IHC se compose des étapes suivantes (*Figure 8*) :

1. **Déparaffinage** : Les lames vont subir différents bains de déparaffinage au xylène ensuite à l'alcool : éthanol et méthanol. Du peroxyde d'oxygène 4,5% est ajouté au méthanol afin d'éliminer les peroxydases endogènes du tissu.
2. **Démasquage des sites antigéniques** : Les lames sont alors réhydratées puis incubées dans la solution Target Retrieval solution 10× (référence : S1699, Dako, Santa Clara, CA USA) dilué dix fois afin de démasquer les sites antigéniques.

⁴ Fixation au paraformaldéhyde et l'intégration dans la paraffine

3. **Blocage des protéines** : Nous avons déposé deux trois gouttes de la solution Protein Block Serum Free (Dako référence : X0909) sur les lames, et nous les avons incubées dans une chambre humide afin de masquer les sites antigéniques des protéines qui peuvent interagir avec les différents anticorps utilisés.
4. **Réaction immunologique** : Les lames seront ensuite incubées dans la chambre humide après ajout de 150 µl de la solution diluée du premier anticorps (AC) spécifique de l'antigène d'intérêt. Cette solution diluée de l'anticorps est préparée en diluant l'anticorps concentré dans le Antibody Diluent (**Table 1**). Après lavage au PBS, les lames sont incubées en présence d'un second anticorps couplé à une enzyme : la solution EnVSION+ System- HRP labelled Polymer anti-Rabbit (Dako référence : K4003).
5. **Révélation** : La révélation du marquage se fait par réaction enzymatique catalysée par l'enzyme du second anticorps en présence de son substrat suivi d'une coloration de la lame à l'hématoxyline. Le substrat de l'enzyme HRP est le DAB. Nous avons préparé une solution de travail DAB : 1 goutte de la solution Liquid DAB+ Substrate Chromogène system (Dako réf : K3468) pour 1 ml de diluant.

Nos lames seront scannées et quantifiées grâce au logiciel QuPath⁵ afin d'établir le profil de nos différentes cibles dans le stroma et la tumeur.

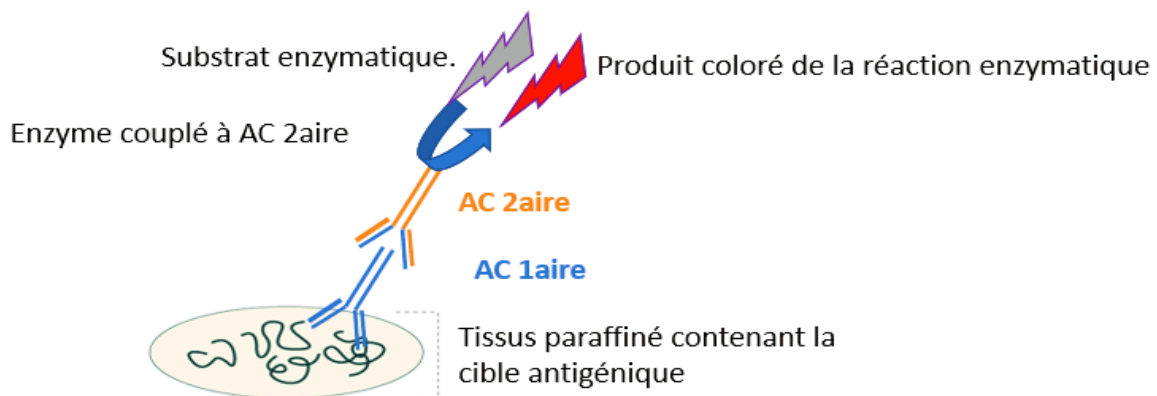


Figure 8: Principe de l'immunohistochimie un anticorps primaire dirigé contre une cible antigénique (Ag) du tissu puis un second anticorps (Ac 2aire) dirigé contre le premier et couplé à une enzyme catalysant une réaction émettant une longueur d'onde.

Afin de valider notre expérience et déterminer la dilution adéquate pour chaque anticorps, nous avons utilisé des témoins négatifs et positifs pour chaque anticorps. Nos témoins suivront le même mode opératoire que les lames mis à part la composition des réactifs pour l'incubation avec le premier anticorps. Nous modifierons comme suit le protocole :

- Témoins négatifs : tumeurs de la même souris + 150 µl Antibody Diluent
- Témoins positifs : amygdales humaines + 150 µl Antibody de la solution de travail de l'anticorps primaire.

⁵ QuPath est une plate-forme logicielle ouverte, puissante, flexible et extensible pour l'analyse de bioimages. (<https://qupath.github.io/>)

Table 1 : Les solutions de travail des anticorps primaires utilisés lors d'expérience d'immunohistochimie. Les solutions de travail sont obtenues en diluant l'anticorps primaires dans la solution Antibody Diluent (Dako référence : S2022).

Cible	Firme	Ref	Espèce cible	Dilution
ECP (=gene RNase3)	ThermoFisher	PA5-79927	Ras, souris et humain	1/200
PCNA	Cell Signaling	13110	Souris et Humain	1/10000
PDL1 (D5V3B)	Cell Signaling	64988S	Souris	1/100
PD-L1 (E1L3N)	Cell Signal	13684S	Humain	1/100
CD8 [Cal38]	Abcam	ab237723	Souris	1/150 ou 1/200
Foxp-3	Abcam	ab215206	Ras, souris et humain	1/150
Granzyme B (D6E9W)	Cell Signaling	46890S	Souris et Humain	1/200
Neutrophile Elastase (elane, E8U3X)	Cell Signaling	90120S	Souris	1/200

RNA-sequencing

Préparation des échantillons

Les échantillons utilisés pour notre projet proviennent du précédent projet sous la référence éthique 19-2172 réalisé au sein de notre laboratoire. Nous réaliserons le RNA-seq sur six échantillons : trois du groupes EOSnorm et trois du groupe EOS-. Lors du précédent projet, les tumeurs de souris ont été prélevé lors du sacrifice conformément au protocole éthique puis congelé.

Les tumeurs ont été plongées dans de l'azote liquide afin de les conserver et d'éviter que les tissus ne décongèlent. Nous avons procédé aux prélèvements de plusieurs morceaux à plusieurs endroits de la biopsie, puis rassembler le tout pour réaliser l'extraction de l'ARN total.

Principe général du RNA-seq

Le RNA-seq est une technique de biologie moléculaire reposant sur l'extraction et le séquençage des différents ARN d'un tissu afin d'évaluer le niveau d'expression de différents gènes d'intérêt (Figure 9).

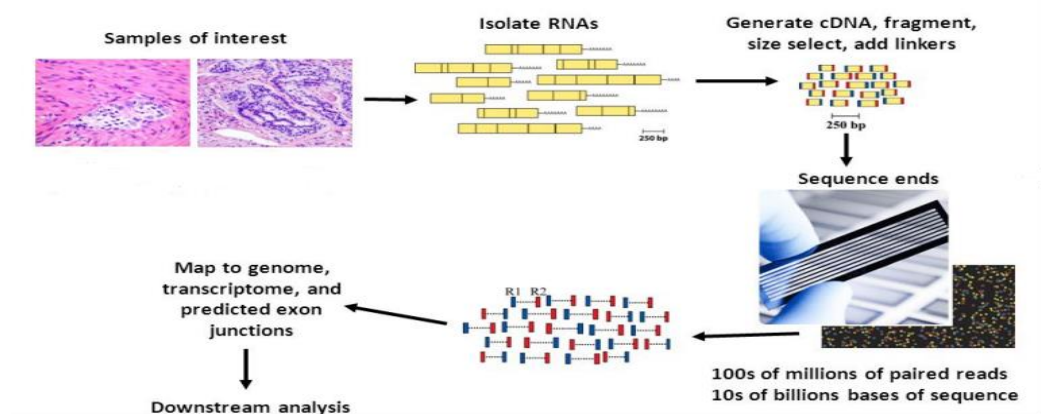


Figure 9 : RNAseq principe générale : la librairie est préparée à partir de l'ARN transformé en ADNc puis séquencer et aligné sur un génome de référence⁸⁵.

Préparation de la librairie :

Nous avons extrait l'ARN des tissus tumoraux avec le kit RNeasy de Qiagen (Hilden, Allemagne). Ce kit utilise le β -Mercaptoethanol (β -ME), un agent réducteur qui permet de dénaturer de manière irréversible les RNases endogènes. La concentration des ARN extraits des tissus tumoraux a été mesuré au Nanodrop. Le Nanodrop est un spectrophotomètre à double faisceau qui mesure et compare les absorbances à différentes longueurs d'ondes afin de tester la pureté des acides nucléique.

L'ARN total est isolé puis fragmenté après déplétion de l'ARN ribosomal en suivant le protocole NEBNext rRNA Depletion Kit v2 (Human/Mouse/Rat) (NEB #E7400, #E7405). Ce protocole permet la déplétion de l'ARN ribosomal par capture de ce dernier grâce à des probes suivis d'une digestion de l'ARN spécifique des probes ; il permet aussi la digestion des ADNs résiduels ainsi que la fragmentation de l'ARN dépendant du RIN (*RNA Integrity Number*). Le RIN est obtenu après électrophorèse en faisant le ratio entre les ARN ribosomiques 28S et 18S qui sont les principaux ARN ribosomiques constituant la grande sous-unité 60S et la petite sous-unité 40S des ribosomes d'eucaryotes, c.a.d. le ratio d'intégrité de l'échantillon. Plus le RIN est élevé et supérieur à 7, plus l'échantillon est de bonne qualité. Le RIN est nécessaire pour déterminer la durée de fragmentation pendant le protocole de la librairie : une fragmentation de 15 min à 94° C quand le RIN > 7 contre 7-8min à 94° C lorsque le RIN est compris entre 2-6. La qualité de l'ARN extrait est analysée par le Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico Chip afin de déterminer le RIN.

Nous avons réalisé notre librairie avec le protocole NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB #E7760, #E7765). Le kit NEBNext permet l'ajout adaptateurs aux échantillons lors de la synthèse du premier brin. Durant la réaction de synthèse du premier brin, ce kit dégrade le second brin synthétisé par l'enzyme Uracile DNA glycosylase qui reconnaît le brin a dégradé : ce brin contient de l'UTP incorporé durant la synthèse. Afin d'enrichir la librairie, une PCR est effectuée et elle permet d'ajouter des index différents aux échantillons qui leur serviront d'étiquettes. La qualité du produit PCR est vérifiée pour être sûre de la taille des fragments et leur concentration dans notre librairie avant de lancer le séquençage.

Séquençage :

Notre librairie a ensuite été envoyée à la plateforme du Giga Science de l'Université de Liège pour le séquençage. Au niveau de la plateforme, le principe du séquençage utilisé est celui de l'Illumina NovaSEQ 6000 sequencer. Sur un support, le *flow cell* est fixé un fragment, primers complémentaires à chaque adaptateur.

Les fragments de notre librairie vont se fixer sur le *flow cell* grâce à la complémentarité entre les adaptateurs ajoutés aux extrémités des fragments et les primers du *flow cell* (Figure 10 A). Une polymérase va permettre la synthèse du fragment complémentaire du fragment fixé sur le *flow cell*. Après dénaturation et lavage, le fragment original est retiré et le fragment complémentaire nouvellement synthétisé va former des ponts par la liaison du deuxième adaptateur au primer sur le *flow cell* puis va être amplifié par PCR (Figure 10 B).

Ensuite, après une seconde dénaturation et un second lavage, les brins reverses sont clivés et retirés, puis le séquençage se fait par ajout de nucléotides un à un sur base de la séquence mère. L'ajout d'un nucléotide permet l'émission d'un signal fluorescent spécifique du nucléotide (Figure 10 C). Ce processus est appelé séquençage par synthèse. Le nombre de cycle détermine la longueur du read (données séquencées) et la longueur d'onde d'émission et l'intensité d'émission détermine le bruit de fond. Lors de notre séquençage, La taille des reads était de 150x150 bp.

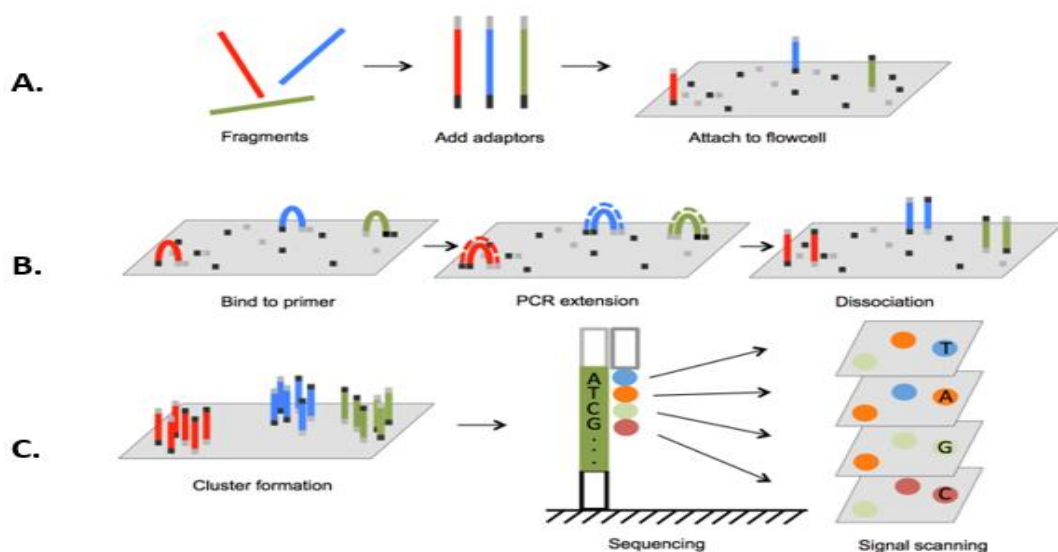


Figure 10: NGS Illumina workflow : A. les fragments de notre librairie sont déposés sur le flow cell ; B. génération des clusters par synthèse d'un brin complémentaire au fixé C. le séquençage des clusters par synthèse de novo.

Analyse des données

L'alignement sur le génome de référence.

Nous évaluerons la qualité du produit du séquençage par le logiciel MultiQC.

L'analyse des données du séquençage obtenu de la plateforme du GIGA science sera effectuée par le programme CLC Genomics Workbench (RRID :SCR_011853). CLC Genomics Workbench est un progiciel qui permet l'analyse, l'alignement sur un génome de référence et la normalisation des données de séquençage. Ce progiciel bio-informatique prend en charge les données de séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing, NGS), notamment Oxford Nanopore, PacBio, IonTorrent, BGI/MGI, Illumina et Sanger⁸⁶.

Le programme CLC Genomics Workbench utilise un algorithme d'estimation EM permettant d'obtenir une matrice du taux d'expression des gènes. Cette matrice du taux d'expression génique est normalisée par le progiciel selon la normalisation TMM (*Trimmed Mean of M value*). Enfin CLC Genomics permet de comparer l'expression différentielle entre les groupes en utilisant l'outil Differential Expression for RNA-seq. Cet outil effectue une analyse statistique multifactorielle basée sur un modèle linéaire généralisé (GLM) binomial négatif (équivalent de DESeq2). L'option de filtrage de l'outil permet d'éviter de faire la comparaison statistique pour des gènes non exprimés dans les 2 groupes comparés et perdre de la puissance statistique lors de la correction de la p-value pour les comparaisons multiples. Lors de comparaisons multiples testant plusieurs hypothèses comme c'est le cas avec la comparaison différentielle d'expression des gènes, il existe une probabilité accrue de faux positifs. La false discovery rate (FDR) permet d'ajuster la valeur de la P-value et est le rapport entre le nombre de faux positifs et le nombre total de résultats de test positifs de la comparaison multiple.

Evaluation de l'infiltration tumorale : CIBERSORT

CIBERSORT est un outil computationnel utilisant un algorithme qui nous permettra d'estimer l'abondance des types de cellules membres dans une population de cellules mixtes. Cet algorithme permet l'évaluation du profil d'infiltration tumorale par 22 types cellulaires différents à l'aide de données d'expression génique obtenu après séquençage en utilisant une séparation mathématique des profils d'expression génique au sein de la tumeur.

Une connaissance spécialisée de la signature d'expression génique appelée matrice de signature est nécessaire à CIBERSORT pour la déconvolution des différentes cellules d'intérêt. La déconvolution de 22 sous-ensembles hématopoïétiques sera faite grâce à une matrice de signature de gène leucocytaire obtenue par microarray (LM22)⁸⁷.

La régression vectorielle de support (SVR) est la particularité de CIBERSORT qui lui permet une approche d'apprentissage automatique et qui améliore sa performance de déconvolution.

En général, deux fichiers sont introduits dans CIBERSORT : le premier contenant la mixture d'expression génique (GEP) et l'autre la matrice de signature. La première colonne de du fichier de la matrice de signature comprend des « codes-barres d'expression de gène » dont les valeurs d'expression définissent collectivement des signatures d'expression génique unique pour chaque sous-ensemble de cellules ; les autres colonnes contiennent la signature GEP de sous-ensembles de cellules.

Analyse statistique

Nous réaliserons notre analyse statistique à l'aide du logiciel Prism GraphPad v8 afin de nous permettre de mieux discuter nos résultats. Pour ce faire, nous évaluerons la distribution des cellules immunitaires et modulateurs immunitaires dans le stroma et la tumeur dans les différents groupes.

Pour les données d'immunohistochimie, la quantification en pourcentage des cellules marquées par les différents anticorps primaires dans le stroma, la tumeur et sur la lame entière seront introduites dans Prism GraphPad v8 afin de réaliser la comparaison statistique par le test non paramétrique de Mann–Whitney U test. Nous réaliserons les comparaisons suivantes :

- Groupe EOS-, anti-IL-5 (n=12) VS groupe EOSnorm, IgG1 (n=12) ;
- Groupe des souris avec métastases, métastases+ (n=7) VS groupe des souris sans métastase, métastases- (n=17).

Après normalisation par CLC Genomic, les données du RNA-seq vont être utilisées pour évaluer l'expression différentielle entre les quatre groupes et calculer l'infiltration tumorale par analyse déconvolutive de CIBERSORT. Les données seront analysées par le test non paramétrique de Mann–Whitney U test avec le logiciel Prism GraphPad v8.

Résultats

Immunohistochimie

Les différentes études *in vivo* et les études rétrospectives ayant exploré le rôle des éosinophiles dans le cancer du sein, y compris celles réalisées au sein de notre laboratoire, ainsi que l'impact du nombre d'éosinophiles comme facteur prédictif et de pronostique, ont conduit à la mise en place de notre expérience.

Les échantillons de notre expérience proviennent d'une précédente expérience réalisée au sein de notre laboratoire. Cette expérience avait pour objectif principal d'étudier l'impact de la modulation du nombre d'éosinophiles circulants sur le développement de la tumeur primaire dans un modèle murin de cancer de sein tel que décrit dans nos **Objectifs**.

A la fin du protocole, lorsque les souris ont atteint le seuil éthique limite pour le développement tumoral (1 cm³ pour la tumeur primaire ou 2 cm³ pour la somme de la lésion primaire et des métastases ou lors de l'apparition d'ulcération tumorale sur ces souris-protocole 19-2172), les animaux sont sacrifiés et les tumeurs mammaires primaires sont fixées dans du formol 10% et emparaffinées (FFPE). Pour chacune des tumeurs primaires, 20 coupes du tissu de 4 µM, sériées, ont été demandées à la plateforme immuno-histologie du GIGA. Ces coupes seront utilisées pour réaliser des IHC.

Notre expérience explore l'impact de la réduction du nombre d'éosinophiles circulant sur l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires et sur l'expression des modulateurs immunitaires. Les anticorps primaires vont cibler : le PCNA (marqueur tumoral), la RNase III spécifique des granules des éosinophiles, le CD8 pour identifier les lymphocyte T CD8+, l'élastase (gène *Elane*) spécifique des granules des neutrophiles, le granzyme B spécifique des T CD8+ actifs, le *FOXP-3* spécifique des lymphocytes Treg et les immunomodulateurs PD-1 et PDL-1. Les différentes concentrations des anticorps primaires sont repris dans la **Table 1**. Après révélation de l'anticorps primaire au DAB, nos lames ont été contre-colorées à l'hématoxyline avant d'être ensuite scannées puis analysées par le logiciel QuPath. Ce dernier va nous permettre de faire la quantification des marquages en fonction du signal DAB par nombre de cellules marquées à l'hématoxyline.

Dans un premier temps, nous avons choisis de cibler le *PCNA* (*Proliferating cell nuclear antigen*), un marqueur tumoral qui va nous permettre de localiser précisément la zone tumorale sur chaque lame (Figure 11.A). Le *PCNA* est une protéine nucléaire impliquée dans le métabolisme des acides nucléiques, un composant de la machinerie de réparation et répllication cellulaire.

Nous avons tout d'abord défini la zone tumorale grâce au marquage par l'anticorps anti-PCNA (*Figure 11*). Ce marquage sert à définir les surfaces de comptages de cellules marquées ou non par le logiciel QuPath.

La quantification des marquages a été faite en pourcentage de cellules positives dans la tumeur, hors de la tumeur et sur la lame entière. Les cellules marquées par l'anticorps primaire sont en rouge lorsqu'elles se trouvent dans la zone tumorale et en vert foncé lorsqu'elles sont en dehors de la tumeur, alors que les cellules non marquées de la zone tumorale sont en bleu et celles en dehors en vert clair (*Figure 11 C*).

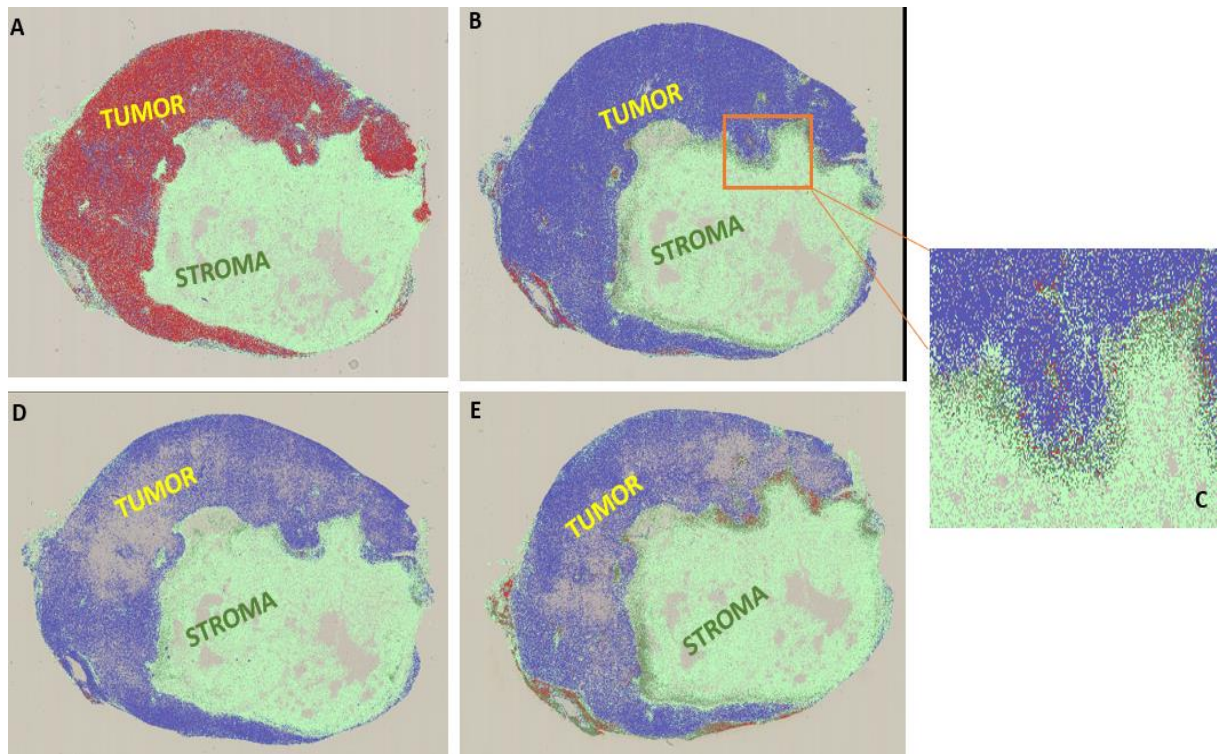


Figure 11: Illustration d'une coupe de tumeur représentative des IHC obtenues. **A.** Anticorps primaire cible le PCNA utilisé pour définir la zone tumorale pour les quantifications ; **B.** Anticorps primaire cible la RNase III des granules des éosinophiles ; **C.** Zoom dans une zone de la lame afin de mettre en évidence la frontière tumeur et les différentes cellules positives/négatives ; **D.** Anticorps primaire cible le CD8 ; en **E.** Anticorps primaire cible l'élastase des granules des neutrophiles. Les cellules en **rouge** sont les cellules tumorales marquées par l'anticorps ; Les cellules en **bleue** sont les cellules tumorales non marquées par l'anticorps primaire ; Les cellules en **vert clair** sont les cellules en dehors de la zone tumorale non marquées par l'anticorps primaire et les cellules en **vert foncé** sont les cellules en dehors de la zone tumorale marquées par l'anticorps.

Validation de la quantification par le logiciel QuPath

Nous avons tout d'abord réalisé des IHC dirigées contre la RNase III sur des lames de chacune des tumeurs des 24 souris décrites dans l'expérience.

Une quantification manuelle des lames a été réalisée en attribuant une valeur comprise entre 1 (faibles présences des éosinophiles) et 5 (présence abondante des éosinophiles sur la lame) (**Annexes A.1**). Cette quantification manuelle a ensuite été comparée à celle réalisée par QuPath sur la lame entière. Nous avons obtenu une corrélation de Spearman de $r = 0,8004$ et $P\text{-value} < 0,0001$, ce qui nous permet de valider notre quantification par QuPath.

De la même manière, nous avons ensuite réalisé les IHC sur toutes les tumeurs des 24 souris avec les anticorps dirigés contre les protéines CD8, l'élastase, le granzyme B, FOXP-3, PD-1 et PDL-1. La quantification a été réalisée par QuPath dans les surfaces décrites plus haut.

Nous avons ensuite compilé toutes les valeurs des cellules positives dans la tumeur, à l'extérieur de la tumeur et sur la totalité de la lame. Nous avons pu observer que la majorité des cellules immunitaires se trouvent localisées dans la zone centrale des lames, que nous dénommons stroma, tel qu'indiqué dans la Figure 11.

Préalablement à l'analyse statistique, nous avons vérifié la distribution de notre jeu de données. Les résultats montrent une distribution non gaussienne ([Table Annexe A.1](#)) et le QQ plot montre que les points se distribuent en S autour de la diagonale rouge ([Figure 12](#)). Par conséquent, le test de comparaison adéquat pour notre jeu de donnée sera un test non paramétrique : le Mann-Whitney U test sur les données de quantification en pourcentage de cellules positives obtenue après analyse par le logiciel QuPath ([Annexes A.1](#)).

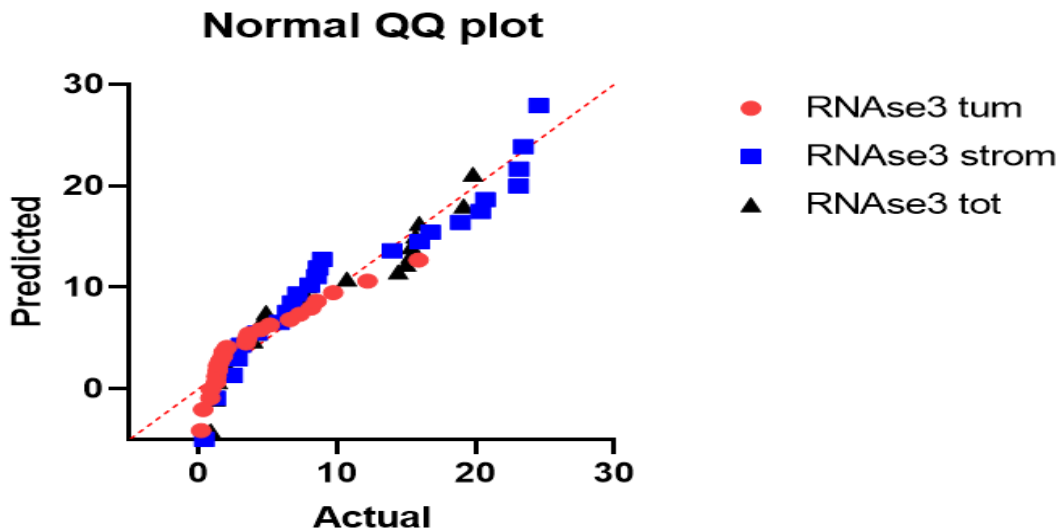


Figure 12: Vérification de la normalité QQ plot. Les données utilisées ne tiennent pas compte des différents groupes. Nous quantifions dans : Tum : quantification dans la tumeur – Strom : quantification dans le stroma – tot : quantification sur la lame totale, pour toutes les souris.

Quantification des lames marquées à l'anticorps anti-RNase III

Nos résultats montrent une plus grande présence d'éosinophiles dans la zone tumorale, stromale et sur la lame entière lorsque les souris ont reçu l'anticorps anti-IL5 qui diminue le nombre d'éosinophiles circulants (groupe EOS-), en comparaison aux souris du groupe EOSnorm qui ont reçu l'isotype IgG1 ([Table 2](#) ; [Figure 13](#)). La différence est plus significative lorsque la quantification est faite dans la tumeur (P-val = 0,0205). Bien que le taux d'éosinophiles dans le groupe des souris n'ayant pas eu des métastases (métastase -, n=17) soit supérieur à celui du groupe des souris ayant développé des métastases (métastase +, n=7), le Mann-Whitney U test a cependant montré que cette différence était non significative (ns) entre les deux groupes ([Table 2](#) ; [Figure 13](#)).

Quantification des lames marquées à l'anticorps anti RNase III : comparaison par Mann-Whitney U test

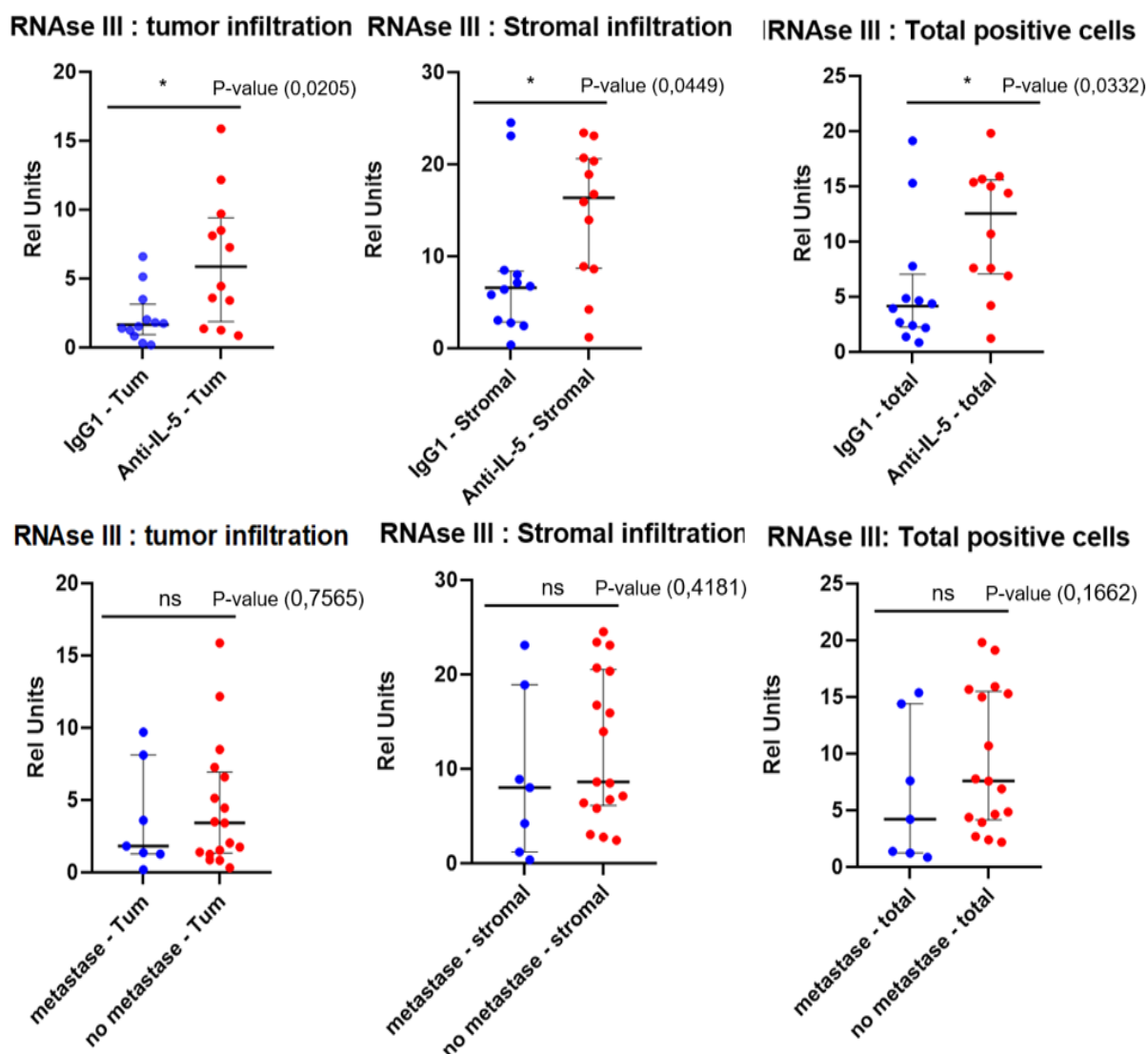


Figure 13: Graphique représentant la comparaison par Mann-Whitney U test de l'infiltration par les éosinophiles au niveau tumorale, stromal et sur la lame totale. Comparaison du groupe EOS- (Anti-IL-5, n=12) versus le groupe EOSnorm (IgG1, n=12) ; et comparaison entre le groupe métastase+ (metastase, n=7) et le groupe métastase-, (no métastase-, n=17).

Quantification des lames marquées à l'anticorps anti-CD8

De la même manière, nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact du nombre d'éosinophiles circulants sur l'infiltration stromale et tumorale par les lymphocytes T CD8. Nos résultats montrent une différence significative uniquement au niveau stromal entre le groupe EOSnorm et EOS- ($P\text{-value} = 0.0449 \leq 0.05$) : un nombre plus petit de lymphocytes T CD8 infiltrent le stroma lorsque les éosinophiles circulants sont diminués.

Bien qu'en général, un taux plus élevé de lymphocyte T CD8+ soit observé dans le groupe métastase-, la différence est statistiquement non significative (**Table 2**, *Figure 14*).

Quantification des lames marquées à l'anticorps anti CD8: comparaison par Mann-Whitney U test

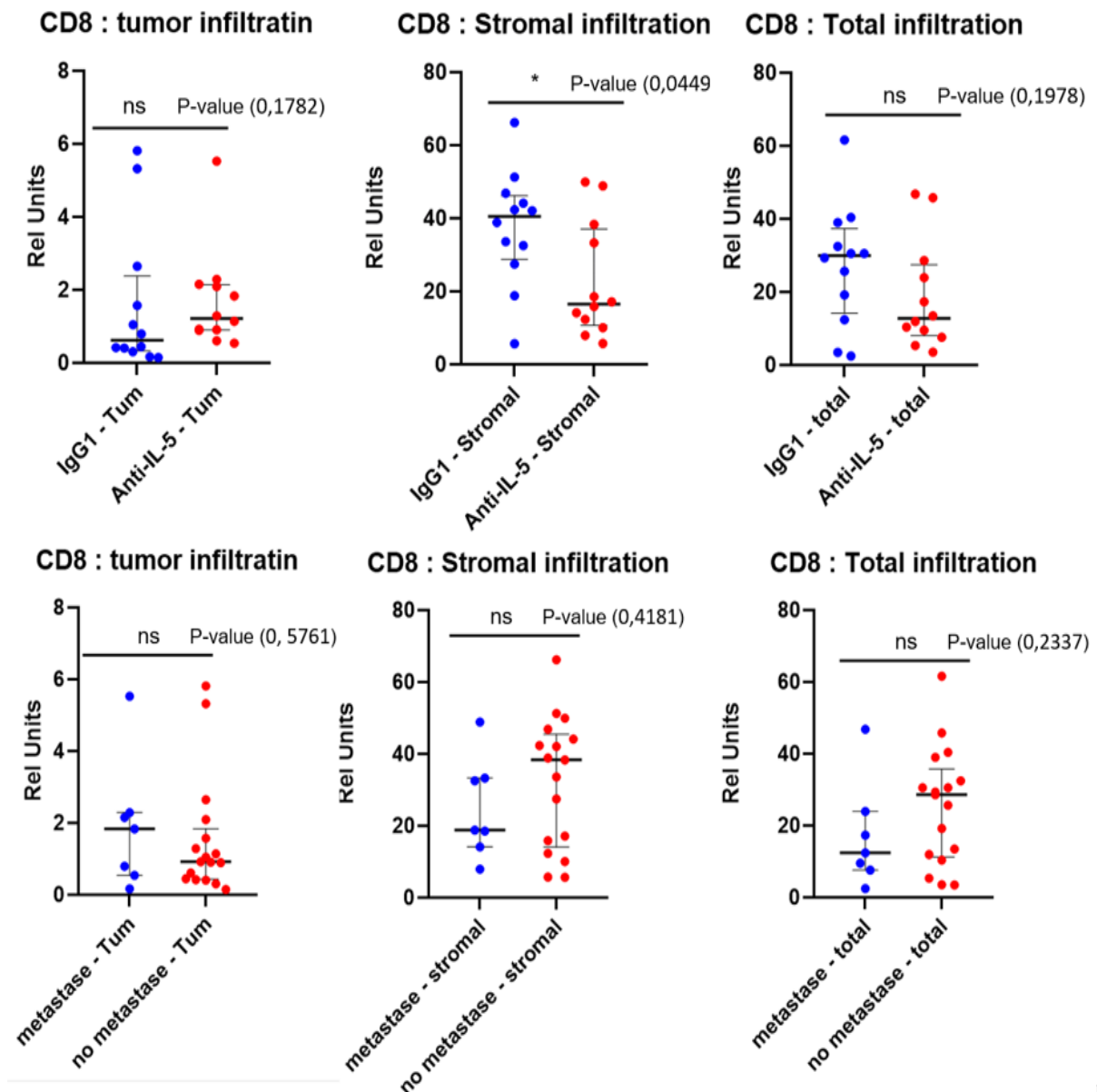


Figure 14: Graphique représentant la comparaison par Mann-Whitney U test de l'infiltration des lymphocytes T CD8 aux niveaux tumoral, stromal et sur la lame totale. Comparaison du groupe EOS- (Anti-IL-5, n=12) versus le groupe EOSnorm (IgG1, n=12); et comparaison entre le groupe métastase+ (metastase, n=7) et le groupe métastase-, (no métastase-, n=17).

Quantification des lames marquées à l'anticorps anti-Elastase

Nous avons exploré l'infiltration tumorale, stromale et sur la lame entière des neutrophiles en utilisant un anticorps anti-Elastase. Cet anticorps reconnaît les élastases contenues dans les granules des neutrophiles. Nos résultats ont montré que lorsque les éosinophiles sont réduits (groupe EOS-), il y'a moins de neutrophiles au niveau stromal (P-value = 0.0332). En revanche, nous avons trouvé qu'il y'a plus de neutrophiles au niveau stromal (P-val = 0,0131) et sur la lame entière (P-val = 0,0008) dans le groupe où il n'y'a pas de métastases, métastase- (Table 2, Figure 15).

Quantification des lames marquées à l'anticorps anti elane : comparaison par Mann-Whitney U test

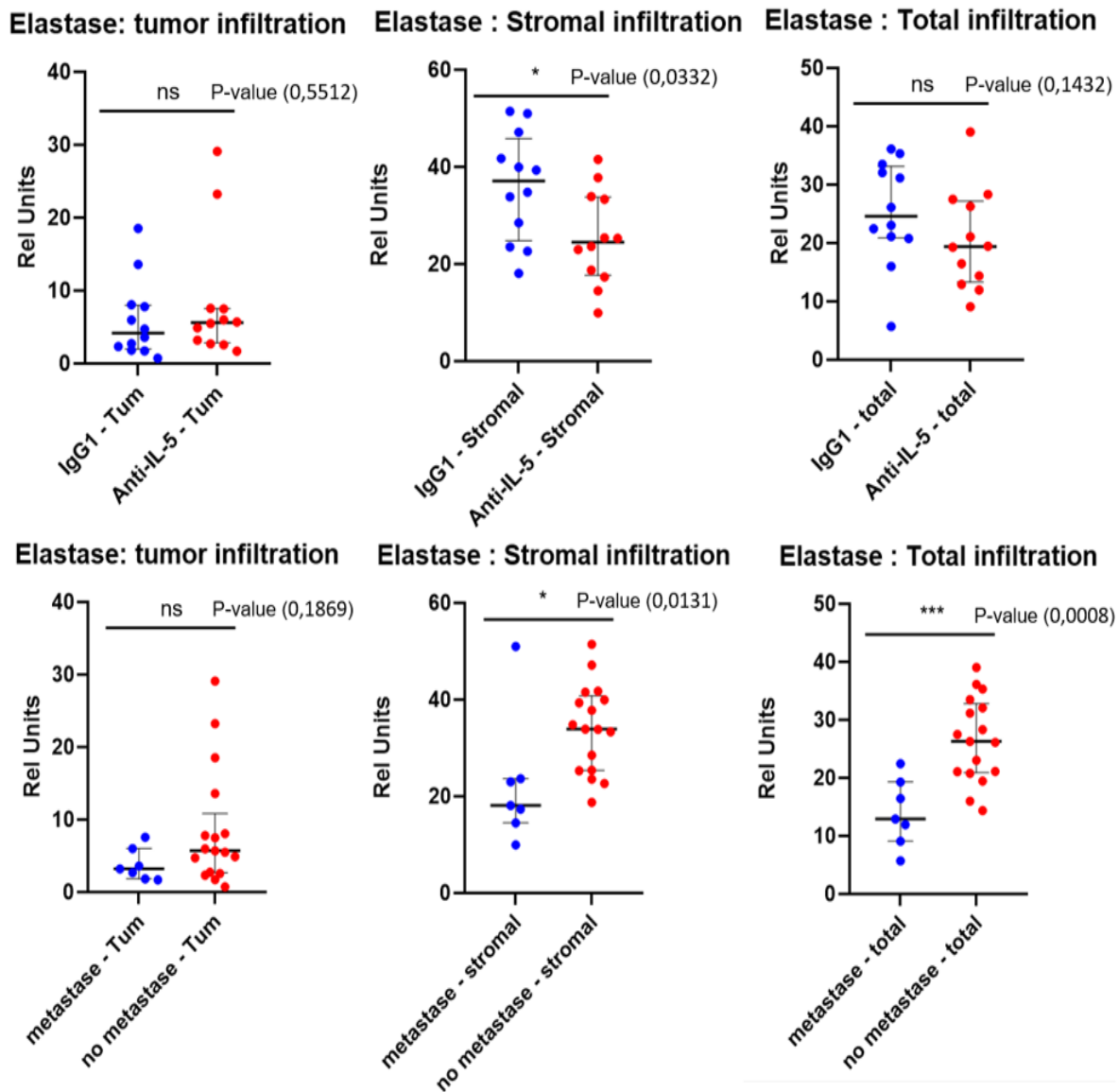


Figure 15: Graphique représentant la comparaison par Mann-Whitney U test de l'infiltration des lymphocyte T CD8 aux niveaux tumoral, stromal et sur la lame totale. Comparaison du groupe EOS- (Anti-IL-5, n=12) versus le groupe EOSnorm (IgG1, n=12); et Comparaison entre le groupe métastase+ (metastase, n=7) et le groupe métastase-, (no métastase-, n=17).

Quantification des lames marquées aux anticorps anti-Granzyme B, anti-FOXP-3, anti PD-1 et anti-PDL-1

Nous avons réalisé des témoins positifs et négatifs sur des lames d'amygdales afin de pouvoir valider la spécificité de nos anticorps ainsi que la dilution adéquate. Pour les quatre dernières cibles (FoxP-3, granzyme B, PD-1 et PDL-1), nous avons réalisé les IHC sur une partie de la cohorte ; 9 tumeurs par cibles dont 3 tumeurs du groupe métastases+. Cependant, l'exploration de ces cibles sur les lames de tumeurs murines ont montré une absence de marquage : un faible bruit de fond est détecté lors de l'analyse par QuPath (**Table 2**).

Résumé de la quantification IHC

Table 2 : Résumé de la comparaison par Mann–Whitney U test entre les groupes EOS- versus EOSnorm et entre les groupes métastase+ versus métastase-. Quantification dans la tumeur, le stroma et sur la lame entière pour les différents anticorps utilisés lors des IHC. Les chiffres repris dans cette table sont les médianes (en %) des quantifications de marquages testées par Mann–Whitney U test.

Ac anti-RNase III			
	Dans la tumeur	Dans le stroma (%)	Sur la lame entière (%)
EOS - (anti IL5) vs EOSnorm (anti IgG1)	5,87 n=12 > 1,652 n=12 P-val (0,0205) ≤ 0.05 (*)	16,35 n=12 > 6,593 n=12 P-val (0,0449) ≤ 0.05 (*)	12,55 n=12 > 4,164 n=12 P-val (0,0332) ≤ 0.05 (*)
Métastase - vs Métastase +	3,425 n=17 > 1,822 n=7 P-val (0,75665) > 0.05 (ns)	8,650 n=17 > 8,026 n=7 P-val (0,4181) > 0.05 (ns)	7,598 n=17 > 4,228 n=7 P-val (0,1662) > 0.05 (ns)
Ac anti-CD8			
	Dans la tumeur	Dans le stroma (%)	Sur la lame entière (%)
EOS - (anti IL5) vs EOSnorm (anti IgG1)	1,22 n=12 > 0,624 n=12 P-val (0,1782) > 0.05 (ns)	16,52 n=12 < 40,50 n=12 P-val (0,0449) ≤ 0.05 (*)	12,73 n=12 < 29,97 n=12 P-val (0,1978) > 0.05 (ns)
Métastase - vs Métastase +	0,923 n=17 < 1,834 n=7 P-val (0,576) > 0.05 (ns)	38,37 n=17 > 18,82 n=7. P-val (0,4181) > 0.05 (ns)	28,60, n=17 > 12,44, n=7 P-val (0,2337) > 0.05 (ns)
Ac anti-Elastase (elane)			
	Dans la tumeur	Dans le stroma (%)	Sur la lame entière (%)
EOS - (anti IL5) vs EOSnorm (anti IgG1)	5,62 n=12 > 4,175 n=12 P-val (0,551) > 0.05 (ns)	24,50 n=12 < 37,10 n=12 P-val (0,0332) ≤ 0.05 (*)	19,39 n=12 < 24,60 n=12 P-val (0,1432) > 0.05 (ns)
Métastase - vs Métastase +	5,716 n=17 > 3,21 n=7. P-val (0,187) > 0.05 (ns)	33,94 n=17 > 18,14 n=7. P-val (0,0131) ≤ 0.05 (*)	26,32 n=17 > 12,92 n=7 P-val (0,0008) ≤ 0.05 (***)
Ac anti-Granzyme B			
	Dans la tumeur	Dans le stroma (%)	Sur la lame entière (%)
EOS - (anti IL5) vs EOSnorm (anti IgG1)	0,5310 n=4 > 0,262 n=5 P-val (0,999) > 0.05 (ns)	0,7203 n=4 > 0,049 n=5 P-val (0,556) > 0.05 (ns)	0,6940 n=4 > 0,1545 n=5 P-val (0,7302) > 0.05 (ns)
Métastase - vs Métastase +	0,385 n=6 < 0,8318 n=3 P-val (0,381) > 0.05 (ns)	0,5166 n=6 < 0,6421 n=3 P-val (0,999) > 0.05 (ns)	0,4975 n=6 < 0,665 n=3 P-val (0,7143) > 0.05 (ns)

Ac anti-FoxP-3			
	Dans la tumeur	Dans le stroma (%)	Sur la lame entière (%)
EOS - (anti IL5) vs EOSnorm (anti IgG1)	0,315 n=4 > 0,1426 n=5 P-val (0,111) > 0.05 (ns)	0,312 n=4 < 0,3388 n=5 P-val (0,999) > 0.05 (ns)	0,3137 n=4 > 0,2211 n=5 P-val (0,999) > 0.05 (ns)
Métastase - vs Métastase +	0,224 n=6 > 0,0658 n=3 P-val (0,219) > 0.05 (ns)	0,3663 n=6 > 0,3388 n=3 P-val (0,7143) > 0.05 (ns)	0,3137 n=6 > 0,2211 n=3 P-val (0,7143) > 0.05 (ns)
Ac anti-PD-1			
	Dans la tumeur	Dans le stroma (%)	Sur la lame entière (%)
EOS - (anti IL5) vs EOSorm (anti IgG1)	0,0755 n=4 < 0,271 n=5 P-val (0,0317) < 0.05 (*)	0,5317 n=4 < 0,8532 n=5 P-val (0,9048) > 0.05 (ns)	0,5523 n=4 > 0,347 n=5 P-val (0,1905) > 0.05 (ns)
Métastase - vs Métastase +	0,1126 n=6 < 0,157 n=3 P-val (0,7143) > 0.05 (ns)	0,4924 n=6 < 0,8989 n=3 P-val (0,381) > 0.05 (ns)	0,5513 n=6 > 0,3649 n=3 P-val (0,7143) > 0.05 (ns)
Ac anti-PDL-1			
	Dans la tumeur	Dans le stroma (%)	Sur la lame entière (%)
EOS - (anti IL5) vs EOSnorm (anti IgG1)	0,5716 n=4 > 0,268 n=5 P-val (0,111) > 0.05 (ns)	0,4947 n=4 > 0,0924 n=5 P-val (0,1111) > 0.05 (ns)	0,4727 n=4 > 0,1846 n=5 P-val (0,1111) > 0.05 (ns)
Métastase - vs Métastase +	0,3679 n=6 < 0,572 n=3 P-val (0,9048) > 0.05 (ns)	0,3951 n=6 > 0,2926 n=3 P-val (0,7143) > 0.05 (ns)	0,3851 n=6 > 0,3232 n=3 P-val (0,9999) > 0.05 (ns)

RNA-sequencing

Quantification et Contrôle de la Qualité de l'ARN extrait

Les ARNs ont été extraits des tissus tumoraux, leur concentration a été mesurée au Nanodrop, et leur qualité a été mesurée sur l'appareil Agilent bioanalyzer RNA 6000. La **Table 3** reprend les données de quantification par NanoDrop.

Nous avons choisi d'inclure les tissus tumoraux de 6 souris pour l'analyse en RNA-seq. Trois appartiennent au groupe EOSnorm et trois au groupe EOS-. Nous allons comparer l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires et modulateurs immunitaires dans les groupes EOSnorm et EOS-.

Table 3 : Quantification de l'ARN par NanoDrop : les échantillons mis en évidence en orange appartiennent au groupe EOS-

Souris ID	concentration ng/ul	Ratio 260/280	Ratio 260/230	RIN
antil5_S03	636,94	1,83	2,24	7.70
antil5_S04	650,26	1,85	2,28	3.30
antil5_S08	292,39	1,85	2,33	N/A
IgG1_S16	342,47	1,85	2,32	8.60
IgG1_S19	260,66	1,96	0,54	3.90
IgG1_S22	661,8	2,09	1,8	6.40

Nous avons ensuite procédé à la détermination du RIN (*RNA Integrity Number*) par l'automate Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano/Pico Chip. La qualité des ARNs est variable, et le protocole de préparation de librairie sera adapté pour chaque échantillon.

L'ARN total est isolé à partir des tumeurs et déplété des ARNs ribosomiaux par capture. Après déplétion des ARN ribosomiaux, nous avons préparé des librairies avec le kit NEBNext Ultra II Directional RNA comme expliqué dans le [Matériels et méthodes au point : préparation de la librairie](#).

Nous avons, après préparation de la librairie pour le RNA-seq, vérifié la distribution des fragments par Bioanalyzer. La [Figure 16](#) représente les profils des librairies des 6 échantillons. Nous avons constaté que les concentrations des librairies obtenues étaient plus faibles que dans le cas de la librairie idéale, sauf concernant les échantillons IgG1_S19 et IgG1_S22. Cependant, la distribution des fragments entre 150 et 1000 bp avec un pic aux alentours de 400bp est similaire à la distribution proposée illustrée par le fournisseur ([Figure 16](#)). Nous avons donc procédé au séquençage.

Le séquençage des échantillons a été réalisé par la plateforme du GIGA science de l'Université de Liège avec l'Illumina NovaSEQ 6000 séquenceur dont le principe de fonctionnement est repris dans les [Matériels et Méthodes](#).

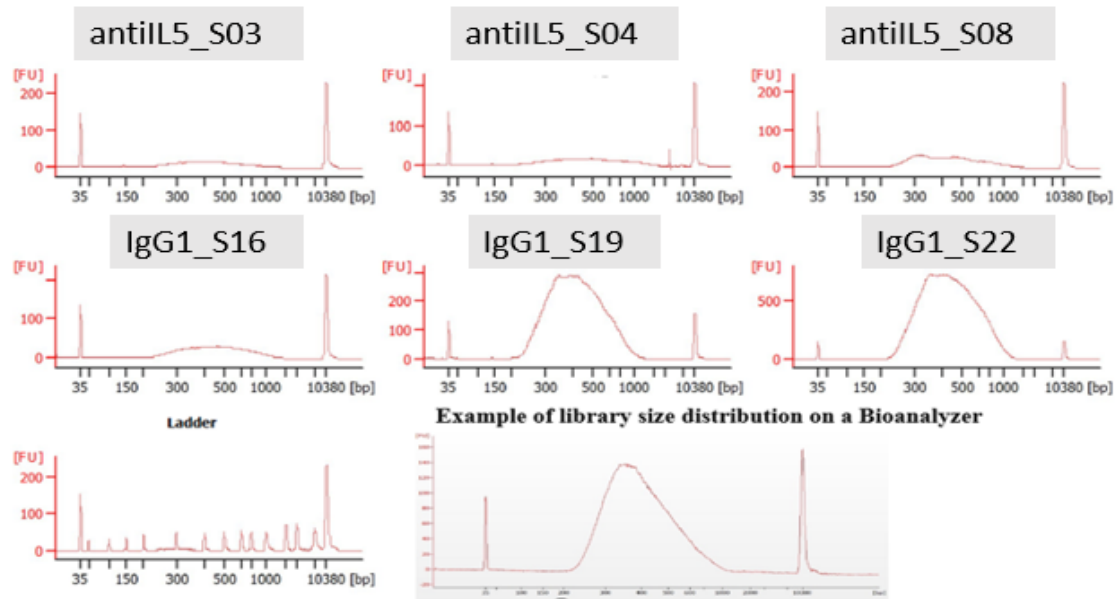


Figure 16: Distribution des fragments dans la librairie par Agilent Bio Analyzer.

Contrôle qualité du séquençage

Le contrôle de qualité des données du RNA-seq a été réalisé avec le progiciel CLC Genomic avant et après l'alignement sur le génome de référence.

Avant d'aligner les données obtenues, nous avons vérifié pour chaque échantillon que la taille des reads attendue était obtenue et que la distribution du taux de GC était bien aux alentours de 50%. De plus, nous nous sommes intéressés à différents indicateurs de qualités tels que :

- Le taux de base ambiguës dans la séquence qui s'avère être bas,
- Le Phread score qui renseigne sur la qualité du produit séquençer. Un score de 20 indique que par 100 paires de base, 1 base peut être ambiguë c'est-à-dire 99% de précision. Nous avons une précision > 99% car nos Phread scores sont généralement au-dessus de 30.
- La couverture et la contribution des nucléotides qui sont constantes jusqu'à 150pb, la taille de nos reads.

Après l'alignement, nous avons obtenu la **Table 4** qui renseigne sur le pourcentage des bases alignées et le nombre de reads mappés ainsi que le pourcentage des bases alignées sur les gènes et sur les régions intergéniques. La couverture de séquençage acceptable de minimum 25 millions de reads mappés a été atteinte pour tous nos échantillons. Cependant les résultats de l'échantillon **antil5-S08** sont à prendre avec précaution à la vue du pourcentage des reads mapés en région intergénique.

Table 4 : Résumé du contrôle de qualité du RNA-seq après alignement.

Souris ID	Reads count	Paired, mapped pairs %	Read mapped count	Mapped to genes %	Mapped to intergenic %
antILL5_S03	62 282 670	47,22	29 409 876	79,16	20,84
antILL5_S04	63 937 434	40,13	25 658 092	84,48	15,52
antILL5_S08	68 687 008	57,95	39 804 121	47,73	52,27
IgG1_S16	60 745 364	69,09	41 968 972	82,22	17,78
IgG1_S19	80 011 180	89,02	71 225 952	81,54	18,46
IgG1_S22	68 408 572	90,28	61 759 259	80,80	19,20

Analyse des données du séquençage

L'analyse de notre RNA-seq se fera en plusieurs étapes avec le progiciel CLC Genomic. Tout d'abord, tous les gènes annotés sont extraits de la base de données Ensembl. Les séquences des reads sont ensuite alignées sur l'ensemble du génome de référence (GRCm39 mouse). Cet alignement va permettre, via l'algorithme d'estimation EM, d'attribuer les reads aux gènes et d'obtenir les valeurs d'expression pour chaque gène par addition du nombre des reads alignés sur ce gène.

Grace à l'algorithme d'estimation EM, nous obtiendrons alors une matrice du taux d'expression des gènes. Ces données d'expression vont être normalisées par la normalisation TMM (Trimmed Mean of M value) qui normalise à la fois la taille de la librairie et celle des gènes. Ensuite, la comparaison d'expression différentielle des gènes entre les deux groupes (EOSnorm et EOS-) est réalisée en utilisant l'outil Differential Expression for RNA-seq.

Dans un premier temps, nous avons comparé l'expression protéique quantifiée par IHC décrite plus haut dans ce manuscrit et l'expression de l'ARNm des gènes correspondants (**Table 5**). Le résultat de l'analyse d'expression différentielle est repris dans l'**Annexe B 1** et illustrée dans la **Figure 17**. Nous pouvons observer qu'aucun de ces gènes n'est différentiellement exprimé de manière statistiquement significative lorsque les deux groupes sont comparés en RNA-seq. Ceci est probablement dû au petit nombre d'échantillons. Cependant, nous constatons qu'il semble y avoir plus d'éosinophiles, de lymphocytes T CD8 et des neutrophiles dans le groupe EOSnorm. Bien que la différence ne soit pas statistiquement significative, ce résultat est semblable à ce que nous avons observé avec l'IHC (**Table 2** : quantification sur la lame entière).

Table 5 : Protéines ciblées par la quantification IHC et le nom des gènes correspondants ciblés lors du séquençage.

Protéines	Nom du gène
RNAse III des granules d'éosinophiles	<i>Ear2</i>
CD8 des lymphocytes T CD8	<i>Cd8a</i>
Élastase des neutrophiles	<i>Elane</i>
FOXP-3 des lymphocytes Treg	<i>Foxp3</i>
Granzyme B des lymphocytes T CD8 activés	<i>Gzmb</i>
PD-1 récepteurs exprimés sur les lymphocytes T activés (modulateur immunitaire)	<i>Pdcd1</i>
PDL-1 ligand du récepteurs PD-1 permettant de moduler la réponse immunitaire	<i>Cd274</i>

Expression différentielle des gènes obtenue avec le RNA-seq : comparaison par Mann–Whitney U test

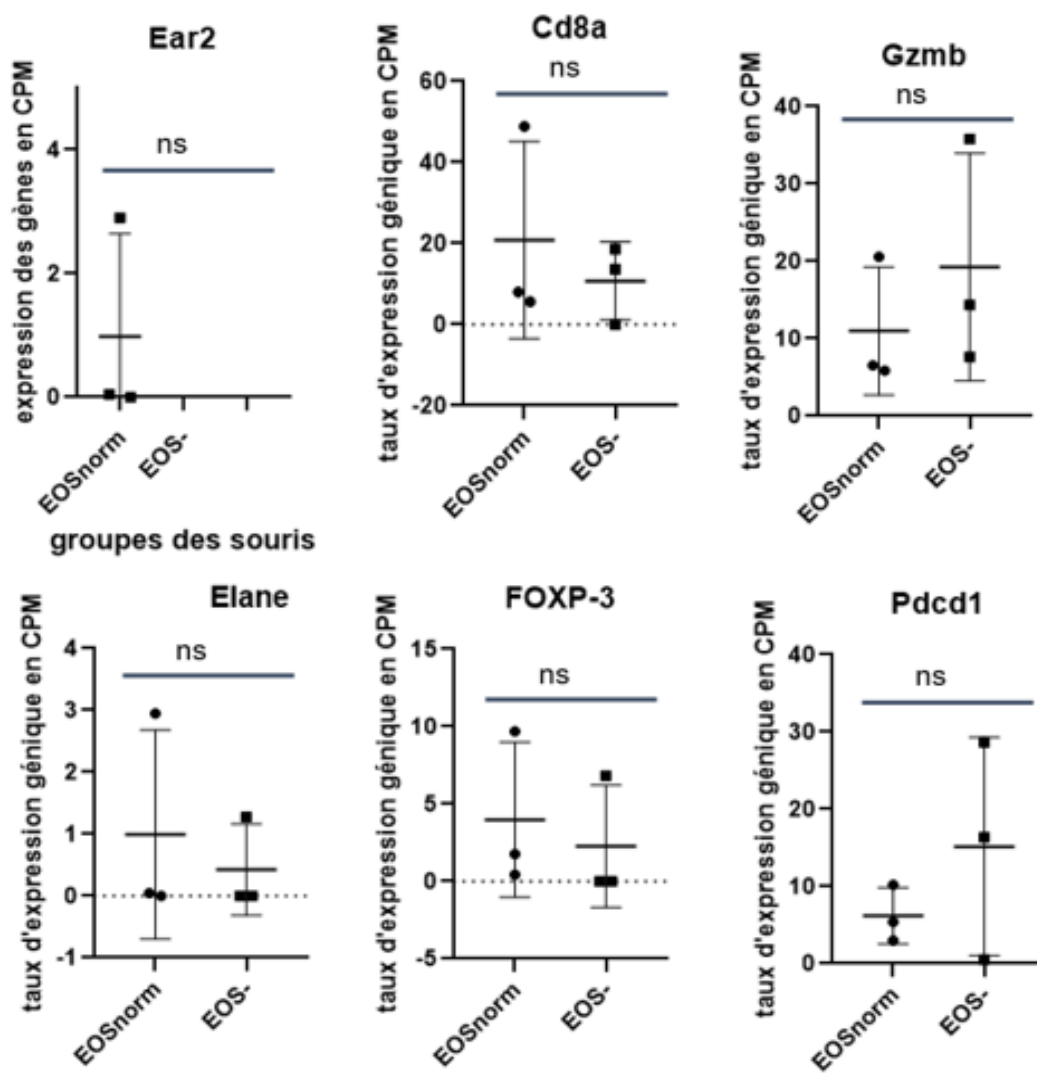


Figure 17: Graphes de l'expression différentielle des gènes pour lesquels la protéine a également été ciblées par IHC. Le gène Ear2 de la RNase III des éosinophiles, Le gène Cd8a des lymphocytes T CD8, le gène Gzmb de la granzyme des lymphocytes T activés, le gène Elane de l'élastase des neutrophiles, le gène FOXP-3 des lymphocytes Trég, et les modulateurs immunitaires (seul Pdc1 des PD-1 est représenté).

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la totalité de la liste des gènes différentiellement exprimés entre les deux groupes. C'est le cas pour 88 gènes, qui présentent une $FDR < 0.05$. Cependant, une observation plus détaillée des valeurs d'expressions normalisées permet de constater que beaucoup de ces variations considérées comme statistiquement significatives sont dues à une valeur extrême dans un des 6 échantillons. Nous avons donc retiré les gènes pour lesquels une valeur extrême est observée, notre critère étant que les valeurs d'expression doivent être comprises dans l'intervalle $Q25 - 2 * (Q75 - Q25) < X < Q75 + 2 * (Q75 - Q25)$ pour être conservées. Après avoir appliqué ce filtre, il apparaît que 17 gènes sont différentiellement exprimés entre les groupes avec une $FDR < 0.05$ ([Annexe B 2](#), [Figure 18](#)).

RNA-seq Volcano Plot

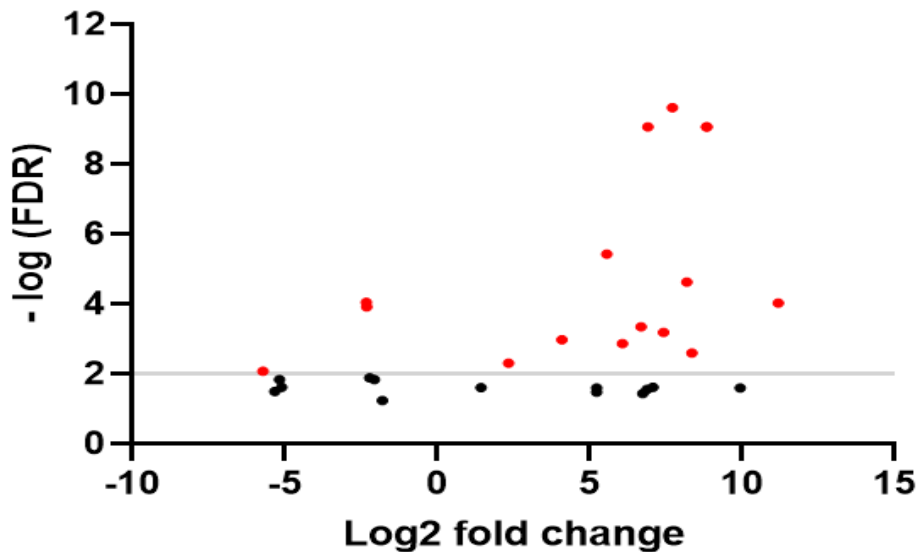


Figure 18: Volcano Plot des gènes différentiellement exprimés entre le groupe EOS et le groupe EOS-.

Pour finir, nous avons procédé à l'analyse déconvolutive par CIBERSORT. Le CIBERSORT est un algorithme disponible on-line (<https://cibersort.stanford.edu/>) permettant d'estimer les proportions de plusieurs types cellulaires dans une population de cellules mixtes. Dans notre cas, les bases de données d'expression géniques utilisées permettent d'évaluer le profil d'infiltration tumorale par 22 types de cellules immunitaires différents à l'aide d'une matrice de signature appelée LM22 disponible sur le site, et générées par Newman et al⁸⁸. Nous avons utilisé le logiciel Alliance of *Genome Resources* pour trouver les orthologues murins des 547 exprimés par les cellules immunitaires qui composent à la matrice LM22 établie chez l'humain. Les valeurs d'expression normalisée des gènes obtenue via le logiciel CLC *Genomic* sont alors utilisées afin d'explorer l'infiltration tumorale par ces 22 types cellulaires de cellules immunitaires (Figure 19).

L'outil permet d'évaluer la corrélation entre l'expression des gènes de notre matrice d'expression génique et celle de la signature immunitaire de la matrice LM22. Seuls trois échantillons (antiIL5_S04, antiIL5_S08 et IgG1_S19) présentent une corrélation avec une P-value ≤ 0.05 (Table 6).

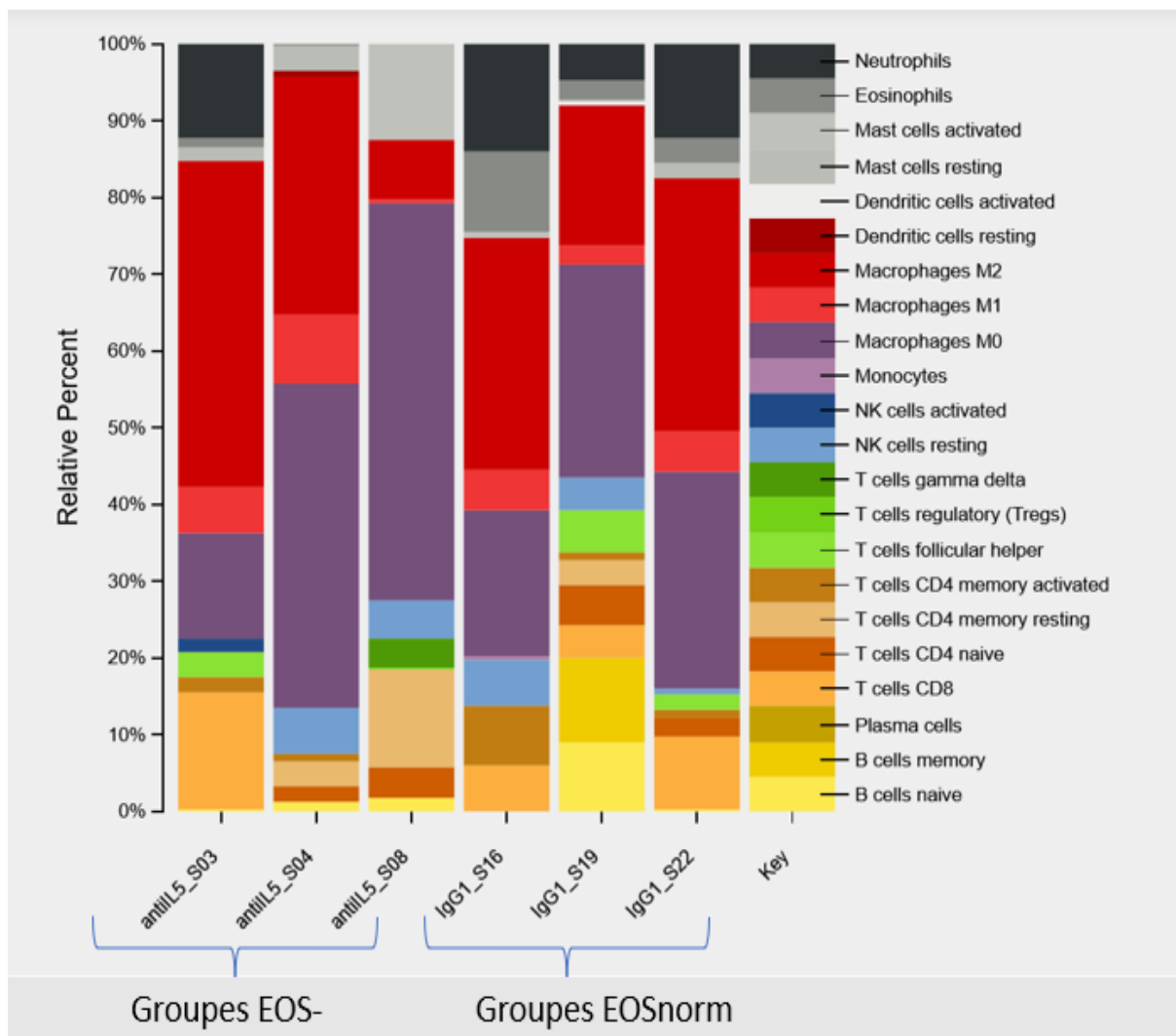


Figure 19: Diagramme représentant le pourcentage relatif d'infiltration tumorale par les cellules immunitaires obtenue après analyse déconvolutive de CIBERSORT.

Table 6 : Valeurs d'infiltration de la tumeur en pourcentage (%) pour les 22 types de cellules immunitaires obtenues par l'analyse déconvolutive de CIBERSORT.

Input Sample	antiIL5_S03	antiIL5_S04	antiIL5_S08	IgG1_S16	IgG1_S19	IgG1_S22
B cells naive	0,2%	1,4%	1,6%	0,0%	9,1%	0,1%
B cells memory	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	11,0%	0,0%
Plasma cells	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
T cells CD8	15,4%	0,0%	0,0%	6,0%	4,1%	9,7%
T cells CD4 naive	0,0%	2,0%	4,2%	0,0%	5,4%	2,4%
T cells CD4 memory resting	0,0%	3,2%	12,5%	0,0%	3,1%	0,0%
T cells CD4 memory activated	2,0%	1,0%	0,0%	7,8%	0,9%	1,0%
T cells follicular helper	3,1%	0,0%	0,0%	0,0%	5,5%	1,9%
T cells regulatory (Tregs)	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%	0,2%	0,0%
T cells gamma delta	0,0%	0,0%	3,7%	0,0%	0,0%	0,0%
NK cells resting	0,0%	6,0%	5,0%	6,0%	4,1%	0,8%
NK cells activated	1,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Monocytes	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%
Macrophages M0	13,9%	42,1%	51,8%	19,0%	27,8%	28,3%
Macrophages M1	5,9%	9,0%	0,6%	5,2%	2,4%	5,4%
Macrophages M2	42,6%	31,0%	7,6%	30,2%	18,3%	32,9%
Dendritic cells resting	0,0%	0,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Dendritic cells activated	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%
Mast cells resting	1,7%	3,3%	0,0%	0,0%	0,3%	1,9%
Mast cells activated	0,0%	0,0%	12,6%	0,8%	0,0%	0,0%

Eosinophils	1,0%	0,2%	0,0%	10,6%	2,4%	3,3%
Neutrophils	12,4%	0,0%	0,0%	13,9%	4,8%	12,2%
P-value	0,059	0,002	0,007	0,121	0,016	0,069

Discussions et Perspectives

Dans le domaine du cancer, de nombreuses études ont mis en évidence la relation entre les cellules immunitaires et la réponse au traitement, ainsi que l'intérêt d'en faire des nouvelles cibles thérapeutiques et marqueurs de pronostic. Parmi les cellules immunitaires étudiées : les éosinophiles, connues pour leurs implications dans les infections parasitaires et les allergies, ont été au centre de plusieurs études. Ces études *in vivo* ont montré des rôles opposés pour les éosinophiles dans différents types de cancer. Les éosinophiles peuvent en effet avoir une action pro ou antitumorale^{57,60–65,67–71}.

A ce jour, il existe assez peu d'information sur la relation entre le nombre d'éosinophiles circulants dans le cancer du sein et le devenir des patients³⁹. Des résultats opposés sur la relation entre le nombre d'éosinophiles circulants et le devenir des patients dans le cancer du sein ont été constatés lors des différentes études rétrospectives conduites^{73,76,77,83}. Deux études rétrospectives ont été conduites par notre laboratoire, le laboratoire d'Oncologie Médicale (Professeur G. Jerusalem, Université de Liège). Ces études ont mis en évidence le potentiel du nombre d'éosinophiles circulants comme facteur prédictif et pronostique dans le cancer de sein^{74,78}.

Afin d'explorer l'impact de la modulation du nombre d'éosinophiles circulants sur le développement tumoral, le laboratoire d'Oncologie Médicale (Professeur G. Jerusalem, Université de Liège) a procédé à la mise en place d'un modèle murin de cancer du sein. Pour ce faire, l'expérience a été réalisée sur deux groupes de souris : le groupe EOS-, des souris qui ont reçu un anticorps anti IL-5 afin de réduire le nombre d'éosinophiles circulants, et le groupe EOSnorm, où les souris ont reçu un anticorps isotype IgG1 et ont conservé un taux d'éosinophiles circulants normal. Il a été constaté que la modulation d'éosinophiles circulants n'avait aucun impact sur le développement de la tumeur primaire. Cependant, il y'a eu plus de cas de souris ayant développé des métastases dans le groupe EOS-.

Lors de ce travail de fin d'étude, nous avons évalué comment le taux d'éosinophiles circulants modifie l'infiltration stromale et tumorale des éosinophiles. De plus, nous avons exploré l'impact de la réduction du nombre d'éosinophiles circulants sur l'infiltration tumorale et stromale d'autres cellules et modulateurs immunitaires. Nous avons utilisé les tumeurs obtenues après sacrifices des souris du modèle murin du cancer du sein de la précédente étude. L'évaluation de ces différentes relations a été faite par IHC et RNA-seq.

Nous nous sommes servis du logiciel QuPath pour la quantification protéique par IHC. Nous avons défini les zones de quantification tumorale et peri-tumorale pour pouvoir comparer l'infiltration immunitaire dans ces différentes parties. Pour ce faire, des IHC avec un anticorps anti-PCNA, un marqueur de prolifération cellulaire, a été réalisé pour chaque souris. Nos IHC avec cet anticorps ont mis en évidence une zone centrale négative, entourée d'une zone où les cellules expriment la PCNA. Nous avons observé cette structure dans toutes les coupes de tumeurs implantées. Cette zone d'expression de la PCNA a été définie comme étant la zone tumorale. Lorsque nous avons réalisé les IHC pour les cibles immunitaires choisies, nous avons constaté leur présence majoritairement dans la zone centrale. Cette zone a donc été définie comme étant la zone stromale (*Figure 11*). Paradoxalement, la zone péri-tumorale stromale est située à l'intérieur de la tumeur et non à sa périphérie. Cette observation diffère de ce qui est observé dans les tumeurs mammaires humaines. Une fois nos zones de comptage déterminées, nous avons procédé à la quantification au niveau stromal, tumoral et sur la lame entière des cellules immunitaires et de certains modulateurs immunitaires.

Nos résultats d'IHC ont montrés une plus grande présence d'éosinophiles dans la tumeur (p-value : 0,0205), dans le stroma (p-value : 0,0449) et sur la lame entière (p-value : 0,0332) lorsque le nombre d'éosinophiles circulant est diminué, groupe EOS- (**Table 2**, *Figure 13*). Ces résultats sont intéressants car ils vont dans le sens des observations faites précédemment au sein de notre laboratoire : les patients avec un taux d'éosinophiles circulants faible ont une plus grande infiltration d'éosinophiles au niveau du stroma, et inversement. En effet, les observations (résultats encore non publiés) réalisées précédemment au laboratoire sur des tumeurs mammaires de sein montrent aussi que les éosinophiles infiltrent peu la tumeur et restent principalement à sa périphérie, dans le stroma. De plus, une relation différente entre la survie des patients et le nombre d'éosinophiles infiltrants la tumeur est observée lorsqu'il s'agit d'une infiltration stromale ou tumorale : les patients avec une infiltration tumorale élevée ont un meilleur pronostic que ceux où les éosinophiles n'entrent pas dans la tumeur mais s'accumulent à sa périphérie dans le stroma. Cependant, ces observations devraient encore être confirmées.

Au vu des résultats de l'expérience précédente, il semblerait que réduire le nombre d'éosinophiles circulants augmente la probabilité qu'à la souris de développer des métastases pulmonaires.

Cependant, nous n'avons constaté aucune différence statistiquement significative en termes d'infiltration d'éosinophiles dans la tumeur primaire lorsque les souris ayant développés des métastases pulmonaires (métastase+, n=7) sont comparées à celles n'en ayant pas développées (métastase-, n=17) (**Table 2**, *Figure 13*). Il serait intéressant de voir le profil d'éosinophiles au site de métastase, au niveau des poumons, dans une future expérience pour mieux évaluer l'impact de la réduction d'éosinophiles circulants sur les métastases. Pour ce faire, il faudrait analyser les cellules immunitaires sur les tissus prélevés au niveau pulmonaire dans ces deux groupes. En effet, une récente étude a mis en évidence le rôle antitumoral d'éosinophiles au site des métastases. Grisaru-Tal et al ont démontré que le microenvironnement tumoral permet une activation des éosinophiles au site des métastases. Ces éosinophiles activés facilitent l'infiltration métastatique des lymphocytes T CD8+ et CD4+ ayant une réponse antitumorale⁸⁹.

Plusieurs études ont montré que les éosinophiles sont impliqués dans la réponse antitumorale notamment en induisant le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires, et en agissant sur l'expression des modulateurs immunitaires dans différents types de cancer^{61,89}. Nous avons exploré l'infiltration stromale et tumorale des cellules immunitaires suivantes : lymphocytes T CD8, neutrophiles et lymphocytes Treg ; ainsi que l'expression des modulateurs immunitaires : PD-1 et PDL-1.

Le taux d'infiltration de lymphocyte T CD8 (p-value : 0,0449) et de neutrophiles (p-value : 0,0332) au niveau stromal étaient plus élevés dans le groupe EOSnorm en comparaison au groupe EOS-. Nos résultats suggèrent que la réduction des éosinophiles circulants induit une plus grande infiltration du site tumoral par les éosinophiles et une baisse de l'infiltration par les lymphocytes T cytotoxiques et les neutrophiles au niveau stromal (**Table 2**, *Figure 13, 14 et 15*). Cette baisse de l'infiltration par les cellules immunitaires est également impliquée au mauvais pronostic global du groupe EOS- : un plus grand nombre de souris avec des métastases pulmonaires (n=5) dans le groupe EOS- en comparaison au groupe EOSnorm.

En d'autres termes, nos résultats suggèrent que la réduction d'éosinophiles circulants entraînerait une baisse de la réponse immunitaire antitumorale via la baisse du recrutement d'autres cellules immunitaires notamment des neutrophiles et des lymphocytes T CD8 ainsi que le manque d'activation des lymphocytes T CD8. Cette observation découle du fait que la quantification de la protéine Granzyme B, un marqueur de l'activation des lymphocytes T CD8 a montré un marquage négatif. Cependant, ce manque d'activation des lymphocytes T CD8 n'est pourtant pas associé avec une immunosuppression tumorale : en effet, les marquages des protéines immunomodulatrices FOXP-3, PD-1 et PDL-1, sont également restés négatifs (**Table 2**).

De plus, il semblerait que la réponse immunitaire dans notre modèle murin est modulée par la baisse des éosinophiles circulants via la diminution du recrutement des neutrophiles car nous avons remarqué une différence statistiquement significative pour les neutrophiles entre les groupes EOS- versus EOSnorm dans le stroma (p-value : 0,0332) et entre les groupes métastase+ versus métastases- dans le stroma (p-value : 0,0131) et sur la lame entière (p-value : 0,0008). Cependant ces observations sont à prendre avec réserve car lors de l'implantation orthotopique des cellules cancéreuses mammaires 4T1-LUC, une forte réponse inflammatoire avait été observée. L'implantation des cellule cancéreuse 4T1-LUC a engendré une augmentation exponentielle du taux des globules blancs circulants en parallèle à la croissance tumorale, et plus particulièrement des neutrophiles circulants. Il faudrait donc améliorer le modèle murin de cancer du sein en utilisant une autre lignée de cellules tumorales, moins inflammatoires^{90,91}.

Augmenter le taux d'éosinophiles circulants pourrait être une alternative thérapeutique nouvelle dans la lutte contre le cancer du sein afin d'accroître la réponse immunitaire. De ce fait, il serait intéressant d'analyser l'impact qu'aurait l'augmentation d'éosinophiles circulants sur l'infiltration stromale et tumorale des cellules immunitaires et l'expression des modulateurs immunitaires dans un modèle murin de cancer de sein. Ce modèle murin de cancer de sein serait constitué de trois groupes de souris : EOS- (réduction des éosinophiles circulants), EOSnorm (pas de réduction ni augmentation d'éosinophiles circulants) et EOS+ (augmentation d'éosinophiles circulants). Ce nouveau modèle murin doit être conçu de manière à éviter la réaction inflammatoire induite par l'implantation orthotopique des cellules 4T1.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons procédé au séquençage de six tumeurs de souris : 3 tumeurs du groupes EOSnorm et 3 tumeurs du groupes EOS-. Nous avons commencé par analyser nos données de séquençage afin de corréliser les résultats de la quantification protéique par IHC et l'expression génique des gènes correspondants (**Table 4**). L'analyse des données d'expression différentielles pour les gènes équivalents aux cibles protéiques des IHC sont à mettre en relation avec la quantification sur la lame totale des IHC. Cette analyse n'a montré aucune différence statistiquement significative entre les groupes (EOSnorm versus EOS-) (*Figure 17*). Cela est probablement dû au nombre de tumeurs séquencées ; une comparaison dans une cohorte plus grande est nécessaire. Bien que cela ne soit pas statistiquement significatif, les résultats du séquençage ont tendance à confirmer ce qui est observé pour les lymphocytes T CD8 et les neutrophiles lors de la quantification protéique par IHC. Ceci suggère que réduire les éosinophiles diminue le taux d'infiltration général des neutrophiles et des lymphocytes T CD8. En revanche, une observation inverse est remarquée pour les éosinophiles : le RNA-seq montre plus d'éosinophiles dans le groupe EOSnorm alors que l'IHC quantifie moins d'éosinophiles dans ce groupe. Cette différence serait due à une dégranulation des éosinophiles entraînant la libération des RNases qui dégradent localement les ARNm spécifique des éosinophiles.

Gry et al. ont montré que la corrélation entre la quantification protéique et l'expression génique est souvent faible. Cependant, quand la corrélation entre la quantification protéique par IHC et l'expression génique par RNA-seq est possible, le RNA-seq apporte une preuve supplémentaire que l'anticorps utilisé lors de l'IHC a reconnu l'antigène, la cible protéique⁹². Le RNA-seq ne peut pas servir de méthode de référence pour l'évaluation de l'infiltration tumorale par les cellules immunitaires car comme dit précédemment, la corrélation entre la quantification protéique et l'expression génique des gènes correspondant n'est pas toujours possible. Néanmoins, nous avons constaté qu'il est possible de détecter par RNA-seq l'expression des gènes des cellules immunitaires innées.

En outre, nous avons constaté qu'il y a 17 gènes différentiellement exprimés entre les groupes EOSnorm et EOS- (**Annexe B 2** et *Figure 18*). Une analyse plus poussée des voies de signalisation dans lesquelles sont impliqués ces gènes permettrait de comprendre le mécanisme d'intervention des éosinophiles dans le cancer de sein. De plus, un modèle murin de cancer de sein permettant d'évaluer la spécificité de l'implication d'éosinophiles dans ces voies serait une autre approche pour évaluer d'éventuelles nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce modèle murin, les voies de signalisations de ces gènes différentiellement exprimés pourraient être ciblées afin d'explorer l'impact de leur modulation sur la réponse immunitaire.

Les éosinophiles expriment des récepteurs cellulaires impliqués dans l'immunité innée et adaptative (*Figure 3*). Parmi eux ; les récepteurs RLR (*RIG-I-Like Receptors*), MAD5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) et TLR (*Toll-Like Receptors*) ont montré un rôle dans l'activité antitumorale d'éosinophiles dans des modèles murins de cancer du sein. En effet, une étude a montré que les antagonistes du récepteur TLR, les R848 permettaient de réduire la vascularisation tumorale et induisaient l'apoptose des cellules tumorales alors qu'une revue scientifique reporte que RIG-I et le LAD5, deux récepteurs de la famille des RLR (*RIG-I-like receptors*) peuvent induire l'inhibition de la croissance tumorale et l'apoptose des cellules tumorales dans différents types de cancer notamment le cancer colorectal et pancréatique^{93,94}. Nos gènes différenciellement exprimés pourraient comme ces récepteurs être impliqués dans l'activité antitumorale des éosinophiles.

Pour finir, nous avons utilisé les données d'expression différentielles obtenues lors du séquençage afin d'analyser via CIBERSORT, un algorithme de déconvolution, l'infiltration tumorale par 22 types de cellules immunitaires (*Figure 19*). Seules trois tumeurs ont une p-value de déconvolution acceptable : antiIL5_S04 (p-value : 0,002), antiIL5_S08 (p-value : 0,007) et IgG1_S19 (p-value : 0,016). Cependant, **la Table 6** montre des résultats intéressants pour des cellules immunitaires non explorées durant notre expérience telles que les macrophages, les lymphocyte B et les lymphocytes NK. Il serait intéressant de réaliser des IHC pour ces cellules et voir en parallèle leur profil d'infiltration par CIBERSORT dans une cohorte plus grande que celle choisit lors de notre expérience. De plus, une cohorte plus grande permettrait de comparer efficacement l'infiltration cellulaire entre les groupes pour chacune de cellules.

En conclusion, nous avons mené une expérience sur un modèle murin de cancer de sein dans lequel le nombre d'éosinophiles circulants a été réduit afin d'étudier la relation entre la réduction des éosinophiles circulants et l'infiltration tumorales de quelques types de cellules immunitaires ainsi que l'expression des modulateurs immunitaires. Nos résultats suggèrent que la modulation d'éosinophiles joue un rôle dans l'infiltration stromale et tumorale des éosinophiles mais aussi que cette modulation affecte l'infiltration stromale et tumorale d'autres cellules immunitaires. En effet, nous avons remarqué que la réduction des éosinophiles circulants augmentait significativement l'infiltration stromale (p-value : 0,0449), tumorale (p-value : 0,0205) et sur la lame entière (p-value : 0,0332) des éosinophiles mais que cela s'accompagnait d'une baisse d'infiltration stromale des lymphocytes T CD8 (p-value : 0,0449) et des neutrophiles (p-value : 0,0332). De plus une plus grande infiltration de la zone tumorale par les neutrophiles est observée dans le groupe métastase- suggérant une implication particulière de ces cellules dans la dissémination du cancer. D'autres part, nous avons pu détecter les cellules immunitaires par RNA-seq ; et bien que cela ne soit pas statistiquement significatif, nous avons observé la présence au sein de la tumeur de plusieurs cellules de l'immunité innée et adaptative par l'analyse déconvolutive de CIBERSORT

Annexes

A. Immunohistochimie

Ci-contre, les tableaux détaillés des différentes quantifications par immunohistochimie des cellules immunitaires. Nous avons quantifié les cellules dans la tumeur, le stroma et sur la lame entière après coloration hématoxyline-DAB par le logiciel QuPath.

1. Quantifications des éosinophiles

Souris	métastase	Groupes	Cellules Positives dans la tumeur (%)	Cellules Positives dans le stroma (%)	Cellules Positives sur la lame entière (%)	Compte manuel
antIL5_S01	1	EOS- (anti-IL-5)	9,7104	18,9089	14,4128	2
antIL5_S02	1	EOS-	8,1218	23,1243	15,3868	3
antIL5_S03	0	EOS-	8,5066	23,4398	19,8185	4
antIL5_S04	0	EOS-	7,2796	20,7102	15,6723	3
antIL5_S05	0	EOS-	12,1807	16,7528	15,0023	3
antIL5_S06	1	EOS-	3,605	8,9142	7,6044	2
antIL5_S07	0	EOS-	0,8787	20,3599	10,6947	3
antIL5_S08	0	EOS-	15,8806	15,948	15,9371	4
antIL5_S09	1	EOS-	1,3828	4,2278	4,2278	2
antIL5_S10	1	EOS-	1,2832	1,2164	1,2323	1
antIL5_S11	0	EOS-	4,4602	8,6498	6,9002	1
antIL5_S12	0	EOS-	3,4248	13,9741	7,5979	3
IgG1_S13	0	EOSnorm (IgG1)	6,6004	24,5498	19,1456	4
IgG1_S14	0	EOS	1,5391	7,1341	4,3763	2
IgG1_S15	1	EOS	0,1889	8,0256	0,8712	1
IgG1_S16	0	EOS	1,2562	3,0572	2,6999	1
IgG1_S17	0	EOS	2,0437	6,7609	3,9518	2
IgG1_S18	0	EOS	0,8366	8,5153	7,7792	2
Souris_19	0	EOS	0,3314	6,4243	4,6618	2
IgG1_S20	0	EOS	1,4111	2,7901	2,204	2
IgG1_S21	1	EOS	1,8219	0,3972	1,386	1
IgG1_S22	0	EOS	1,7658	2,4571	2,3996	2
IgG1_S23	0	EOS	5,1442	23,1162	15,3033	2
IgG1_S24	0	EOS	3,5034	5,8281	4,8602	3

Tableau Annexe A.1bis : Test de normalité

	RNase3 tum	RNase3 strom	RNase3 tot
Test for normal distribution			
Anderson-Darling test			
A2*	1,332	0,8816	1,024
P value	0,0014	0,0202	0,0088
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No
P value summary	**	*	**
D'Agostino & Pearson test			
K2	9,023	7,461	5,848
P value	0,0110	0,0240	0,0537
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	Yes
P value summary	*	*	ns
Shapiro-Wilk test			
W	0,8451	0,9013	0,8907
P value	0,0018	0,0229	0,0137
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No
P value summary	**	*	*
Kolmogorov-Smirnov test			
KS distance	0,2076	0,2075	0,1800
P value	0,0088	0,0089	0,0430
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No
P value summary	**	**	*
Number of values	24	24	24

2. Quantifications des lymphocytes T CD8+

Souris	métastase	Groupes	Cellules Positives dans la tumeur (%)	Cellules Positives dans le stroma (%)	Cellules Positives sur la lame entière (%)
antilL5_S01	1	EOS- (anti-IL-5)	2,1559	33,3109	23,9708
antilL5_S02	1	EOS-	0,5425	14,1745	9,5533
antilL5_S03	0	EOS-	0,9231	49,9679	45,8564
antilL5_S04	0	EOS-	1,1405	17,1747	11,9806
antilL5_S05	0	EOS-	2,0956	12,3928	10,4344
antilL5_S06	1	EOS-	5,5293	18,5997	17,3808
antilL5_S07	0	EOS-	0,6095	10,1218	5,3725
antilL5_S08	0	EOS-	1,2928	15,8695	13,4861
antilL5_S09	1	EOS-	2,2882	48,9275	46,8263
antilL5_S10	1	EOS-	1,8338	7,9602	7,6198
antilL5_S11	0	EOS-	0,8969	38,3747	28,6042
antilL5_S12	0	EOS-	0,9116	5,7744	3,5414
IgG1_S13	0	EOS (IgG1)	0,4206	38,88	30,5978
IgG1_S14	0	EOS	2,6498	42,1246	32,5319
IgG1_S15	1	EOS	0,7983	18,8234	2,5059
IgG1_S16	0	EOS	1,5787	46,8803	39,0042
IgG1_S17	0	EOS	0,4505	27,5102	19,2654
IgG1_S18	0	EOS	1,0482	44,1846	25,7098
Souris_19	0	EOS	5,8191	51,2832	40,4089
IgG1_S20	0	EOS	5,3229	42,335	30,5551
IgG1_S21	1	EOS	0,1719	32,5599	12,435
IgG1_S22	0	EOS	0,3077	33,6116	29,3901
IgG1_S23	0	EOS	0,1486	5,7023	3,4892
IgG1_S24	0	EOS	0,4078	66,2323	61,6628

3. Quantifications des neutrophiles

souris	métastase	Groupes	Cellules Positives dans la tumeur (%)	Cellules Positives dans le stroma (%)	Cellules Positives sur la lame entière (%)
antilL5_S01	1	EOS- (anti-IL-5)	3,2141	23,6892	16,4705
antilL5_S02	1	EOS-	6,0319	17,3742	12,9199
antilL5_S03	0	EOS-	4,9171	33,3636	27,5312
antilL5_S04	0	EOS-	5,7163	37,8226	28,3675
antilL5_S05	0	EOS-	29,133	25,4303	26,322
antilL5_S06	1	EOS-	2,7127	14,5241	11,9753
antilL5_S07	0	EOS-	5,5256	33,9416	21,1146
antilL5_S08	0	EOS-	23,2622	41,5586	39,0452
antilL5_S09	1	EOS-	7,5818	23,0465	19,316
antilL5_S10	1	EOS-	1,7163	9,9695	9,0977
antilL5_S11	0	EOS-	2,5956	25,3167	19,4664
antilL5_S12	0	EOS-	7,5144	18,7639	14,4129
IgG1_S13	0	EOS (IgG1)	18,5459	34,8348	31,1671
IgG1_S14	0	EOS	1,7573	23,5805	16,0304
IgG1_S15	1	EOS	3,6102	18,1412	5,7432
IgG1_S16	0	EOS	8,0786	39,9877	35,3386
IgG1_S17	0	EOS	5,9899	33,8751	23,0592
IgG1_S18	0	EOS	13,6087	28,52	21,1355
Souris_19	0	EOS	2,7432	47,1775	36,149
IgG1_S20	0	EOS	2,3428	39,3733	33,5163
IgG1_S21	1	EOS	1,844	51,0371	22,4804
IgG1_S22	0	EOS	4,7401	22,6846	20,7983
IgG1_S23	0	EOS	7,8074	51,4579	26,1484
IgG1_S24	0	EOS	0,7338	41,7944	32,1027

B. RNA-seq

1. Données de CLC Genomic

La table suivante reprend les valeurs d'expression génique normalisée en CPM obtenue par l'analyse des données du séquençage ainsi que la valeur FDR p-value d'expression différentielle entre les deux groupes EOS/métastase- et EOS-/métastases+ pour les cellules immunitaires et modulateurs immunitaire exploré par IHC. Ces données sont obtenues en utilisant le logiciel CLC Genomic.

Nom du gène	Groupe des souris EOS-			Groupe des souris EOS			FDR p-value
	antiIL5_S03	antiIL5_S04	antiIL5_S08	IgG1_S16	IgG1_S19	IgG1_S22	
Ear2 (RNase III)	0	0	0	0	2,9000	0,0498	0,9075
Cd8a (CD8)	18,6521	0	13,6603	5,6449	48,8735	8,0609	0,9999
Elane	1,2790	0	0	0	2,9476	0,0498	0,9999
Foxp3	0	0	6,8302	1,7785	9,6986	0,4478	0,9999
Gzmb (granzyme B)	35,8120	7,6607	14,3434	20,5692	6,5608	5,8715	0,9999
Pdcd1 (PD-1)	28,6709	0,5194	16,3924	3,0158	10,2216	5,4238	0,9999
Cd274 (PDL-1)	45,9375	77,2565	89,4755	74,0029	64,7526	55,0834	0,9999

2. Gène différentiellement exprimé entre les groupes

Cette table reprend un extrait des 17 gène différentiellement exprimé entre le groupe EOS- et EOSnorm. La FDR p-value est la p-value ajusté sur base des hypothèses de comparaison multiple.

Name	Fold change	FDR p-value
Snord3b4_1	209,439269	2,399E-10
Xirp2	119,853495	8,601E-10
Snord3b1	456,176704	8,601E-10
Snord3b2	457,773817	8,601E-10
Mir6236	47,3538556	3,779E-06
Igfn1	291,646559	0,00002395
Eln	-4,99410001	0,0000903
Snord3b3	2325,14783	0,00009414
Enpp2	-4,96572559	0,0001211
Ppp1r3a	103,534735	0,000457
Trdn	172,220453	0,0006538
Obscn	16,996138	0,001064
Ldb3	67,1810065	0,001349
Mypn	326,712837	0,002524
Lars2	5,0753117	0,00497
gene:ENSMUSG00002076650	-52,4697467	0,008352
Sulf2	-4,63504535	0,01317239
Trp53inp1	-4,15878635	0,01451507
Snord3b4_2	-35,9236917	0,01460574
Eif4a3l1	135,558256	0,02444719
gene:ENSMUSG00002075931	-34,5332726	0,02444719
Acp5	2,69760444	0,02478303
Epha5	979,083947	0,02524289
Olf639	37,3423578	0,02524289
Adprh1	117,541795	0,02786507
gene:ENSMUSG00002075453	-40,2233038	0,03225518
Casq1	37,6723042	0,03380103
KIhl40	107,581514	0,03645213
Prcp	-3,46966993	0,05793353

Références

1. Freddie Bray PhD, Mathieu Laversanne MSc, Elisabete Weiderpass MD, Isabelle Soerjomataram MD. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *ACS Journal*. Published online June 4, 2021.
2. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020. Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
4. Belgian Cancer Registry. Belgian Cancer Registry. *Belgian Cancer Registry*. Published online October 6, 2021. Accessed October 6, 2021. https://kankerregister.org/Home_fr
5. Hsiu-Hsi Chen. Contributions of Screening and Treatment to Mortality From Breast Cancer. *JAMA*. Published online June 12, 2018.
6. James D. Yager PhD, and NEDMD. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N Engl J Med*. Published online January 19, 2006.
7. Fahad Ullah M. Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 1152. Springer New York LLC; 2019:51-64. doi:10.1007/978-3-030-20301-6_4
8. Neuhouser ML, Aragaki AK, Prentice RL, et al. Overweight, obesity, and postmenopausal invasive breast cancer risk: A secondary analysis of the women's health initiative randomized clinical trials. *JAMA Oncology*. 2015;1(5):611-621. doi:10.1001/jamaoncol.2015.1546
9. Chifei Kang, Derek LeRoith, Emily J Gallagher. Diabetes, Obesity, and Breast Cancer. *Endocrinology*. Published online November 2018.
10. Chen S, Parmigiani G. *Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 Penetrance*. <http://seer.cancer.gov/canques/mortality.html>
11. Hideko Yamauchi, Junko Takei. Management of hereditary breast and ovarian cancer. *Int J Clin Oncol*. Published online February 2018.
12. Kolak A, Kamińska M, Sygit K, et al. Primary and secondary prevention of breast cancer. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2017;24(4):549-553. doi:10.26444/aaem/75943
13. Wolfgang Buchberger, Sabine Geiger-Gritsch, Rudolf Knapp, Kurt Gautsch, Willi Oberaigner. Combined screening with mammography and ultrasound in a population-based screening program. *Eur J Radiol*. Published online April 2018.
14. Skaane P, Bandos AI, Niklason LT, et al. Digital mammography versus digital mammography plus tomosynthesis in breast cancer screening: The Oslo tomosynthesis screening trial. *Radiology*. 2019;291(1):23-30. doi:10.1148/radiol.2019182394
15. Sardanelli F, Aase HS, Álvarez M, et al. Position paper on screening for breast cancer by the European Society of Breast Imaging (EUSOBI) and 30 national breast radiology bodies from Austria, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Israel, Lithuania, Moldova, The Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Serbia, Slovakia, Spain, Sweden, Switzerland and Turkey. *European Radiology*. 2017;27(7):2737-2743. doi:10.1007/s00330-016-4612-z

16. Saslow D, Boetes C, Burke W, et al. *American Cancer Society Guidelines for Breast Screening with MRI as an Adjunct to Mammography*. Vol 57. <http://CME.AmCancerSoc.org>.
17. Frères P, Wenric S, Boukerroucha M, et al. *Circulating MicroRNA-Based Screening Tool for Breast Cancer*. Vol 7. www.impactjournals.com/oncotarget
18. Jové M, Collado R, Luís Quiles J, et al. *A Plasma Metabolomic Signature Discloses Human Breast Cancer*. Vol 8; 2017. www.impactjournals.com/oncotarget
19. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2019;30(8):1194-1220. doi:10.1093/annonc/mdz173
20. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67(4):290-303. doi:10.3322/caac.21393
21. Epomedicine. TNM and Staging of Breast Cancer Simplified. *Epomedicine*. Published online August 14, 2016.
22. Sofi GN, Sofi JN, Nadeem R, et al. Estrogen receptor and progesterone receptor status in breast cancer in relation to age, histological grade, size of lesion and lymph node involvement. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(10):5047-5052. doi:10.7314/APJCP.2012.13.10.5047
23. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/college of American pathologists clinical practice guideline update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2014;138(2):241-256. doi:10.5858/arpa.2013-0953-SA
24. Hammond MEH, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Oncology Practice*. 2010;6(4):195-197. doi:10.1200/JOP.777003
25. Frederique Penault-Llorca, Nina Radosevic-Robin. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *The royal college of pathologist of Australia*. Published online January 5, 2017.
26. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. Published online 1991.
27. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al. *Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications*.; 2001. www.winstat.com
28. Maryann Kwa AM, Francisco J. Esteva. Clinical utility of gene-expression signatures in early stage breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. Published online May 31, 2017.
29. Marta Hergueta-Redondo, José Palacios, Amparo Cano, Gema Moreno-Bueno. "New" molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Transl Oncol* . Published online 2008.
30. Pan H, Gray R, Braybrooke J, et al. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(19):1836-1846. doi:10.1056/nejmoa1701830
31. Elena Almagro, Cynthia S González, Enrique Espinosa. Prognostic factors of early breast cancer. *Med Clin (Barc)* . Published online February 19, 2016.

32. Gao Z hua, Li C xin, Liu M, Jiang J yuan. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020;20(1). doi:10.1186/s12885-020-07654-y
33. Breast Cancer Trialists E, Group C. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10⁸01 women in 17 randomised trials. *The Lancet*. 2011;378:1707-1716. doi:10.1016/S0140
34. Marissa C van Maaren, Linda de Munck, Geertruida H de Bock, et al. 10 year survival after breast-conserving surgery plus radiotherapy compared with mastectomy in early breast cancer in the Netherlands: a population-based study. *Lancet Oncology*. Published online June 2016.
35. McGale P, Taylor C, Correa C, et al. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: Meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *The Lancet*. 2014;383(9935):2127-2135. doi:10.1016/S0140-6736(14)60488-8
36. Erica L Mayer M, Amylou C Dueck P, Prof Miguel Martin M, et al. Palbociclib with adjuvant endocrine therapy in early breast cancer (PALLAS): interim analysis of a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The Lancet Oncology*. Published online January 2021.
37. D Johnston SR, Harbeck N, Hegg R, et al. Abemaciclib Combined With Endocrine Therapy for the Adjuvant Treatment of HR1, HER22, Node-Positive, High-Risk, Early Breast Cancer (monarchE). *J Clin Oncol*. 2020;38:3987-3998. doi:10.1200/JCO.20
38. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*. 2014;27(1):16-25. doi:10.1016/j.coi.2014.01.004
39. Poncin A, Onesti CE, Josse C, et al. Immunity and breast cancer: Focus on eosinophils. *Biomedicines*. 2021;9(9). doi:10.3390/biomedicines9091087
40. Keenan TE, Tolaney SM. Role of immunotherapy in triple-negative breast cancer. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2020;18(4):479-489. doi:10.6004/jnccn.2020.7554
41. Becht E, Giraldo NA, Germain C, et al. Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. *Advances in Immunology*. 2016;130:95-190. doi:10.1016/BS.AI.2015.12.002
42. Qi L, Zhang Q, Miao Y, et al. Interleukin-33 activates and recruits natural killer cells to inhibit pulmonary metastatic cancer development. *International Journal of Cancer*. 2020;146(5):1421-1434. doi:10.1002/ijc.32779
43. Afghahi A, Purington N, Han SS, et al. Higher absolute lymphocyte counts predict lower mortality from early-stage triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(12):2851-2858. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1323
44. Chen Y, Chen K, Xiao X, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is correlated with response to neoadjuvant chemotherapy as an independent prognostic indicator in breast cancer patients: A retrospective study. *BMC Cancer*. 2016;16(1). doi:10.1186/s12885-016-2352-8
45. Guo W, Lu X, Liu Q, et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio for breast cancer patients: An updated meta-analysis of 17079 individuals. *Cancer Medicine*. 2019;8(9):4135-4148. doi:10.1002/cam4.2281

46. Badalamenti G, Fanale D, Incorvaia L, et al. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone? *Cellular Immunology*. 2019;343. doi:10.1016/j.cellimm.2018.01.013
47. Emens LA. Breast cancer immunotherapy: Facts and hopes. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(3):511-520. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-3001
48. Khoury T, Nagrale V, Opyrchal M, Peng X, Wang D, Yao S. Prognostic Significance of Stromal Versus Intratumoral Infiltrating Lymphocytes in Different Subtypes of Breast Cancer Treated with Cytotoxic Neoadjuvant Chemotherapy. doi:10.1097/PAI
49. Peng L, Li L, Guo YW, Yin XJ, Wang S, Liu CP. *Original Article CD8 + Cytotoxic and FoxP3 + Regulatory T Lymphocytes Serve as Prognostic Factors in Breast Cancer*. Vol 11.; 2019. www.ajtr.org
50. Zhang M, Sun H, Zhao S, Wang Y, Pu H, Zhang Q. *Expression of PD-L1 and Prognosis in Breast Cancer: A Meta-Analysis*.; 2017. www.impactjournals.com/oncotarget
51. Ali HR, Chlon L, Pharoah PDP, Markowitz F, Caldas C. Patterns of Immune Infiltration in Breast Cancer and Their Clinical Implications: A Gene-Expression-Based Retrospective Study. *PLoS Medicine*. 2016;13(12). doi:10.1371/journal.pmed.1002194
52. Shihab I, Khalil BA, Elemam NM, et al. Understanding the role of innate immune cells and identifying genes in breast cancer microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):1-16. doi:10.3390/cancers12082226
53. Wu J, Li S, Yang Y, et al. *TLR-Activated Plasmacytoid Dendritic Cells Inhibit Breast Cancer Cell Growth in Vitro and in Vivo*. www.impactjournals.com/oncotarget
54. Zhou J, Tang Z, Gao S, Li C, Feng Y, Zhou X. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Frontiers in Oncology*. 2020;10. doi:10.3389/fonc.2020.00188
55. Marichal T, Mesnil C, Bureau F. Homeostatic eosinophils: Characteristics and functions. *Frontiers in Medicine*. 2017;4(JUL). doi:10.3389/fmed.2017.00101
56. Simon SCS, Utikal J, Umansky V. Opposing roles of eosinophils in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2019;68(5):823-833. doi:10.1007/s00262-018-2255-4
57. Gatault S, Legrand F, Delbeke M, Loiseau S, Capron M. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Vol 61. ; 2012:1527-1534. doi:10.1007/s00262-012-1288-3
58. Yousefi S, Simon D, Stojkov D, Karsonova A, Karaulov A, Simon HU. In vivo evidence for extracellular DNA trap formation. *Cell Death and Disease*. 2020;11(4). doi:10.1038/s41419-020-2497-x
59. Hwang SM, Uhm TG, Lee SK, et al. Olig2 is expressed late in human eosinophil development and controls Siglec-8 expression. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016;100(4):711-723. doi:10.1189/jlb.1a0715-314rrr
60. Crusio WE, Radeke HH. *Advances in Experimental Medicine and Biology Volume 1273 Series Editors*.; 2020. <http://www.springer.com/series/5584>
61. Carretero R, Sektioğlu IM, Garbi N, Salgado OC, Beckhove P, Hämmerling GJ. Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8 + T cells. *Nature Immunology*. 2015;16(6):609-617. doi:10.1038/ni.3159
62. Hollande C, Boussier J, Ziai J, et al. Inhibition of the dipeptidyl peptidase DPP4 (CD26) reveals IL-33-dependent eosinophil-mediated control of tumor growth. *Nature Immunology*. 2019;20(3):257-264. doi:10.1038/s41590-019-0321-5

63. Zheng X, Zhang N, Qian L, et al. CTLA4 blockade promotes vessel normalization in breast tumors via the accumulation of eosinophils. *International Journal of Cancer*. 2020;146(6):1730-1740. doi:10.1002/ijc.32829
64. Benatar T, Cao MY, Lee Y, et al. IL-17E, a proinflammatory cytokine, has antitumor efficacy against several tumor types in vivo. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2010;59(6):805-817. doi:10.1007/s00262-009-0802-8
65. Voorwerk L, Garner H, Blomberg OS, et al. LBA10 Critical role of eosinophils during response to immune checkpoint blockade in breast cancer and other cancer types. *Annals of Oncology*. 2020;31:S1142. doi:10.1016/j.annonc.2020.08.2237
66. Mattes J, Hulett M, Xie W, et al. Immunotherapy of Cytotoxic T Cell-resistant Tumors by T Helper 2 Cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;197(3):387-393. doi:10.1084/jem.20021683
67. Cheng JN, Luo W, Sun C, et al. *Radiation-Induced Eosinophils Improve Cytotoxic T Lymphocyte Recruitment and Response to Immunotherapy*. Vol 7.; 2021. <https://www.science.org>
68. Xiao P, Wan X, Cui B, et al. Interleukin 33 in tumor microenvironment is crucial for the accumulation and function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncolmmunology*. 2016;5(1):e1063772. doi:10.1080/2162402X.2015.1063772
69. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, et al. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *International Journal of Cancer*. 2014;134(7):1669-1682. doi:10.1002/ijc.28481
70. Shani O, Vorobyov T, Monteran L, et al. Fibroblast-Derived IL33 Facilitates Breast Cancer Metastasis by Modifying the Immune Microenvironment and Driving Type 2 Immunity. *Cancer Research*. 2020;80(23):5317-5329. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-2116
71. Panagopoulos V, Leach DA, Zinonos I, et al. Inflammatory peroxidases promote breast cancer progression in mice via regulation of the tumour microenvironment. *International Journal of Oncology*. 2017;50(4):1191-1200. doi:10.3892/ijo.2017.3883
72. Hu G, Wang S, Zhong K, et al. Tumor-associated tissue eosinophilia predicts favorable clinical outcome in solid tumors: A meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020;20(1). doi:10.1186/s12885-020-06966-3
73. Chouliaras K, Tokumaru Y, Asaoka M, et al. Prevalence and clinical relevance of tumor-associated tissue eosinophilia (TATE) in breast cancer. In: *Surgery (United States)*. Vol 169. Mosby Inc.; 2021:1234-1239. doi:10.1016/j.surg.2020.07.052
74. Onesti CE, Josse C, Boulet D, et al. Blood eosinophilic relative count is prognostic for breast cancer and associated with the presence of tumor at diagnosis and at time of relapse. *Oncolmmunology*. 2020;9(1). doi:10.1080/2162402X.2020.1761176
75. Grisaru-Tal S, Itan M, Grass DG, et al. Primary tumors from mucosal barrier organs drive unique eosinophil infiltration patterns and clinical associations. *Oncolmmunology*. 2021;10(1). doi:10.1080/2162402X.2020.1859732
76. Ownby HE, Roi LD, Isenberg RR, Brennan MJ. Peripheral lymphocyte and eosinophil counts as indicators of prognosis in primary breast cancer. *Cancer*. 2006;52(1):126-130. doi:10.1002/1097-0142(19830701)52:1<126::AID-CNCR2820520123>3.0.CO;2-Y
77. GÜNDÜZ S, GÖKSU SS, ARSLAN D, et al. Factors affecting disease-free survival in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer who receive adjuvant trastuzumab. *Molecular and Clinical Oncology*. 2015;3(5):1109-1112. doi:10.3892/mco.2015.610

78. Onesti CE, Josse C, Poncin A, et al. *Predictive and Prognostic Role of Peripheral Blood Eosinophil Count in Triple-Negative and Hormone Receptor-Negative/HER2-Positive Breast Cancer Patients Undergoing Neoadjuvant Treatment*. www.oncotarget.com
79. Grisaru-Tal S, Itan M, Klion AD, Munitz A. A new dawn for eosinophils in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*. 2020;20(10):594-607. doi:10.1038/s41568-020-0283-9
80. Marichal T, Mesnil C, Bureau F. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Frontiers in Medicine*. 2017;4. doi:10.3389/fmed.2017.00101
81. Kanda A, Yun Y, Bui D van, et al. The multiple functions and subpopulations of eosinophils in tissues under steady-state and pathological conditions. *Allergology International*. 2021;70(1):9-18. doi:10.1016/j.alit.2020.11.001
82. Januskevicius A, Jurkeviciute E, Janulaityte I, Kalinauskaite-Zukauske V, Miliauskas S, Malakauskas K. Blood Eosinophils Subtypes and Their Survivability in Asthma Patients. *Cells*. 2020;9(5):1248. doi:10.3390/cells9051248
83. Samoszuk MK, Nguyen V, Gluzman I, Pham JH. Occult deposition of eosinophil peroxidase in a subset of human breast carcinomas. *Am J Pathol*. 1996;148(3):701-706.
84. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*. 2000;39(1). doi:10.1002/0471142735.im2002s39
85. GeT. Analyses données RNAseq single cell. https://indico.math.cnrs.fr/event/3780/contributions/3241/attachments/2196/2551/01_scRNAseq_pres_Delphine_Bioinfo_2018-10-18.pdf.
86. Qiagen. CLC Genomic manual books.
87. Chen B, Khodadoust MS, Liu CL, Newman AM, Alizadeh AA. Profiling Tumor Infiltrating Immune Cells with CIBERSORT. In: ; 2018:243-259. doi:10.1007/978-1-4939-7493-1_12
88. Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nature Methods*. 2015;12(5):453-457. doi:10.1038/nmeth.3337
89. Grisaru-Tal S, Dulberg S, Beck L, et al. Metastasis-entrained eosinophils enhance lymphocyte-mediated antitumor immunity. *Cancer Research*. 2021;81(21):5555-5571. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-0839
90. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006;10(6):515-527. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008
91. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*. 2011;13(4):215. doi:10.1186/bcr2889
92. Gry M, Rimini R, Strömberg S, et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics*. 2009;10. doi:10.1186/1471-2164-10-365
93. Wu Y, Wu X, Wu L, Wang X, Liu Z. The anticancer functions of RIG-I-like receptors, RIG-I and MDA5, and their applications in cancer therapy. *Translational Research*. 2017;190:51-60. doi:10.1016/j.trsl.2017.08.004
94. YIN T, HE S, WANG Y. Toll-like receptor 7/8 agonist, R848, exhibits antitumoral effects in a breast cancer model. *Molecular Medicine Reports*. 2015;12(3):3515-3520. doi:10.3892/mmr.2015.3885