

Université de Montréal

**Étude du microbiote intratumoral et son effet sur  
la survie à long terme des individus atteints du cancer du sein**

*Par*

Gabriel Pagé

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de M. Sc.

en Sciences Biomédicales

option Médecine Expérimentale

Août, 2020

© Gabriel Pagé, 2020



Université de Montréal

Faculté de Médecine

---

Ce mémoire intitulé :

**Étude du microbiote intratumoral et son effet sur  
la survie à long terme des individus atteints du cancer du sein**

*Présenté par*

**Gabriel Pagé**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Saima Hassan**

Président-rapporteur

**Réjean Lapointe**

Directeur de recherche

**Emmanuel Gonzalez**

Membre du jury



## Résumé

Le microbiote humain est défini par l'ensemble des microbes habitant un site corporel en particulier. Les différents microbiotes de l'Homme, notamment le microbiote intestinal qui est le plus étudié, peuvent moduler de nombreux mécanismes biologiques dont le métabolisme et la réponse immunitaire. Un déséquilibre du microbiote au niveau des espèces qui le composent, ou dysbiose, a été associé à plusieurs maladies inflammatoires comme le diabète, l'obésité, mais aussi divers types de cancer. De plus, il a été démontré que les bactéries pouvaient avoir un impact sur la réponse des patients aux thérapies contre le cancer. Le cancer du sein est le cancer le plus mortel chez la femme. Or, l'étiologie de la maladie reste incertaine. Récemment, il a été montré que des bactéries pouvaient infiltrer les tissus plus profonds comme le tissu mammaire, formant un microbiote local.

Considérant l'impact que la dysbiose peut avoir sur la réponse immunitaire antitumorale et la réponse aux traitements, nous avons émis comme hypothèse qu'une présence bactérienne intratumorale similaire, en composition et en quantité, à celle du tissu normal non-cancéreux affecte la progression du cancer du sein ainsi que le devenir clinique des patientes. La présence du microbiote intratumoral du sein a donc été validée par la détection de plusieurs composants bactériens sur des coupes tumorales à l'aide de marquages moléculaires. Puis, nous avons évalué le rôle potentiel de ce microbiote en quantifiant et identifiant les espèces bactériennes présentes dans les tumeurs et les tissus normaux adjacents des patientes de notre cohorte du cancer du sein.

Nos résultats montrent une abondance moins élevée de l'ADN bactérien dans les tumeurs du sein comparativement aux tissus normaux adjacents appariés, suggérant qu'une altération du microbiote mammaire est associée au cancer. De plus, les patientes ayant un signal bactérien très faible dans leur tumeur avaient un nombre de récurrences plus élevé. Cette influence de la quantité apparente de bactéries sur le devenir clinique a été observée principalement chez les patientes ayant une tumeur avancée, soit un grade ou un stade élevé, et de sous-types moléculaires Luminal HER2<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup> (non-luminal) et Luminal B. Aucune relation n'a été observée entre la composition bactérienne du microbiote intratumoral mammaire et la récurrence. Nos travaux

suggèrent une implication pronostique et thérapeutique de la charge bactérienne du microbiote associé aux tumeurs mammaires.

**Mots-clés :** Cancer du sein, microbiote intratumoral, infiltration bactérienne, quantification bactérienne, gène de l'ARNr 16S, infiltration immunitaire, activation immunitaire.

## Abstract

The human microbiota is defined by all the microbes inhabiting a specific body site. The different human microbiota, and in particular the intestinal microbiota which is the most studied, can modulate many biological mechanisms, including metabolism and the immune response. An imbalance in the bacterial species that compose the microbiota, or dysbiosis, has been associated with several inflammatory diseases such as diabetes, obesity, but also various types of cancer. Additionally, bacteria have been shown to impact the response of patients to cancer therapy. Breast cancer is the deadliest cancer in women. However, the etiology of the disease remains uncertain. Recently, it has been shown that bacteria can infiltrate deeper tissues like breast tissue, forming a local microbiota.

Considering the impact that dysbiosis can have on the anti-tumor immune response and the response to treatments, we hypothesized that an intratumoral bacterial presence similar in composition and quantity to that of normal non-cancerous tissue affects the progression of breast cancer, as well as the clinical outcomes of patients. The presence of the intratumoral breast microbiota was therefore validated by the detection of several bacterial components on whole tumor sections using molecular staining. Then, we evaluated the potential role of this microbiota by quantifying and identifying the bacterial species present in tumors and adjacent normal tissues of patients in our breast cancer cohort.

Our results show a lower abundance of bacterial DNA in breast tumors compared to adjacent paired normal tissues, suggesting that an alteration of the mammary microbiota is associated with breast cancer. In addition, patients with a very low bacterial signal in their tumor had a higher number of recurrences. This influence of the apparent quantity of bacteria on the clinical outcomes has been observed mainly in patients with an advanced tumor, either a high grade or a high stage, and of the Luminal HER2<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup> (non-luminal) and Luminal B molecular subtype. No relationship has been observed between the bacterial composition of the breast intratumoral microbiota and the recurrence. Our work suggests a prognostic and therapeutic implication of the bacterial load of the microbiota associated with breast tumors.

**Keywords** : Breast cancer, intratumoral microbiota, bacterial infiltration, bacterial quantification, 16S rRNA gene, immune infiltration, immune activation.



# Table des matières

## Pages liminaires

|   |           |
|---|-----------|
| Résumé.....   | 5         |
| Abstract.....   | 7         |
| Table des matières .....                                | 9         |
| Liste des tableaux.....                                 | 13        |
| Liste des figures.....                                  | 15        |
| Liste des sigles et abréviations .....                  | 17        |
| Remerciements .....                                     | 21        |
| <b>Chapitre 1 – Introduction .....</b>                  | <b>23</b> |
| Le cancer du sein .....                                 | 23        |
| Épidémiologie.....                                      | 23        |
| Pathogénèse.....  | 24        |
| L’oncogénèse : présentation générale.....               | 24        |
| Implication du génome.....                              | 26        |
| Prolifération incontrôlée .....                         | 26        |
| Résistance aux mécanismes de contrôle intrinsèque ..... | 27        |
| Invasion tissulaire et métastase.....                   | 27        |
| Facteurs de risque .....                                | 28        |
| Facteurs endogènes.....                                 | 28        |
| Facteurs exogènes .....                                 | 28        |
| Implication de la réponse immunitaire.....              | 29        |
| Phase d’élimination .....                               | 30        |
| Phases d’équilibre et d’évasion .....                   | 31        |

|   |           |
|---|-----------|
| Présentation clinique.....                                    | 32        |
| Sous-types morphologiques et moléculaires .....               | 32        |
| Grade et TNM .....  | 35        |
| Thérapie .....  | 36        |
| Infiltration immunitaire .....                                | 37        |
| Facteurs pronostiques et prédictifs .....                     | 39        |
| La communauté microbienne de l'être humain .....              | 39        |
| Description générale du microbiote .....                      | 39        |
| L'ARNr 16S et son implication dans l'étude du microbiote..... | 39        |
| Composition et localisation .....                             | 40        |
| La dysbiose .....   | 43        |
| Bienfaits du microbiote pour la santé.....                    | 44        |
| Rôle dans la pathogenèse .....                                | 47        |
| Relation entre le microbiote et le cancer .....               | 48        |
| Promotion de l'oncogenèse.....                                | 48        |
| Rôle dans la progression tumorale .....                       | 50        |
| Le microbiote du sein .....                                   | 51        |
| Le microbiote intratumoral.....                               | 52        |
| L'utilisation thérapeutique des bactéries .....               | 53        |
| <b>Chapitre 2 – Hypothèses et objectifs.....</b>              | <b>57</b> |
| Hypothèses.....   | 57        |
| Objectifs .....   | 57        |
| <b>Chapitre 3 – Matériel et méthodes .....</b>                | <b>59</b> |
| Tissus humains et approbation éthique .....                   | 59        |

|   |           |
|---|-----------|
| Extraction d'ADN .....  | 59        |
| Courbe standard de la qPCR .....  | 60        |
| Quantification de l'ADN bactérien par qPCR .....  | 60        |
| Préparation des échantillons FFPE .....   | 61        |
| Immunohistochimie (IHC).....  | 62        |
| Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH).....  | 62        |
| Immunofluorescence (IF).....  | 63        |
| Séquençage .....  | 63        |
| Étapes d'analyse des séquences ADN.....   | 64        |
| Statistiques.....   | 64        |
| <b>Chapitre 4 – Résultats</b> .....   | <b>67</b> |
| La révélation des composants bactériens dans les tumeurs mammaires humaines par IHC et FISH. ....                                   | 67        |
| Quantification des composants bactériens dans les tumeurs du sein par qPCR.....   | 70        |
| La dichotomisation de la cohorte selon la quantification des bactéries intratumorales n'induit pas de facteurs confondants. ....    | 73        |
| La composition du microbiote intratumoral mammaire n'est pas significativement différente entre les deux groupes de détection. .... | 76        |
| Une quantification bactérienne importante dans la tumeur du sein est associée à un meilleur devenir clinique des patientes.....     | 78        |
| <b>Chapitre 5 – Discussion et perspectives</b> .....  | <b>83</b> |
| Détection d'un microbiote intratumoral du sein humain .....   | 84        |
| Marquages du LPS, du PGLY et de l'ARNr 16S .....  | 84        |
| Retour sur les résultats.....   | 84        |
| Perspectives.....   | 86        |

|   |     |
|---|-----|
| Quantification des gènes de l'ARNr 16S .....  | 88  |
| Retour sur les résultats.....   | 88  |
| Perspectives.....   | 91  |
| Dichotomisation de notre cohorte du cancer du sein .....                                      | 93  |
| La stratification des patientes et les facteurs confondants .....                             | 93  |
| Retour sur les résultats.....   | 93  |
| Perspectives.....   | 95  |
| Identification des espèces bactériennes par séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S ..... | 96  |
| Retour sur les résultats.....   | 96  |
| Le microbiote intratumoral mammaire et le devenir clinique .....                              | 98  |
| Retour sur les résultats.....   | 98  |
| Perspectives.....   | 101 |
| <b>Chapitre 6 - Conclusion</b> .....  | 103 |
| Réalizations .....  | 103 |
| Projets futurs.....   | 104 |
| <b>Références bibliographiques</b> .....  | 105 |
| <b>Annexes – Figures et tableaux supplémentaires</b> .....                                    | 119 |

## Liste des tableaux

|   |            |
|---|------------|
| <b>Tableau 1. – Classification des sous-types moléculaires du cancer du sein. ....</b>  | <b>33</b>  |
| <b>Tableau 2. – Caractéristiques définissant chaque grade histologique de Nottingham (basée sur (75)).....</b>  | <b>35</b>  |
| <b>Tableau 3. – Caractéristiques clinicopathologiques de la cohorte du cancer du sein et leur association avec la quantification bactérienne.....</b> | <b>75</b>  |
| <b>Tableau 4. – Analyses univariées et multivariées des variables clinicopathologiques associées à la récurrence.....</b>                             | <b>81</b>  |
| <b>Tableau S1. – Analyses univariées de variables clinicopathologiques associées avec la récurrence et la survie globale.....</b>                     | <b>124</b> |



## Liste des figures

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1. – Représentation de la distribution de l'incidence et de la mortalité globale des 10 types de cancers les plus communs chez les femmes en 2018 (adapté de (1)).                  | 24  |
| Figure 2. – Les 10 propriétés (« <i>hallmarks of cancer</i> ») de la cellule cancéreuse. (adapté de (13)).   | 25  |
| Figure 3. – Les 3 phases de l'immunoédition du cancer: l'élimination, l'équilibre et l'évasion. (adapté de (62))   | 32  |
| Figure 4. – La modulation de l'immunité adaptative par le microbiote intestinal (Modifié de (158)).  | 47  |
| Figure 5. – Représentation des marquages utilisés pour la détection des composants bactériens dans les tumeurs mammaires.  | 67  |
| Figure 6. – Révélation des composants bactériens dans le microenvironnement de la tumeur mammaire humaine à l'aide de l'IHC.   | 68  |
| Figure 7. – Validation de la présence et localisation des bactéries du microenvironnement tumoral et de l'identité des cellules immunitaires qui leur sont associées avec le FISH et l'IF. | 69  |
| Figure 8. – Quantification des équivalents bactériens dans le cancer du sein et le tissu normal adjacent à partir de l'ADN codant pour l'ARNr 16S bactérien                                | 72  |
| Figure 9. – La composition et la diversité du microbiote intratumoral ne se différencient pas en fonction de la dichotomisation qPCR de la cohorte du cancer du sein.                      | 77  |
| Figure 10. – Évaluation de la survie sans récurrence des patientes séparées en fonction de la quantification de leurs équivalents bactériens   | 79  |
| Figure 11. – Technique pour l'évaluation de l'impact de la charge bactérienne intratumorale sur l'infiltration immunitaire.  | 87  |
| Figure 12. – Représentation de la structure du gène de l'ARNr 16S formé de régions variables et conservées (adapté de (216)).  | 90  |
| Figure 13. – Expérience pour l'évaluation de la contamination bactérienne introduite dans les échantillons par la manipulation à l'hôpital.  | 93  |
| Figure S1. – Optimisation des marquages moléculaires sur des E. coli, MDA-MB-231 et THP-1 en HistoGels.  | 119 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figure S2. – Établissement d’une courbe standard pour la quantification des équivalents bactériens dans les tumeurs du sein basée sur la qPCR et E. coli comme bactérie de référence.....</b> | <b>120</b> |
| <b>Figure S3. – Validation de la précision et reproductibilité de la quantification des équivalents bactériens dans les tumeurs du sein avec la qPCR.....</b>                                    | <b>121</b> |
| <b>Figure S4. – Une charge bactérienne intratumorale élevée influence la survie à long terme des patientes atteintes du cancer du sein.....</b>  | <b>122</b> |
| <b>Figure S5. – Analyses de survie supplémentaires de la cohorte complète.....</b>   | <b>123</b> |

## Liste des sigles et abréviations

**ACS** : American Cancer Society

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**AJCC** : American Joint Committee on Cancer

**ANOVA** : analyse de la variance

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNr** : ARN ribosomal

**ASV** : variante de séquence d'amplicon

**AT** : antigène tumoral

**BFT** : toxine de la *B. fragilis*

**BRCA1/2** : cancer du sein 1 et 2

**CCR** : Canadian Cancer Registry

**CFU** : unité de formation de colonies

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**CRC** : cancer colorectal

**CTL** : lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxique

**CTLA-4** : protéine associée aux lymphocytes T cytotoxiques 4

**DAMP** : motifs cellulaires associés aux dégâts

**DC** : cellule dendritique

**DCIS** : carcinome canalaire *in situ*

**DFS** : taux de survie sans récurrence

**DSS** : taux de survie spécifique

**ECM** : matrice extracellulaire

**EGFR** : récepteur du facteur de croissance épidermique

**Éq. bac.** : équivalent bactérien

**ER** : récepteur des estrogènes

**Fap2** : protéine d'activation des fibroblastes 2

**FCSQ** : Fondation du Cancer du Sein du Québec

**FFPE** : fixé à la formaline et enrobé de paraffine

**FGF** : facteurs de croissance des fibroblastes  
**FISH** : hybridation *in situ* à fluorescence  
**FMT** : bactériothérapie fécale  
**FRQS** : Fonds de Recherche du Québec - Santé  
**GF** : sans germe  
**GLOBOCAN** : Global Cancer Observatory  
**Gy** : gray  
**HDAC** : inhibiteur des histones désacétylases  
**HER2** : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain  
**HGF** : facteur de croissance hépatique  
**HIER** : récupération d'épitopes induite par la chaleur  
**HMP** : Human Microbiome Project  
**HR** : rapport des risques instantanés  
**IBD** : maladie inflammatoire chronique de l'intestin  
**ICM** : indice de masse corporelle  
**IDC** : carcinome canalaire invasif  
**IDO** : indoleamine 2,3-dioxygénase  
**IF** : immunofluorescence  
**IFN- $\gamma$**  : interféron gamma  
**Ig** : immunoglobuline  
**IHC** : immunohistochimie  
**IL** : interleukine  
**ILC** : carcinome lobulaire invasif  
**JNK** : c-Jun N-terminal  
**LB** : bouillon de culture lysogène  
**LCIS** : carcinome lobulaire *in situ*  
**LEfSe** : taille de l'effet de l'analyse discriminante linéaire  
**LN** : ganglion lymphatique  
**LPS** : lipopolysaccharide

**LTS** : survivant à long terme

**MAMP** : motifs moléculaires associés aux microbes

**MDSC** : cellules myéloïdes suppressives

**MIC A et B** : séquences A et B liées au polypeptide du CMH de classe I

**MMP** : métalloprotéinase matricielle

**MYC** : myélocytome

**MyD88** : molécule pour la réponse primaire de différenciation myéloïde 88

**NAF** : fluide aspiré du mamelon

**NAT** : tissu normal adjacent à la tumeur

**NK** : tueur naturel

**NMDS** : analyse de positionnement multidimensionnel non métrique

**NSG** : séquençage de nouvelle génération

**NT** : non toxique

**NTC** : contrôle sans matrice

**OD** : densité optique

**OS** : taux de survie globale

**PAMP** : motifs moléculaires associés aux pathogènes

**PBS** : tampon phosphate salin

**PCR** : réaction en chaîne par polymérase

**PDAC** : adénocarcinome canalaire pancréatique

**PD-L1** : ligand de la mort programmée 1

**PGLY** : peptidoglycane

**PI3KCA** : phosphatidylinositol 3-kinase

**PR** : récepteur de la progestérone

**PRR** : récepteurs de reconnaissance de MAMP

**PTEN** : phosphatase et homologue de la tensine

**qPCR** : PCR quantitative

**RAS** : sarcome du rat

**RB1** : rétinoblastome 1

**RLR** : récepteurs de type RIG

**ROS** : espèces réactives de l'oxygène

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute

**RRCancer** : Réseau de Recherche sur le Cancer

**S** : Svedberg

**SCFA** : acides gras à chaîne courte

**SEER** : Surveillance, Epidemiology and End Results

**Snail** : protéine à doigt de zinc SNAI1

**SPF** : sans pathogènes spécifiques

**Src** : sarcome

**SSC** : tampon salin de citrate de sodium

**STING** : stimulateur des gènes de l'interféron

**TAM** : macrophage associé à la tumeur

**TEM** : transformation épithélio-mésenchymateuse

**TGF- $\beta$**  : facteur de croissance transformant

**TIGIT** : immunorécepteur des cellules T avec des domaines Ig et ITIM

**TIL** : lymphocytes infiltrant la tumeur

**TLR** : récepteurs de type Toll

**TMA** : microréseau tissulaire

**TN** : triple négatif

**TNF** : facteur de nécrose tumorale

**TNM** : tumeur-ganglion-métastase

**TP53** : protéine tumorale p53

**TRAIL** : ligand induisant une apoptose liée au TNF

**Treg** : lymphocyte T régulateur

**UV** : ultraviolet

**V** : variable

**VEGF** : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

## Remerciements

Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin dans la poursuite de mes études et l'écriture de ce mémoire, particulièrement mes amis et ma famille. J'aimerais remercier spécialement mes parents, **Alain** et **Josée**, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir supporté dans mes projets. Ma sœur, **Maude**, qui trouve toujours le moyen de me faire sourire et de me remonter le moral. À **Amélie**, pour ta compréhension, ton soutien et ton amour durant toutes ces années d'études et son lot d'épreuves. Et pour finir, à mes grands-parents **Céline**, **Robert** et **Julie** pour leur confiance en moi, leurs encouragements et leur intérêt dans mes travaux de recherche.

Puis, je tiens à remercier tous mes collègues du laboratoire, du *lab meeting* et de l'ICM pour les échanges scientifiques et les conseils pertinents qui m'ont permis d'apprendre et de devenir un meilleur scientifique. Un merci particulier pour les membres de la plateforme de pathologie moléculaire, **Christine Caron**, **Liliane Meunier** et **Véronique Barrès**, le laboratoire de **Dominique Trudel**, **Mame Kane Diop** et **Marc-Alexandre Olivier** pour leur aide précieuse dans mon apprentissage des techniques de marquages moléculaires (IHC, IF et FISH). À **Nicolas Boily**, qui a débuté ce projet et sans qui je n'aurais pas pu aller aussi loin dans ma maîtrise. À **Paméla Thebault**, pour m'avoir formé à la qPCR et l'extraction d'ADN et pour ta gestion du laboratoire. À **Stéphanie Lepage**, pour ton apport important à ce projet grâce au recrutement des patientes et ta gestion de la biobanque du cancer du sein. À **Mayra Carneiro** et **Pavel Chrobak**, pour nos nombreuses discussions scientifiques qui m'ont permises de faire avancer mes expériences. À **David Possamai**, pour ton support continu durant ma maîtrise et ton amitié qui m'ont permis de traverser de nombreuses épreuves durant ce projet. **David**, **Paméla**, **Mayra** et **Stéphanie**, je suis content d'avoir pu vous avoir comme collègues de laboratoire. Vous m'avez permis d'apprécier mon temps dans le laboratoire et je vous souhaite le meilleur dans le futur pour les études ou le travail.

Finalement, Je veux remercier **Réjean Lapointe**, mon directeur de laboratoire. Merci de m'avoir redonné ma passion pour les bactéries grâce à ce projet fascinant sur le microbiote et le cancer. Je veux te remercier pour ton support, tes conseils et tes encouragements durant mes

années dans ton laboratoire qui m'ont permis de faire avancer le projet, mais aussi de développer mes compétences scientifiques.

Ce projet a été soutenu financièrement par le réseau ThéCell, la fondation les Roses de l'Espoir, les Fonds de Recherche du Québec – Santé, le Défi Canderel, l'Institut du Cancer de Montréal et les Instituts de Recherche en Santé du Canada.

# Chapitre 1 – Introduction

## Le cancer du sein

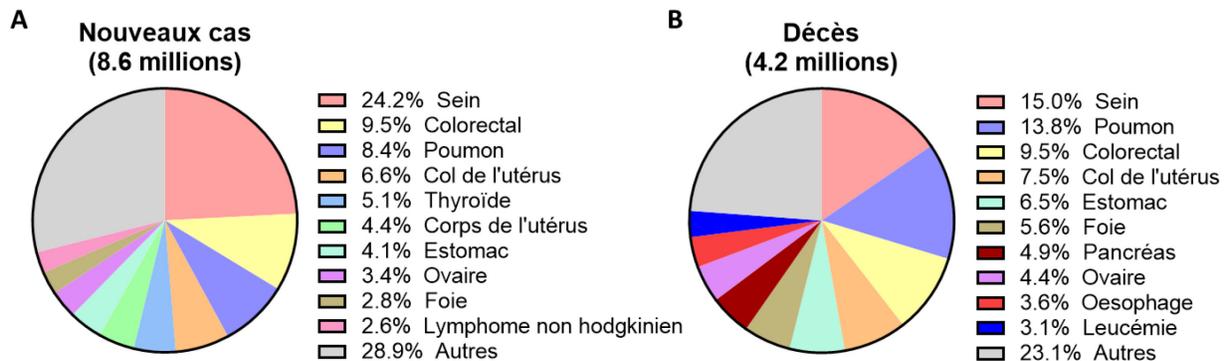
### Épidémiologie

Les statistiques du GLOBOCAN pour l'année 2018 rapportent qu'il y a eu 2.1 millions de nouveaux cas et plus d'un demi-million de décès liés au cancer du sein dans le monde (1). Selon ce rapport, le cancer du sein est le néoplasme malin le plus fréquemment diagnostiqué (24.2 % des diagnostics, **Figure 1**) et la principale cause de décès (15 % des décès, **Figure 1**) chez les femmes à l'international (1). Le risque pour la femme de développer un cancer du sein au cours de sa vie est évalué à 1 chance sur 9 (2). Ce risque varie considérablement entre les régions du monde. Le taux d'incidence ajusté pour l'âge révèle qu'il est plus élevé dans les pays occidentaux (>60 cas pour 100 000) que dans les pays en voie de développement (<40 cas pour 100 000), même s'il est en progression dans les pays à faible risque (3). Globalement, la fréquence des cas a augmenté de 20 % entre 2008 et 2012 (4). Si cette tendance se maintient, le nombre annuel de nouveaux cas de carcinome mammaire devraient atteindre environ 3.2 millions d'ici 2050 (5).

Selon l'*American Cancer Society* (ACS) et les données du *Canadian Cancer Registry* (CCR), le taux de mortalité du cancer du sein en Amérique du Nord a atteint son sommet autour de 1990 avant de diminuer graduellement dans les années suivantes (6, 7). Cette tendance a été expliquée par les progrès dans le traitement et la détection précoce des tumeurs grâce au dépistage par mammographie qui a considérablement amélioré les perspectives de guérison (8). Aux États-Unis, le *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) a enregistré une augmentation du taux de survie spécifique au cancer à 10 ans (*disease specific survival, DSS*) de 65 % en 1975 à 83 % en 2010 (9). Cependant, la réduction du taux de mortalité a ralenti puisqu'elle était de -3.3 %/année entre 1995 et 1998 alors qu'elle se situe à environ -1.3 %/année depuis 2011 (6). Cela suggère que l'amélioration du pronostic des patients tend à se stabiliser.

Puisque l'incidence de la maladie est en forte hausse, le nombre de décès relié au cancer du sein ne cesse de croître. La maladie est non seulement un fardeau pour la santé des individus, mais elle est également associée à un fardeau économique énorme pour la société du fait du coût des traitements, estimé à 40 000\$ par patient au Canada (10). Par conséquent, l'accent doit être

mis sur la prévention et l'amélioration du devenir clinique des patients afin de réduire les conséquences sanitaires et économiques du cancer du sein.



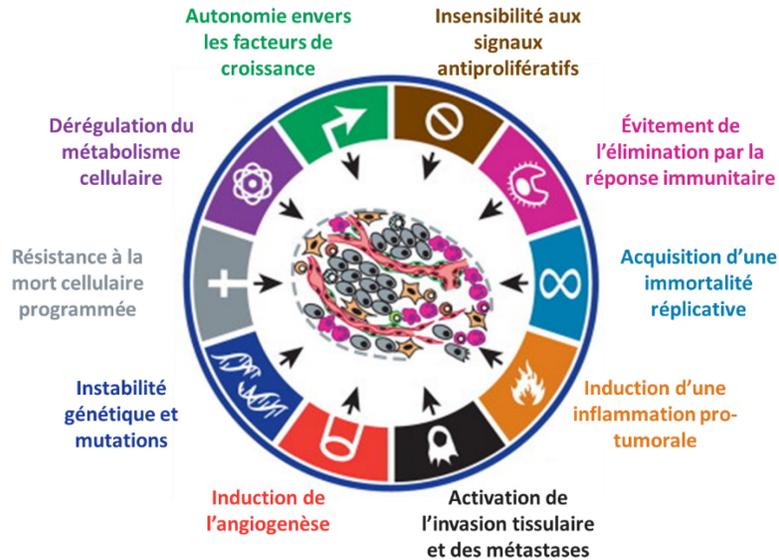
**Figure 1. – Représentation de la distribution de l'incidence et de la mortalité globale des 10 types de cancers les plus communs chez les femmes en 2018 (adapté de (1)).**

**(A)** Proportion du nombre total de nouveaux cas par cancer. **(B)** Proportion du nombre total de décès par cancer.

## Pathogénèse

### L'ONCOGÈNESE : PRÉSENTATION GÉNÉRALE

Le développement du cancer du sein dépend de la transformation de cellules saines en cellules malignes. Deux théories tentent d'expliquer l'apparition des cellules cancéreuses dans le tissu mammaire : le modèle stochastique (évolution clonale) et le modèle hiérarchique (cellules souches cancéreuses) (11, 12). Une cellule cancéreuse mammaire se développe à cause d'une instabilité génétique qui provoque des modifications (mutations) séquentielles dans différents gènes essentiels à la régulation de la cellule comme ceux impliqués dans la réparation de l'ADN, la prolifération et l'apoptose. Dans le modèle de l'évolution clonale, les mutations s'accumulent au cours du temps, et donc se transmettent aux générations cellulaires suivantes, afin d'acquérir toutes les dispositions définissant la cellule maligne (12). C'est sur ce modèle que porteront les paragraphes suivants. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par des propriétés particulières identifiées par Hanahan et Weinberg (13) (résumées dans la **Figure 2**).



**Figure 2. – Les 10 propriétés (« hallmarks of cancer ») de la cellule cancéreuse. (adapté de (13))**

Représentation des fonctions biologiques acquises par les cellules précancéreuses grâce à l'accumulation de mutations durant les étapes multiples du développement d'un cancer.

Les mutations peuvent se produire de façon intrinsèque lors de la répllication de l'ADN des cellules en division qui cause parfois des erreurs aléatoires dans le génome (14). Des facteurs extrinsèques comme des infections virales, des substances chimiques ou des radiations ont aussi une influence significative sur la promotion ou la réduction de l'instabilité génétique (14). La prolifération excessive des cellules dysfonctionnelles induit une expansion clonale qui peut mener à l'établissement d'une masse cellulaire maligne (tumeur) au sein du tissu mammaire. Une réponse immunitaire antitumorale efficace peut inhiber le développement de la tumeur afin de restaurer l'homéostasie du tissu sain (15, 16). Toutefois, les cellules tumorales peuvent acquérir des mécanismes d'évasion de la réponse immunitaire pour continuer leur progression, menant parfois à leur migration dans des organes distants et à la formation de métastases. Les prochaines sections permettront de revoir ces concepts plus en détail en parcourant l'aspect génétique et immunitaire du cancer du sein. Les facteurs de risque extrinsèques qui favorisent l'accumulation de mutations seront aussi abordés.

## IMPLICATION DU GÉNOME

Le cancer du sein est une maladie génétique complexe et hétérogène. Cependant, les mutations génétiques menant à l'initiation et progression du cancer se produisent principalement dans les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. Les premiers codent pour des protéines permettant à la cellule d'entrer dans le cycle cellulaire. L'activité de ces gènes peut être augmentée considérablement par des mutations ponctuelles, une amplification génique ou un réarrangement chromosomique (17). Les suivants codent au contraire pour des protéines limitant la prolifération cellulaire ou menant à la mort cellulaire programmée (apoptose). Des mutations ponctuelles, une délétion ou insertion de séquence ou une perte de l'allèle peuvent mener à la perte de fonction de ces gènes (17).

### *Prolifération incontrôlée*

Tout d'abord, le premier stade de développement du cancer du sein est amorcé par une hyperprolifération anormale d'une cellule épithéliale mammaire. En contexte homéostatique, l'intégrité de la glande mammaire est préservée par une prolifération cellulaire finement régulée par la sécrétion des facteurs de croissance et la densité de leur récepteur exprimé à la surface membranaire (13). La dérégulation du nombre de récepteurs exprimés à la surface membranaire peut rendre la cellule autonome face aux facteurs de croissance (18). Par exemple, le gène du récepteur du facteur de croissance épidermique humain (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) est amplifié dans 20 % des cancers du sein (18), entraînant sa surexpression qui potentialise l'efficacité de la voie de signalisation proliférative des autres récepteurs de la famille HER (19). D'autres modifications génétiques dans des récepteurs de la même famille que le récepteur HER2, des protéines impliquées dans la transduction de la signalisation ainsi que des protéines nucléaires contrôlant positivement le cycle cellulaire peuvent conférer une perte de contrôle de la prolifération (17). La mutation de gènes suppresseurs de tumeur permettent de maintenir continuellement les signaux de prolifération enclenchés. C'est le cas du gène *PTEN* codant pour une phosphatase qui dégrade le produit de la kinase PI3K. La perte de fonction du gène est retrouvée dans 50 % des cancers du sein et permet d'empêcher une inactivation de la cascade de signalisation PI3K/AKT induite par les facteurs de croissance (20).

### *Résistance aux mécanismes de contrôle intrinsèque*

Afin d'atteindre l'immortalité répliquative, la cellule tumorale développe une résistance à l'apoptose et à la sénescence (13). La cellule saine possède un nombre de divisions limité à cause du raccourcissement des télomères qui protègent l'extrémité de ses chromosomes (21). La télomérase, produite habituellement par les cellules souches, est activée dans 90 % des cancers du sein et catalyse l'allongement des télomères permettant d'éviter la sénescence (22). De plus, la prolifération excessive de la cellule tumorale induit des bris à l'ADN et à la structure globale des chromosomes qui sont détectés par des senseurs intracellulaires activant des mécanismes de réparation ou l'apoptose lors de dommages irrémédiables. La mutation de gènes impliqués dans la réparation des cassures de l'ADN comme ceux associés au cancer du sein 1 et 2 (*BRCA1/2*) ou la protéine TP53 empêchent la réparation efficace de l'ADN et l'activation des caspases induisant l'apoptose respectivement, ce qui permet à la cellule tumorale de progresser sans être freinée par une régulation intrinsèque (23-25).

### *Invasion tissulaire et métastase*

D'autres modifications génétiques sont indispensables à l'établissement d'un carcinome infiltrant le tissu mammaire, puis sa dispersion sous forme de métastases. Pour l'invasion du tissu, la cellule épithéliale cancéreuse subit une transformation épithélio-mésenchymateuse (TEM) conduisant à la perte des interactions cellule-cellule avec l'épithélium et favorisant sa mobilité (26). Par exemple, la surexpression du facteur de transcription Snail (*zinc finger protein SNAI1*) et la méthylation du promoteur du gène *CDH1* inhibent la E-cadhérine impliquée dans la formation des jonctions adhérentes entre cellules voisines (27). La cellule cancéreuse peut aussi produire des métalloprotéinases matricielles (*matrix metalloproteinases*, MMP) qui vont dégrader la lame basale de l'épithélium et la matrice extracellulaire (*extracellular matrix*, ECM) facilitant l'invasion du stroma (28, 29). Pour poursuivre la tumorigenèse, les cellules cancéreuses requièrent une quantité importante de nutriments. Elles peuvent surexprimer le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) ainsi que d'autres molécules proangiogéniques telles les facteurs de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor*, FGF) (30) afin d'induire le développement de nouveaux vaisseaux sanguins par le processus d'angiogenèse (31). La nouvelle vasculature permet aux cellules tumorales de quitter la tumeur

et de migrer à travers le corps vers d'autres tissus, favorisant ainsi l'établissement d'un cancer métastatique associé à un mauvais pronostic (32).

#### FACTEURS DE RISQUE

L'étude des facteurs de risque extrinsèques menant à l'instabilité génétique est d'un grand intérêt afin de mieux comprendre l'origine et le développement du cancer du sein. L'étiologie et la progression du cancer du sein restent une préoccupation, car notre compréhension de ces concepts est incomplète. Les facteurs de risque exogènes ou endogènes reconnus jusqu'à présent sont associés à la survenue de moins de 30 % des nouveaux cas de cancers mammaires (33, 34). Il est essentiel d'identifier les causes précises de la progression de cancer afin de développer des traitements préventifs et thérapeutiques ou de découvrir de nouveaux biomarqueurs prédictifs.

#### *Facteurs endogènes*

La prédisposition génétique participe de façon significative à l'incidence, puisque 10 % des cancers du sein sont générés par la transmission héréditaire d'une mutation (Ex : *BRCA1/2*) (35). Ainsi, une femme dont la mère ou la sœur a reçu un diagnostic de cancer du sein est 1.75 fois plus à risque qu'une femme sans historique familial (35). Une variabilité interindividuelle dans la concentration des hormones sexuelles féminines, particulièrement les estrogènes, est aussi liée au risque d'avoir cette maladie (36). Des facteurs reproducteurs tels que la ménarche à un jeune âge (12 ans), la ménopause tardive (55 ans), la nulliparité ou une première grossesse tardive peuvent influencer l'oncogenèse (33). De plus, le risque de développer un cancer du sein dépend fortement de l'âge, avec moins de 25 cas par 100 000 chez les femmes de moins de 30 ans et ce nombre augmentant jusqu'à 500 cas par 100 000 chez des femmes de 70 ans (2). Enfin, l'inflammation est un facteur de risque endogène partagé par plusieurs types de cancers, dont le cancer du sein, puisqu'elle favorise l'instabilité génétique lorsqu'elle persiste de façon chronique (37, 38).

#### *Facteurs exogènes*

Les études observationnelles ont montré une augmentation de l'incidence du cancer du sein parmi les populations qui migrent vers les pays développés en provenance de pays à faible risque (39, 40), suggérant l'apport important de facteurs exogènes (environnementaux) dans ce

cancer. Les habitudes de vie et le régime alimentaire, notamment la consommation excessive de substances cancérigènes comme l'alcool et la cigarette, mènent à un risque accru de développer la maladie (41, 42). Par ailleurs, un indice de masse corporelle (IMC) élevé, l'obésité et un gain de poids corporel sont des variables qui augmentent les risques de cancer du sein (43, 44). Les facteurs de risque exogènes peuvent influencer directement l'accumulation de mutations. Par exemple, l'exposition à des radiations comme les rayons X, ultraviolets (UV) ou ionisants entraîne des atteintes directes à l'ADN (45). Toutefois, l'effet de certains facteurs exogènes nécessite une interaction avec les facteurs endogènes, comme c'est le cas pour l'obésité ou la diète qui jouent un rôle dans l'apparition de l'inflammation chronique (46).

#### IMPLICATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

Lorsque la cellule anormale parvient à contourner les mécanismes de défense intrinsèque, l'homéostasie tissulaire est maintenue grâce à l'implication du système immunitaire qui permet d'empêcher l'établissement de la tumeur et la propagation en métastases. Des études effectuées dans des modèles murins déficients en certaines fonctions immunitaires innées et adaptatives ont démontré le rôle essentiel de la réponse immunitaire dans le contrôle de la croissance tumorale (47-50). Par exemple, les souris *Rag2*<sup>-/-</sup> qui sont marquées par une absence de lymphocytes T, B et T *Natural Killer* (NK) développent spontanément des cancers (15).

Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer le contrôle par la réponse immunitaire : l'élimination des virus induisant la transformation cellulaire, l'élimination des pathogènes favorisant une inflammation protumorale et l'élimination directe des cellules cancéreuses (15). Le dernier mécanisme, connu sous le nom d'immunosurveillance, est un processus par lequel le système immunitaire patrouille continuellement les tissus à la recherche de cellules précancéreuses à éliminer. Malgré la présence d'un système de surveillance fonctionnel, des cellules tumorales peuvent tout de même être immunosélectionnées pour obtenir la capacité d'échapper à l'immunosurveillance (48). L'immunoédition est le concept qui explique cette apparition d'une cellule cancéreuse résistante malgré la pression constante exercée par l'immunité et qui comporte 3 phases (résumées à la **Figure 3**) : l'élimination, l'équilibre et l'évasion.

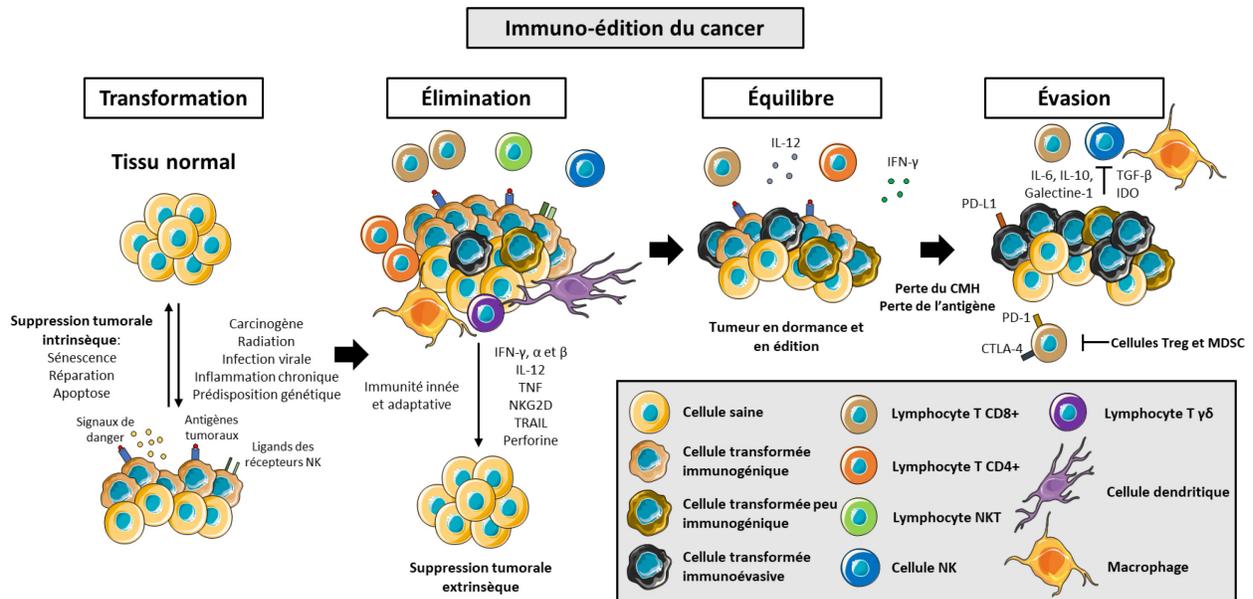
### *Phase d'élimination*

Durant cette phase, la réponse immunitaire antitumorale est activée afin de reconnaître et détruire la tumeur émergente par le processus d'immunosurveillance. Initialement, l'activation de cette réponse dépend de la formation de la tumeur dans le tissu qui induit des dommages aux cellules menant à la production de molécules pro-inflammatoires et au recrutement de cellules immunitaires innées (51). Les cellules tumorales ont à leur surface des motifs cellulaires associés aux dégâts (*damage-associated molecular patterns, DAMP*) dont l'expression est stimulée par le microenvironnement inflammatoire et les dommages à l'ADN lors de la transformation maligne (52). Les DAMP et d'autres signaux de danger vont permettre aux cellules immunitaires recrutées dans le tissu (cellules NK et NKT, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et les macrophages) de reconnaître et d'interagir avec les cellules cancéreuses. Par exemple, la liaison du récepteur NKG2D des cellules NK et T  $\gamma\delta$  aux molécules de danger MIC A et B sur la surface des cellules cancéreuses mène à leur élimination via la sécrétion de molécules lytiques (Ex : perforine) (53). L'activation des cellules NK entraîne aussi la production d'IFN- $\gamma$  ayant des effets antiprolifératifs, pro-apoptotiques et angiostatiques ce qui limite la croissance tumorale (51). D'autres molécules avec une activité antitumorale sont utilisées par l'immunité innée pour l'élimination de la tumeur, incluant le système Fas/Fas ligand, la molécule TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) et la production du facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$* ) (54). Ensuite, les cellules dendritiques (*dendritic cells, DC*) activées dans le tissu mammaire vont se rendre aux ganglions lymphatiques (*lymph node, LN*) pour présenter aux cellules de l'immunité adaptative les antigènes tumoraux (AT) relâchés par les cellules cancéreuses éliminées (55). Les cellules activées de l'immunité adaptative vont migrer vers la tumeur afin de compléter son élimination. Un acteur majeur de l'immunité adaptative est le lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxique (CTL) qui mène à l'apoptose des cellules cancéreuses de manière dépendante de la perforine lorsqu'il les reconnaît par leur présentation d'AT sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. En général, cette phase s'achève par la disparition de la tumeur et un retour à l'état normal du tissu.

### *Phases d'équilibre et d'évasion*

Il peut se produire une immunosélection de clones tumoraux moins immunogéniques lors de la phase d'élimination. Ils vont évoluer pour acquérir graduellement des traits génétiques qui leur confèrent une meilleure résistance face aux cellules immunitaires (16). Ils vont ainsi être préférentiellement conservés comparativement aux cellules tumorales moins adaptées (48). Les cellules cancéreuses survivantes et le système immunitaire vont entrer progressivement dans la phase d'équilibre, où la réponse immunitaire antitumorale peut circonscrire leur progression et expansion sans toutefois pouvoir les éradiquer pour retrouver l'homéostasie tissulaire (51).

Les cellules cancéreuses peuvent empêcher leur élimination par le système immunitaire grâce à l'aide de mécanismes directs ou indirects. Les cellules cancéreuses peuvent augmenter l'expression de récepteurs de surface inhibant directement l'activité des cellules immunitaires. Ainsi, sur certaines cellules cancéreuses, il y a une surexpression des « *immune checkpoints* » tels que le PD-L1 (*program death-ligand 1*), le CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) et d'autres molécules inhibitrices menant à une absence de réponse de la part des lymphocytes T (56, 57). L'expression de certaines molécules de surface peut aussi être réduite ou totalement perdue comme le CMH de classe I, diminuant leur reconnaissance par le système immunitaire (58). Elles vont transformer le microenvironnement tumoral pour le rendre immunosuppresseur de façon indirecte en sécrétant des molécules qui suppriment la maturation et la fonction des cellules immunitaires telles que le VEGF, l'interleukine (IL)-10, le facteur de croissance transformant (TGF- $\beta$ ) ou l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (59) (56). La sécrétion de ces molécules va soutenir le recrutement et la formation de types cellulaires régulant négativement la réponse immunitaire dont les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) (60, 61). Éventuellement, les clones tumoraux réussissent à échapper complètement à la réponse immunitaire antitumorale et entrent dans une phase d'évasion. À ce stade, la tumeur devient cliniquement détectable et peut se répandre à d'autres organes et tissus du corps.



**Figure 3. – Les 3 phases de l’immunoédition du cancer: l’élimination, l’équilibre et l’évasion. (adapté de (62))**

Après la transformation par le contournement des mécanismes de suppression intrinsèque, la cellule transformée entre en prolifération massive et forme la tumeur. La phase d’élimination implique le recrutement de l’immunité innée et adaptative au sein de la tumeur. À ce stade, elle peut être éliminée par une réponse immunitaire antitumorale efficace, ou au contraire, progresser pour entrer en phase d’équilibre. Ainsi, l’élimination des cellules tumorales est contrebalancée par la production constante de nouvelles cellules malignes. La phase d’équilibre est caractérisée par l’évolution et la sélection de cellules transformées peu immunogéniques. Celles-ci vont acquérir une résistance à l’élimination par la réponse immunitaire ce qui va leur permettre d’entrer dans la phase d’évasion afin de se propager dans le tissu et le reste du corps.

## Présentation clinique

### SOUS-TYPES MORPHOLOGIQUES ET MOLÉCULAIRES

Puisque le développement du cancer du sein est supporté par des altérations génétiques très diversifiées, le cancer du sein est plutôt un ensemble de maladies hétérogènes que l’on classifie en différents sous-types histologiques et moléculaires. En effet, il se présente sous plusieurs morphologies histopathologiques. Dans la grande majorité des cas (98.3 %), il va être amorcé dans les cellules de l’épithélium glandulaire, et sera donc défini comme un carcinome ou un adénocarcinome mammaire (63). Dans de rares cas (0.4 %), il peut avoir son origine dans les cellules non épithéliales du tissu conjonctif mammaire, désigné principalement comme un

sarcome du sein (63). Le carcinome mammaire est classé en 19 sous-types morphologiques distincts (34). Les deux cancers les plus fréquemment diagnostiqués sont le carcinome canalaire invasif (*invasive ductal carcinoma*, IDC; 70-75 %) qui provient des cellules tapissant le canal lactifère (ou galactophore) et le carcinome lobulaire invasif (*invasive lobular carcinoma*, ILC; 5-15 %) qui est plutôt formé par les cellules glandulaires productrices du lait maternel dans les lobules (34, 64). Ils sont définis comme invasif puisqu'ils ont infiltré le stroma adjacent en contournant les contrôles génétique et immunitaire décrits précédemment (65). Certaines lésions du sein *in situ*, donc confinées dans les canaux (*ductal carcinoma in situ*, DCIS) ou les tubules (*lobular carcinoma in situ*, LCIS), sont aussi classifiées puisqu'elles sont pré-cancéreuses ou un facteur de risque pour le développement du cancer du sein, respectivement (66, 67).

**Tableau 1. – Classification des sous-types moléculaires du cancer du sein.**

| Sous-type moléculaire            | Récepteurs d'estrogènes | Récepteur de progestérone | HER2 | Ki-67 > 15 % ou grade III |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|------|---------------------------|
| Luminal A                        | +                       | +/-                       | -    | -                         |
| Luminal B-like-HER2 <sup>-</sup> | +                       | +/-                       | -    | +                         |
| Luminal B-like-HER2 <sup>+</sup> | +                       | +/-                       | +    | +/-                       |
| HER2 <sup>+</sup> (non-luminal)  | -                       | -                         | +    | +/-                       |
| Triple-négatif                   | -                       | -                         | -    | +/-                       |

L'identification du sous-type moléculaire du cancer du sein est nécessaire puisqu'il sert de facteur prédictif pour le pronostic des patientes, ainsi que leur réponse aux différentes lignes de traitement (34). On distingue 5 sous-types moléculaires intrinsèques selon la classification de St. Gallen 2013 : Luminal A, Luminal B-like-HER2<sup>-</sup> (Luminal B), Luminal B-like-HER2<sup>+</sup> (Luminal HER2<sup>+</sup>), HER2 surexprimé (non-luminal) et triple-négatif (TN) (68). Ils sont caractérisés par l'expression génique ou protéique de biomarqueurs moléculaires : les récepteurs des estrogènes (*estrogen receptor*, ER) et de la progestérone (*progesterone receptor*, PR), le récepteur HER2 et le marqueur de prolifération Ki-67 (Sommaire dans le **Tableau 1**) (34). Les marqueurs protéiques sont évalués

sur des biopsies de tumeurs mammaires par immunohistochimie, mais l'expression peut aussi être confirmée dans le cas du *HER2* par une hybridation *in situ* pour évaluer l'amplification du gène (34). La tumeur est considérée comme positive pour les ER et PR lors d'une expression nucléaire dans plus de 1 % des cellules cancéreuses invasives (34). Les carcinomes mammaires expriment fréquemment (70 % des cas) des ER, et cette expression est en général suivie par celle du PR, les définissant comme des tumeurs de type luminal (69). Parmi les tumeurs lumineales, on distingue les tumeurs lumineales B qui ont une expression élevée de protéines associées à la prolifération, comme le Ki-67 dont le niveau d'expression sert d'index de prolifération (34). La valeur seuil d'expression du Ki-67 pour séparer les tumeurs lumineales A et B varie entre les laboratoires, allant de 14 % à 20 % (34, 68, 70). Les tumeurs lumineales *HER2*<sup>+</sup> sont identifiables par un gène *HER2* surexprimé ( $\geq 6$  copies) ou une expression membranaire du récepteur sur  $>10$  % des cellules cancéreuses, en plus d'être positives pour les récepteurs hormonaux (PR/ER) (34). Finalement, les tumeurs lumineales A sont caractérisées par un faible potentiel de prolifération (index Ki-67 faible) et une expression normale du *HER2*. Le reste des tumeurs non-lumineales est regroupé dans les tumeurs *HER2*<sup>+</sup> (12-21 %) lorsqu'elles ont une amplification du gène *HER2* en absence des récepteurs hormonaux ou dans les tumeurs TN (10-20 %) lorsqu'elles n'expriment aucun des biomarqueurs moléculaires (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup> et *HER2*<sup>-</sup>) (71, 72).

Les sous-types morphologiques et moléculaires sont utilisés, en plus de différents facteurs clinicopathologiques tels que l'atteinte ganglionnaire, la taille de la tumeur, la présence de métastases ainsi que le grade histologique, afin d'établir un diagnostic et stade. Récemment, de nouvelles classifications utilisant plutôt des techniques basées sur l'expression génique telles que les tests PAM50 ou Oncotype DX ont laissé entrevoir une approche plus individualisée pour la prise en charge des patients (73, 74). Les prochaines sections survoleront deux variables clinicopathologiques importantes (le grade et le stade TNM), puis décriront les lignes de traitements utilisées pour traiter le cancer du sein. Pour finir, nous allons faire un retour sur les facteurs pronostiques et prédictifs du cancer du sein afin de mieux comprendre les limites dans l'évaluation du devenir clinique de la patiente et la sélection de son traitement, comme par exemple le manque d'individualisation et de précision du processus.

## GRADE ET TNM

Le grade histologique de Nottingham décrit l'agressivité du carcinome mammaire. Il comprend les grades I à III qui sont caractérisés par trois facteurs observables en microscopie: la différenciation tubulaire/glandulaire, le pléomorphisme nucléaire et l'index mitotique (voir le **Tableau 2** pour la définition des grades) (75). Brièvement, l'ACS décrit le grade comme un outil permettant de déterminer la capacité d'un cancer à croître et se propager par l'observation de l'interaction cellule-cellule dans la tumeur (la formation de structures mammaires), de la morphologie nucléaire et cellulaire (la ressemblance avec la cellule normale) et du nombre de cellules en division (le compte mitotique).

**Tableau 2. – Caractéristiques définissant chaque grade histologique de Nottingham (basée sur (75)).**

| Grade | Différenciation tubulaire/glandulaire          | Pléomorphisme nucléaire                                     | Compte mitotique*                                   |
|-------|--|---|---|
| I     | > 75 % de la tumeur à un aspect glandulaire    | Cellules uniformes, petites et régulières                   | < 9 mitoses pour 10 champs à fort grossissement     |
| II    | 10 à 75 % de la tumeur à un aspect glandulaire | Variabilité modérée dans la taille et la forme des cellules | 10 à 19 mitoses pour 10 champs à fort grossissement |
| III   | > 10 % de la tumeur à un aspect glandulaire    | Variation marquée dans la taille et la forme des cellules   | >20 mitoses pour 10 champs à fort grossissement     |

\*Le compte mitotique dépend du diamètre du champ sur le microscope. Les critères ci-dessus sont basés sur un champ à fort grossissement de 0.274 mm<sup>2</sup>.

La stadification du cancer du sein permet d'évaluer l'étendue du cancer lors du diagnostic (stade clinique) ou à la suite de la chirurgie (stade pathologique). La classification la plus courante pour déterminer le stade du cancer du sein est le système tumeur-ganglion-métastase, ou TNM (*tumor-node-metastasis*), défini par la 8<sup>e</sup> édition de l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Le facteur tumeur (T) comprend les stades T1 à T4 qui sont déterminés par la taille de la tumeur

et la localisation de ses extensions lorsque cela se présente, en plus de comprendre un stade pTis lors d'une absence d'invasion tissulaire par les cellules cancéreuses (carcinome *in situ*). Puis, le facteur ganglion (N) qui va de N0 à N3 en fonction de la présence et du nombre de métastases aux LN régionaux et leur localisation. Enfin, le facteur métastase (M), soit M0 ou M1, qui décrit s'il y a la présence de métastases locales ou distantes. Les critères précis de la stadification du cancer du sein sont revus dans (76). En prenant en considération le résultat de ces 3 facteurs, il est possible d'établir un stade TNM allant de 0 à IV.

#### THÉRAPIE

La thérapie pour la prise en charge du cancer du sein inclut habituellement une chirurgie, et peut parfois être accompagnée d'un traitement systémique ou local, comme la radiothérapie, l'hormonothérapie ou la chimiothérapie, administré avant (néoadjuvante) ou après (adjuvante) l'opération. Le traitement chirurgical permet d'enlever la tumeur et d'exciser les LN régionaux. La chirurgie peut permettre de conserver le sein (mastectomie partielle) en enlevant spécifiquement la tumeur et une partie mineure du tissu sain environnant (marge) ou au contraire, retirer une partie étendue du tissu mammaire lors de la résection de la tumeur (mastectomie totale) (77). Bien que la mastectomie partielle ait été associée antérieurement à un plus haut risque de récurrence, l'utilisation de la radiothérapie adjuvante a permis de le réduire considérablement, égalant celui pour la mastectomie totale, ce qui fait maintenant de la mastectomie partielle l'option privilégiée lors de la chirurgie (34, 78).

Les traitements systémiques et/ou locaux sélectionnés et leur période d'administration dépendent de la présentation clinique, particulièrement du sous-type moléculaire. Ainsi, pour les tumeurs luminales (ER<sup>+</sup>PR<sup>+</sup>), une hormonothérapie pour réduire les récurrences est prescrite suivant la chirurgie. Elle est composée principalement du tamoxifène, un ligand compétitif inhibant les ER, pour les femmes préménopausées ou du tamoxifène et/ou d'un inhibiteur de l'aromatase, l'enzyme qui synthétise les estrogènes, pour les femmes postménopausées (79). Dans les tumeurs luminales HER2<sup>-</sup>, la chimiothérapie est administrée lorsque le risque de récurrence est important, déterminé par l'atteinte ganglionnaire ou des tests comme l'Oncotype DX (34). Elle permet, en entraînant des dommages aux cellules cancéreuses, de limiter la progression de la tumeur et d'en réduire la taille lors d'une utilisation néoadjuvante afin de simplifier la résection (77, 80). Ensuite,

les tumeurs HER2<sup>+</sup> vont être traitées de manière adjuvante et/ou néoadjuvante à l'aide d'une thérapie ciblée pour le récepteur et/ou de la chimiothérapie dépendamment du stade de la tumeur (34). Puis, les cancers TN qui ne présentent aucun des marqueurs permettant une thérapie personnalisée vont être traités à l'aide de la chimiothérapie (81). En supplément à ces traitements, la radiothérapie va être utilisée, comme mentionné plus tôt, afin d'augmenter la survie sans récurrence (*disease-free survival, DFS*) et la survie globale (*overall survival, OS*) lorsque la patiente présente des LN positifs ou qu'elle a eu une mastectomie partielle (34).

De nombreuses lignes de traitements comme l'immunothérapie, la chimiothérapie et les traitements ciblés sont offertes pour limiter la progression tumorale et augmenter la survie des patientes. Le traitement devient palliatif pour réduire les symptômes lors de l'échec des thérapies disponibles.

#### INFILTRATION IMMUNITAIRE

Le carcinome du sein a conventionnellement été considéré comme une tumeur « froide », soit un microenvironnement tumoral avec peu d'infiltration immunitaire, puisqu'il présenterait une infiltration lymphocytaire et un taux de mutations tumorales moins élevés que d'autres types de cancers (82, 83). Cependant, des études récentes dont celle de Gatti-Mays *et al.* sont venues contredire cette idée d'un microenvironnement immunologiquement inactif dans le cancer du sein, en démontrant que différents sous-groupes de patientes ont une infiltration de lymphocytes dans leur tumeur (*tumor-infiltrating lymphocyte, TIL*) (82). La population de TIL dans le cancer du sein inclut des CTL, mais aussi des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et B (84). Lorsqu'elle est présente dans la tumeur, elle est un facteur bénéfique pour le pronostic des cancers TN et HER2 surexprimé et un facteur prédictif d'une réponse pathologique complète à la chimiothérapie néoadjuvante (82, 83). L'abondance des TIL est hétérogène entre les carcinomes mammaires et dépend du sous-type moléculaire, avec une infiltration moindre dans les tumeurs ER et/ou PR positives (85, 86).

L'efficacité de l'immunothérapie, une nouvelle avenue dans le traitement du cancer du sein peut dépendre notamment de l'abondance des TIL, en particulier les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (87). Or, malgré la présence de TIL à réactiver dans certaines tumeurs mammaires, la réponse aux immunothérapies inhibant les points de contrôle immunitaire tels que l'anti-CTLA4, l'anti-PD-1 et l'anti-PD-L1 restent variables, même parmi les patientes avec le même sous-type

de cancer (88, 89). L'infiltration de cellules immunitaires régulant négativement la réponse des TIL dans la tumeur comme les Treg, les macrophages associés à la tumeur (tumor-associated macrophage, TAM) de type 2 et les MDSC est associée à un mauvais pronostic et pourrait expliquer la résistance à cette thérapie (90, 91). Leur présence engendre un microenvironnement tumoral immunosuppresseur par la production de molécules telles que l'IDO, l'IL10 et le TGF- $\beta$  ce qui inhibent l'activité des lymphocytes T tuant les cellules cancéreuses (82, 92). De plus, Li *et al.* ont démontré que l'infiltration des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans l'agrégat tumoral est limitée dans les patientes avec un cancer du sein TN, cette population se retrouvant surtout en périphérie de la tumeur (stroma) (93). Ainsi, la localisation des TIL au sein du microenvironnement tumoral est devenu un facteur à prendre en considération pour l'évaluation de la thérapie à administrer aux patientes et leur pronostic (94).

Considérant l'importance du recrutement et de l'activation des TIL pour la réponse au traitement et le devenir clinique des patientes atteintes du cancer du sein, il est primordial de découvrir des techniques pour rendre le microenvironnement tumoral favorable à leur infiltration et stimulation. Pour ce faire, il faudrait toutefois avoir une meilleure connaissance des différents paramètres ayant une importance pour l'infiltration immunitaire dans l'agrégat tumoral. Dans l'étude de Grusso *et al.*, les cancers du sein TN ayant un microenvironnement tumoral pro-inflammatoire caractérisé par l'expression de l'IFN de type I et la présence de macrophages pro-inflammatoires (TAM1) avait une infiltration de CTL et un bon pronostic (94). Récemment, il a été proposé de modifier l'environnement immunosuppresseur de la tumeur par l'activation des DC immunostimulantes et la diminution de la sécrétion des molécules inhibitrices par les Treg, les MDSC et les TAM2 (82). L'activation de récepteurs innés qui reconnaissent les micro-organismes comme les récepteurs de type Toll (*Toll-like receptor*, TLR), RIG (*RIG-like receptor*, RLR) et Stimulateur des Gènes de l'Interféron (*Stimulator of Interferon Genes*, STING) a été considérée comme option pour convertir le microenvironnement tumoral immunosuppresseur (82). Comme il sera discuté à la section **Bienfaits du microbiote pour la santé (page 44)**, la présence de bactéries intratumorales pourrait avoir une influence sur l'inflammation en agissant sur certains de ces récepteurs innés et donc, sur l'activation et le recrutement immunitaire, mais cela reste à déterminer.

## FACTEURS PRONOSTIQUES ET PRÉDICTIFS

L'évaluation des facteurs énoncés plus haut donne la possibilité d'estimer la survie des patients (facteur pronostique) et le traitement à suivre (facteur prédictif). La classification du cancer du sein selon le sous-type moléculaire est primordiale pour la prise de décision quant à la ligne de traitement à recommander. De plus, d'un point de vue du pronostic, une tumeur luminale va généralement être associée à une meilleure survie à 5 ans (80 à 85 %) comparativement à la tumeur non-luminale (50 à 60 %) qui est plus difficilement traitable (68). Ainsi, l'expression des ER, du PR et de HER2 sert de facteur prédictif et pronostique du cancer du sein. Le grade histologique et le stade TNM servent aussi de facteur pronostique puisque le risque de décès augmente grandement lorsque leur score est avancé (95). Les facteurs pronostiques sont d'une grande importance puisqu'ils permettent d'identifier les patients qui sont les plus à risque d'avoir des complications en lien avec la maladie (récidive, décès) et d'introduire rapidement une thérapie agressive afin d'éviter celles-ci. Le potentiel pronostique et prédictif des facteurs déjà identifiés pour le cancer du sein reste limité à cause de l'hétérogénéité de la maladie et de leur manque de précision (96, 97). Des progrès doivent être accomplis afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs qui permettent de mieux individualiser le diagnostic et de mieux prévoir la récurrence métastatique qui est la principale cause de décès par cancer du sein (95).

## **La communauté microbienne de l'être humain**

### **Description générale du microbiote**

#### L'ARNR 16S ET SON IMPLICATION DANS L'ÉTUDE DU MICROBIOTE

Dans le projet, les techniques utilisées ont été développées pour l'étude du microbiote bactérien humain et tentent principalement de répondre à ces questions : « Quelle est la quantité de bactéries résidant au niveau d'un site particulier du corps? », « Quelle est l'identité des bactéries qui y sont présentes? » et « Quels sont leurs rôles dans le corps humain? ». Les gènes codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S de la petite sous-unité ribosomique (30S) des procaryotes sont la référence moléculaire pour la quantification et la classification taxonomique du microbiote bactérien humain. Bien que les ribosomes soient aussi présents dans les cellules eucaryotes, les séquences génétiques codant la petite sous-unité ribosomique eucaryote (40S)

ainsi que l'ARN qu'elle utilise (18S) se distinguent de celles des procaryotes, permettant donc de cibler spécifiquement les bactéries lors de l'analyse des gènes de l'ARNr 16S dans des échantillons contenant de l'ADN humain et bactérien (98, 99). De plus, la structure des gènes de l'ARNr 16S est formée de régions hypervariables (V1-V9) entre les espèces bactériennes, encadrées de régions conservées lors de leur évolution (100). Les régions conservées permettent le développement d'amorces à la base de la technique de réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*, PCR) afin de générer des amplicons d'une région qui pourront être quantifiés (qPCR) (101) pour estimer l'abondance des bactéries. Les régions hypervariables permettent la différenciation et l'identification des espèces bactériennes (102). Les technologies de séquençage de nouvelle génération (*next-generation sequencing*, NSG) comme Illumina, Nanopore ou PacBio servent à séquencer une ou plusieurs régions V ciblées. L'identité de chaque séquence d'ADN obtenue dans l'échantillon peut être déterminée en la comparant à de vastes banques de données, telles que SILVA, *Greengenes* ou RDP, qui associent des séquences du gène de l'ARNr 16S à des espèces bactériennes spécifiques (103-105).

Ces techniques d'analyse permettent d'obtenir plusieurs informations sur le microbiote présent au niveau d'un site du corps en particulier. Non seulement il est possible de déterminer la quantité et l'identité des bactéries, mais les analyses statistiques peuvent également estimer d'autres paramètres tels que la diversité du microbiote au sein d'un écosystème (diversité  $\alpha$ ), ainsi que sa variation entre différents contextes (diversité  $\beta$ ) (Ex : avant et après la prise d'antibiotiques) (106). La diversité qui représente la variété des organismes dans un écosystème est évaluée par le nombre d'espèces différentes (richesse spécifique) et l'abondance relative de chaque espèce (équitabilité spécifique) (107, 108). L'amélioration ainsi que la diminution des coûts des technologies pour l'analyse du microbiome, en plus des découvertes quant à son rôle dans la santé humaine, décrit dans les paragraphes qui suivent, en font une avenue thérapeutique prometteuse et émergente pour le contrôle de différentes maladies.

#### COMPOSITION ET LOCALISATION

Ces dernières années, l'intérêt porté envers le microbiote n'a cessé de se développer avec la découverte de l'impact de ces microorganismes symbiotiques, commensaux ou pathogènes sur la santé humaine (109). D'ailleurs, des projets de recherche de haute envergure, dont le *Human*

*Microbiome Project* (HMP), ont été initiés afin d'identifier et de caractériser les microorganismes qui colonisent l'humain, incluant des virus, des bactéries, des archées, des champignons et des protistes, et d'évaluer leurs effets sur le développement de maladies, mais aussi chez les individus sains (110, 111). Les prochains paragraphes résumeront les avancées récentes quant à la localisation de la population bactérienne chez l'Homme et de la composition de certains microbiotes d'intérêt. Puis, la notion de « dysbiose », ou un débalancement du microbiote normal à un site corporel, et son impact seront introduits.

Le microbiote entier du corps humain est généralement estimé à plus de 100 trillions ( $10^{14}$ ) de cellules bactériennes, soit environ 10 fois plus que le nombre de cellules humaines. Récemment, certains auteurs ont plutôt proposé un ratio 1:1 entre les bactéries et les cellules humaines (environ  $3 \times 10^{13}$  cellules humaines et bactériennes pour un humain de 70 kg) (112). Néanmoins, le nombre de bactéries qui compose le corps humain reste considérable. Le nombre de genres bactériens retrouvé sur le corps humain serait présentement évalué à plus de 5000 (113). Cependant, ce nombre sous-estime probablement la diversité bactérienne réelle puisque le microbiote de certains sites corporels est très peu caractérisé. Des populations bactériennes variées se sont établies sur des surfaces du corps qui sont exposées à l'environnement extérieur, telles que les constituants du tractus gastro-intestinal (intestin), des appareils respiratoire (cavité orale et poumons), urinaire (urètre) et reproducteur (vagin) et de la peau et d'autres muqueuses. Le tractus gastro-intestinal est considéré comme l'emplacement du corps humain ayant le microbiote le plus important et le plus diversifié (entre 1183 à 3108 genres) (113), ce qui en fait le microbiote le plus caractérisé pour son impact sur la santé humaine (114).

Jusqu'à récemment, le dogme en microbiologie était que le microbiote humain serait limité à certains sites corporels, les tissus profonds étant dépourvus de tout microorganisme et donc, complètement stériles (115-117). Ainsi, pour un individu sain, une détection bactérienne dans des tissus internes comme le tissu mammaire ou les liquides biologiques tels que le sang était liée à une condition médicale particulière, telle une infection. Cependant, l'avancement des techniques de détection et d'identification bactériennes par des méthodes indépendantes de la culturomique a permis de détecter la présence de bactéries dans plusieurs tissus humains (voir le HMP (111)) et dans le sang (118), même chez les individus sains. Par conséquent, les évidences

expérimentales semblent contredire le dogme initial et suggèrent que la localisation des communautés bactériennes dans le corps humain est beaucoup plus étendue que préalablement proposé.

Récemment, Urbaniak *et al.* ont utilisé le NSG et les cultures microbiennes pour démontrer l'établissement d'une population bactérienne viable dans le tissu mammaire, formant une communauté diversifiée et unique (119). De plus, ils ont comparé leurs résultats obtenus dans deux régions géographiques distinctes, le Canada et l'Irlande, pour montrer que le microbiote mammaire a une composition stable et établie, malgré les variations pouvant être introduites par la localisation des cohortes. Bien que l'origine de ces bactéries soit toujours méconnue, le sein partage une signature bactérienne similaire avec le microbiote intestinal et le microbiote du lait maternel (106, 120). D'ailleurs, les souches bactériennes lactiques *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* et *Pediococcus pentosaceus* ont été retrouvées dans les selles de la mère, le lait maternel et les selles de l'enfant (121). Ces résultats proposent une interrelation entre l'intestin, le sein et le lait maternel afin de permettre une transmission verticale de certaines bactéries bénéfiques entre la mère et l'enfant. Un des processus qui pourrait expliquer la colonisation du tissu mammaire en provenance du microbiote intestinal (voie « entéro-mammaire »), mais aussi de plusieurs autres régions corporelles (cavité orale, vagin, peau, voies respiratoires) est la translocation bactérienne à travers différents épithélia et muqueuses qui permettrait aux bactéries d'entrer dans la circulation sanguine, possiblement à l'aide de cellules immunitaires, et de migrer jusqu'au sein (122, 123). Une autre hypothèse est leur déplacement par les canaux galactophores (« transfert rétrograde ») en provenance de la peau ou de la bouche de l'enfant (117, 124). En effet, le liquide mammaire collecté par aspiration (*nipple aspirate fluid*, NAF) et le lait maternel présentent une population bactérienne, même lorsque la papille mammaire est désinfectée, suggérant une présence microbienne le long des canaux galactophores (125, 126). Les études qui seront présentées par la suite ont été réalisées pour la plupart sur le microbiote intestinal, mais des processus similaires pourraient se produire dans le tissu mammaire s'il partage certaines espèces bénéfiques ou nuisibles.

## LA DYSBIOSE

La composition bactérienne du microbiote humain démontre une variabilité interindividuelle et intraindividuelle. Plusieurs facteurs endogènes ou exogènes divers tels que le mode de vie, la diète, l'environnement, l'âge et le fonds génétique peuvent expliquer les différentes espèces identifiées dans les individus (127). Il a été démontré que la région géographique où habite un individu peut être un facteur déterminant dans la composition de sa communauté bactérienne (128). Les diètes différentes sont souvent présentées comme une explication pour la diversité du microbiote intestinal entre les pays/continents. L'alimentation peut en effet avoir une influence importante sur le microbiote comme le démontrent les études comparant la diète occidentale riche en protéines animales à une diète rurale africaine riche en fibres (129) ou à la diète méditerranéenne, constituée de céréales, de fruits et de légumes (130). D'ailleurs, une signature bactérienne enrichie en firmicutes, au dépend des bactéroïdètes, peut être observée dans le microbiote des souris obèses comparativement aux souris minces (131).

Malgré cette diversité inter- et intraindividuelle, le microbiote humain pourrait être formé en partie d'une communauté bactérienne partagée parmi les individus (*core microbiota*), bien que ce concept soit encore peu documenté et contredit (132, 133). À tout le moins, un individu pourrait posséder un microbiote relativement stable dans le temps une fois que celui-ci s'est installé après la naissance (eubiose), ce qui lui conférerait des bénéfices pour sa santé (134, 135). Ce microbiote qui est en équilibre homéostatique avec un hôte en bonne santé peut être déséquilibré par la modification de la population bactérienne normale, en composition ou en quantité, engendrant un état de dysbiose. La dysbiose se traduit généralement par une augmentation des bactéries nuisibles au détriment des bactéries bénéfiques et d'une perte de la diversité microbienne (136). Dans certains contextes, les facteurs mentionnés précédemment, soit la diète, le mode de vie et les gènes peuvent mener à la dysbiose (136). Le stress physiologique est aussi un facteur non négligeable dans le débalancement de la flore normale (137). L'étude du microbiote intestinal de macaques récemment éloignés de leur mère a permis d'observer une variation de plusieurs jours dans la signature bactérienne intestinale, à la suite du stress de séparation, avant qu'elle ne revienne à la normale (138). Par la suite, la prise de médicaments, notamment les antibiotiques mais aussi les traitements systémiques contre le

cancer, peut altérer de façon drastique la composition du microbiote. L'analyse du microbiote intestinal à la suite de l'administration d'un antibiotique à large spectre, la ciprofloxacine, a montré une diminution de l'abondance de 30 % des taxa bactériens, induisant une perte de l'uniformité, de la diversité et de la richesse dans la population bactérienne (139). Le microbiote peut prendre plusieurs semaines avant de revenir à son état initial après cette perturbation. Or, suivant la prise répétée d'antibiotiques, la signature bactérienne observée peut ne plus être identique à ce qu'elle était avant, du fait de changements permanents à sa composition (140). De plus, il a été démontré que le traitement d'enfants souffrant de leucémie aigüe lymphoblastique à l'aide de doses élevées de méthotrexate, un agent chimiothérapeutique, menait à une diminution de 29.6 % de la charge bactérienne dans leurs fèces (141). Enfin, l'intégrité de la flore microbienne du corps humain est essentielle afin de préserver une bonne santé. D'ailleurs, les bienfaits du microbiote normal pour l'hôte seront décrits dans la section suivante, tandis que les pathologies causées par la dysbiose ou associées à celle-ci seront revues dans la section **Rôle dans la pathogenèse (page 47)**.

#### BIENFAITS DU MICROBIOTE POUR LA SANTÉ

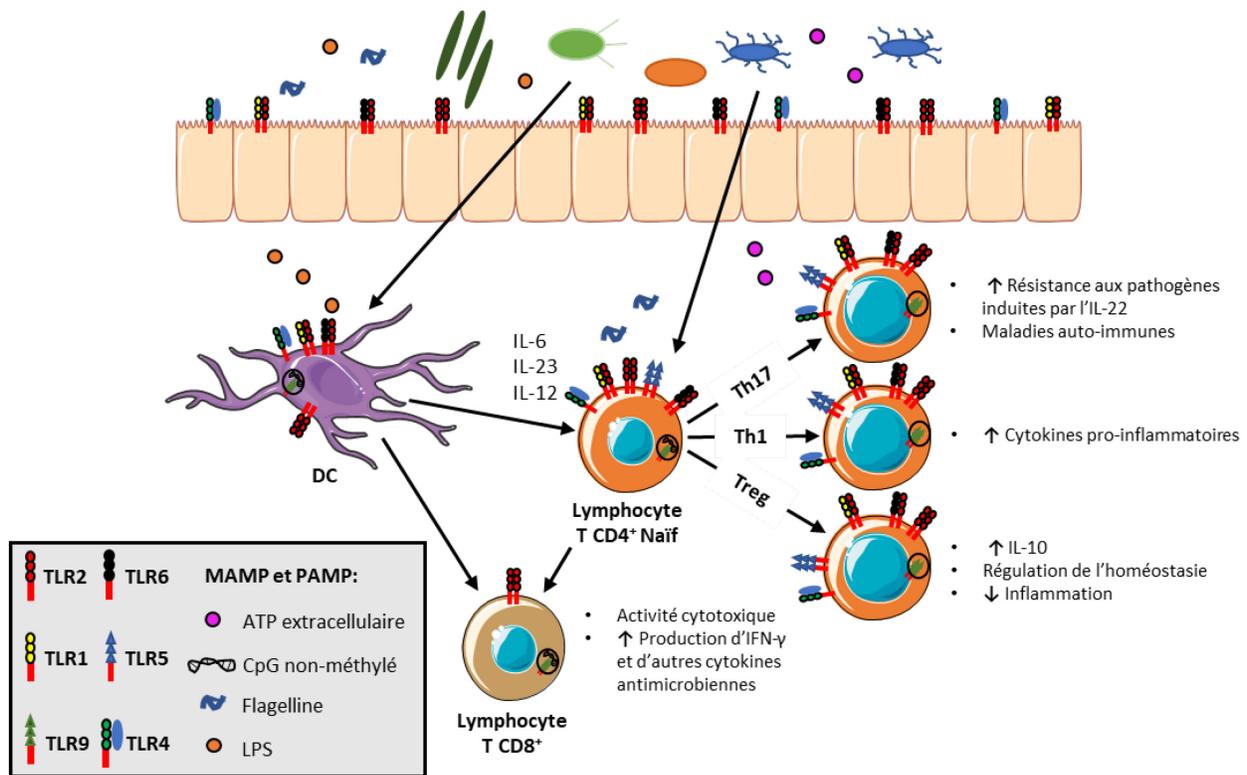
Lorsque le microbiote est en eubiose, certaines bactéries commensales et symbiotiques amènent plusieurs bénéfices à l'hôte grâce à leur influence sur des processus immunitaires et métaboliques et sur la présence de pathogènes. Tout d'abord, la présence d'un microbiote en santé permet de réduire l'occurrence des infections qui pourrait mener à une pathologie (voir section **Rôle dans la pathogenèse (page 47)**). En effet, les bactéries commensales du microbiote sont considérées comme la première ligne de défense de l'organisme contre les bactéries pathogènes. Un mécanisme expliquant cette relation entre les bactéries commensales et les bactéries pathogènes est la compétition pour l'espace dans une niche écologique, soit un site particulier du corps humain, ainsi que pour les mêmes éléments nutritifs (142). Des évidences expérimentales montrent par exemple que les bactéries du microbiote intestinal sont en compétition constante pour le fer, une ressource cruciale pour leur survie et leur croissance (143-145). Une administration orale répétée de cet élément peut réduire la compétition et favoriser l'expansion de populations bactériennes potentiellement pathogènes telles que *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* et *Citrobacter* (146). Les bactéries commensales du microbiote peuvent

aussi produire des molécules tuant les bactéries compétitrices (bactériocines) ou des acides gras à chaîne courte (*short chain fatty acids*, SCFA) engendrant un environnement avec un pH bas antimicrobien (142).

Le microbiote fait partie intégrante de notre métabolisme, augmentant notre apport nutritif par la production de différents métabolites (147). Les bactéries commensales de l'être humain génèrent des métabolites absorbables par la transformation des nutriments non digestibles qui composent notre diète. Les carbohydrates formant l'amidon et les fibres sont fermentés par les bactéries afin de former des SCFA, particulièrement du propionate, de l'acétate et du butyrate. L'acétate est impliqué dans le métabolisme du cholestérol et la lipogenèse, tandis que le propionate est utilisé pour la gluconéogenèse (148). Le butyrate prend part à des processus physiologiques beaucoup plus étendus, ayant entre autres été associé à des processus antitumoral, anti-inflammatoire et métabolique (149). De plus, les bactéries intestinales possèdent des mécanismes de biosynthèse de vitamines, contrairement à l'être humain, ce qui leur permet de générer de la biotine, de la cobalamine, du folate, de la niacine, du pantothénate, de la pyridoxine, de la riboflavine et de la thiamine (150, 151). Il a été démontré que la production par le microbiote de quatre de ces vitamines B contribue au quart de l'apport quotidien de l'hôte (150).

Pour terminer, l'immunité innée et l'immunité adaptative ont une interaction continue avec le microbiote humain, à un point où ce dernier joue un rôle important dans le développement et le façonnage des réponses immunitaires. Il a d'ailleurs été démontré par l'utilisation de modèles murins dépourvus de microorganismes (*germ-free*, GF) que le microbiote est essentiel afin de stimuler le système immunitaire. Les animaux GF présentent des organes lymphoïdes secondaires, soit des tissus lymphoïdes associés au tube digestif, des plaques de Peyer et des LN mésentériques moins développés en taille, en nombre et/ou en composition comparativement aux animaux avec un microbiote (152, 153). Les modèles GF ou traités par des antibiotiques montrent aussi fréquemment une diminution du nombre et/ou de la fonction de certaines populations cellulaires myéloïdes (macrophage, monocyte, granulocyte et DC) et lymphoïdes (NK et lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> et B) (154).

Lorsque le microbiote est présent, le corps utilise plusieurs stratégies défensives afin de contenir et vivre en équilibre avec la population bactérienne. Certaines cellules immunitaires possèdent des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux microbes (*pattern recognition receptor*, PRR), dont les récepteurs de type Toll (*toll-like receptor*, TLR), qui leur permettent d'interagir avec les microorganismes. Les TLR reconnaissent différents motifs moléculaires associés aux microbes et aux pathogènes (*pathogen- and microbe-associated molecular pattern*, PAMP et MAMP) comme les lipopolysaccharides (LPS) et le peptidoglycane (PGLY) retrouvés dans la paroi des bactéries Gram négatif ou de toutes les bactéries, respectivement (d'autres MAMP et PAMP et leur effet sur la réponse immunitaire sont illustrés à la **Figure 4**) (155). L'activation de ces récepteurs participe entre autres à la maturation des DC et leur migration aux LN pour activer et recruter les cellules de l'immunité adaptative au site initial (156). Puis, la signalisation des TLR par la molécule pour la réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (*myeloid differentiation primary response 88*, MyD88) induit la sécrétion de cytokines et de chimiokines. Il a été démontré que l'activation du TLR5 sur les DC de la *lamina propria* de l'intestin permet de favoriser la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en Th1 et Th17 et la production d'immunoglobuline (Ig)-A par les lymphocytes B (157). L'administration d'antibiotiques aux animaux induit fréquemment une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17 et l'IL-22 (154). Des cellules non immunitaires peuvent également exprimer des PRR et avoir un impact sur l'environnement immunitaire, comme c'est le cas pour les cellules épithéliales intestinales qui produisent de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  à la suite de l'activation de leur TLR4 (158). L'activation des différents types de TLR permet à la fois d'avoir une réponse immunitaire efficace par la formation d'un environnement pro-inflammatoire, tout en contrôlant cette inflammation pour préserver une interaction homéostatique avec le microbiote. Cet équilibre est notamment préservé par la génération de Treg et leur sécrétion d'une cytokine immunosuppressive, l'IL-10, grâce au butyrate (SCFA) produit par les bactéries ou par la signalisation du TLR2/TLR1 (159, 160). Ainsi, les connaissances actuelles sur le microbiote suggèrent qu'il exerce un rôle de premier plan dans la formation et la préservation d'un système immunitaire fonctionnel et compétent.



**Figure 4. – La modulation de l'immunité adaptative par le microbiote intestinal (Modifié de (159)).**

L'activation des TLR à la surface membranaire des cellules immunitaires innées et adaptatives, suivant leur interaction avec des composants microbiens (MAMP), permet d'activer les T CD8<sup>+</sup> et de différencier les T CD4<sup>+</sup> en Th1, Th17 et Treg. Les T CD4<sup>+</sup> Th1 et Th17 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, tandis que les Treg diminuent l'inflammation et préservent l'homéostasie.

#### RÔLE DANS LA PATHOGENÈSE

L'état du microbiote, en composition et/ou en nombre, est considéré comme un facteur de risque dans plusieurs maladies humaines. Les premières évidences d'un effet néfaste de certaines bactéries sur notre santé remontent aux expériences du récipiendaire du prix Nobel de physiologie ou de médecine en 2005, le Dr Marshall, qui portait sur la bactérie *Helicobacter pylori*. Il a été démontré que l'ingestion de cette bactérie pouvait induire un environnement inflammatoire dans l'estomac, engendrant des dommages au système gastro-intestinal qui se présentent sous forme d'ulcères, de gastrites chroniques ou même de cancers et de lymphomes gastriques (161). Ce type d'étude a permis d'établir des relations de cause à effet entre les pathologies et des bactéries spécifiques, menant au développement du concept « une bactérie-

une maladie ». Or, ce concept qui se limite à une bactérie pathogène ne considère pas la complexité de l'interaction hôte-microbiote (135). Il est dorénavant reconnu que l'ensemble de la communauté bactérienne a son importance dans la santé comme expliqué précédemment. En contexte de dysbiose, une dérégulation de l'homéostasie entre les bactéries commensales et le système immunitaire peut entraîner une inflammation chronique et éventuellement mener à des maladies (162). Parmi celles-ci, on retrouve notamment les maladies inflammatoires chroniques intestinales (*inflammatory bowel disease*, IBD), incluant la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, en plus de l'obésité, le diabète, l'asthme, la fibromyalgie, des allergies et des maladies auto-immunes (136, 163-165). Par exemple, il a été démontré qu'en situation d'obésité ou d'IBD, une croissance importante et anormale des entérobactéries, du phylum des *Proteobacteria*, est observable ce qui pourrait contribuer au développement de la maladie et de l'inflammation dû à leur expression de MAMP, dont le LPS (166). De plus, la dysbiose peut dérégler la production de métabolites, notamment l'indole et ses dérivés, menant à des affections métaboliques comme certaines maladies cardiovasculaires et l'hypertension (163). Récemment, les études sur la dysbiose et les maladies ont ravivé l'intérêt porté par la communauté scientifique sur le rôle du microbiote dans le cancer. Il a été estimé que le développement d'environ 20 % des cancers serait influencé par des microorganismes (167). Puisque le cancer est l'objet de ce mémoire, la relation entre le microbiote et le cancer sera décrite en détail dans les prochaines sections.

## **Relation entre le microbiote et le cancer**

### PROMOTION DE L'ONCOGÈNE

Au cours des dernières années, plusieurs évidences expérimentales ont suggéré la participation du microbiote dans les étapes multiples du développement d'un cancer. *H. pylori* nommé précédemment, mais aussi *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Salmonella enterica*, *E. faecalis* et *Clostridium leptum* font partie des espèces bactériennes ayant été associées à des effets protumoraux (168). Dernièrement, Arthur *et al.* ont revu les « *hallmarks* » du cancer, en y incorporant cette fois-ci l'influence des bactéries dans l'accumulation des propriétés nécessaires à l'apparition d'une cellule cancéreuse (169). Globalement, le microbiote peut avoir un impact sur l'instabilité génétique et l'accumulation de

mutations, l'inflammation protumorale, l'autonomie envers les facteurs de croissance et l'évasion du système immunitaire. Tout d'abord, plusieurs bactéries résidant dans l'intestin peuvent produire des toxines qui augmentent la prolifération ou l'instabilité du génome des cellules intestinales. Il a été démontré par l'utilisation d'un modèle murin que la toxine de *B. fragilis* (BFT) entraîne une voie de signalisation induisant la transcription du proto-oncogène c-Myc, suivant le clivage de la cadhérine E (170). Également, la colibactine produite par certaines *E. coli* peut non seulement favoriser la prolifération cellulaire par l'induction de la production du facteur de croissance hépatique (*hepatic growth factor*, HGF), mais aussi provoquer des cassures double-brin à l'ADN, participant donc à l'accumulation des mutations (171, 172). Certaines molécules sécrétées ou présentées par les bactéries modulent la réponse immunitaire ce qui peut promouvoir l'évasion des cellules tumorales. C'est le cas de *F. nucleatum* qui inhibe les fonctions cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans l'environnement tumoral par l'interaction entre l'immunorécepteur inhibiteur TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) et la protéine d'activation des fibroblastes (*fibroblast activation protein*, Fap2) (173). Par ailleurs, de nombreuses bactéries comme *E. faecalis*, *H. pylori* et *B. fragilis* peuvent créer un environnement inflammatoire chronique protumoral, notamment par leur sécrétion de molécules inflammatoires telles que des dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) ou de l'azote (167, 168). Pour finir, le métabolisme du microbiote pourrait être un facteur à évaluer lors du choix de la thérapie contre le cancer. Récemment, Geller *et al.* ont démontré que les Gammaproteobacteria étaient capables de métaboliser la gemcitabine en une forme inactive, rendant certains cancers du pancréas résistants à la chimiothérapie (174).

Outre l'effet néfaste de bactéries spécifiques dans l'oncogénèse, la signature bactérienne globale d'un microbiote peut être associée au développement de la maladie, principalement lors d'une dysbiose. Le transfert du microbiote de souris avec ou sans cancer colorectal (CRC) dans des souris saines, traitées pour développer un CRC, a permis d'observer un nombre plus élevé de tumeurs dans les souris ayant reçu un microbiote d'un donneur malade (175). De plus, il a été démontré que le CRC est fréquemment accompagné d'une réduction des firmicutes, des bactéroïdètes et des bactéries lactiques, suivi d'une augmentation des *Fusobacterium* (176). Ces résultats suggèrent que l'ensemble du microbiote d'un individu atteint d'un cancer est relié au

développement de sa maladie. Cela s'explique par une augmentation des bactéries néfastes dans sa composition et la dérégulation de la balance entre les processus pro-inflammatoire et anti-inflammatoire normalement retrouvés dans un microbiote en eubiose. En se fiant à ces observations, il est clair que la caractérisation du microbiote dans le cancer doit se faire non seulement en évaluant l'effet de bactéries protumorales, mais aussi en prenant en considération l'intégralité de la population microbienne qui, lors d'un déséquilibre, participe au développement tumoral.

#### RÔLE DANS LA PROGRESSION TUMORALE

Bien que certaines bactéries ou la dysbiose soient associées au développement du cancer, le microbiote joue un rôle essentiel dans le contrôle de la croissance tumorale. Comme il a été mentionné précédemment, des bactéries commensales produisent des SCFA qui régulent non seulement la réponse immunitaire, mais peuvent aussi avoir un effet antitumoral direct. Il a été montré que le propionate et l'acétate produits par les bactéries du genre *Propionibacterium* génèrent des ROS et activent la caspase-3 dans les cellules cancéreuses ce qui entraîne leur mort par apoptose (177). Le butyrate peut aussi mener à l'apoptose des cellules cancéreuses par l'activation des caspases. Il peut également modifier l'expression génique des cellules malignes par l'inhibition des histones désacétylases (*histone deacetylase inhibitors*, HDAC), induisant un arrêt du cycle cellulaire et de la synthèse d'ADN ainsi que l'apoptose (178, 179). D'autres molécules synthétisées par certaines bactéries peuvent aussi participer directement au contrôle de la tumeur comme le ferrichrome de *L. casei* qui a un effet suppresseur de tumeur dépendant de l'apoptose activée par la signalisation des kinases JNK (c-Jun N-terminal) (180).

Cependant, l'impact du microbiote sur la croissance tumorale se fait principalement de façon indirecte, en stimulant la réponse immunitaire antitumorale par la génération d'un environnement pro-inflammatoire. L'étude des modèles murins GF et exempt d'organismes pathogènes spécifiques (*specific-pathogen-free*, SPF) a permis d'illustrer l'importance de l'inflammation causée par le microbiote dans le contrôle tumoral et l'efficacité de la thérapie contre le cancer. Dans une étude sur le développement du CRC, les souris GF présentaient des tumeurs plus importantes en nombre et en taille comparativement aux souris SPF possédant un microbiote (181). La croissance tumorale pouvait être limitée dans les souris GF par leur

colonisation avec des bactéries commensales ou par l'administration du LPS, suggérant ainsi que la présence d'une communauté microbienne et de ses composantes (MAMP) permet de maintenir une inflammation basale antitumorale. Plusieurs études ont aussi démontré que cette influence de la population microbienne sur l'inflammation locale stimule la réponse immunitaire antitumorale et ultimement, améliore l'efficacité de la chimiothérapie (5-fluorouracile, (182); cyclophosphamide, (183)) et de l'immunothérapie (CpG-oligonucléotide, (184); anti-PD-L1, (185); anti-CTLA4, (186)). L'étude de Viaud *et al.* a par exemple démontré que la déplétion du microbiote d'une souris avec de la vancomycine (antibiotique contre les Gram<sup>+</sup>) ou l'utilisation de souris GF réduisaient l'effet de la chimiothérapie au cyclophosphamide sur la tumeur (183). D'ailleurs, il a été démontré que la perte d'une partie du microbiote par le traitement de la souris avec un antibiotique menait à la diminution de la réponse inflammatoire des lymphocytes Th17, importante pour l'efficacité de la cyclophosphamide. Ainsi, même si le microbiote peut promouvoir l'inflammation chronique, et par le fait même la cancérogenèse, l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale grâce à cette inflammation peut avoir des effets bénéfiques pour le contrôle de la tumeur.

#### LE MICROBIOTE DU SEIN

La relation entre le microbiote et le cancer a été principalement caractérisée par des études sur le microbiote intestinal et le CRC, même si des populations bactériennes ont été découvertes dans des tissus distants et qu'elles pourraient avoir un impact semblable sur l'oncogenèse locale. Un certain nombre d'études, bien qu'insuffisant, a tenté d'évaluer l'impact du microbiote mammaire dans le développement ou le contrôle du cancer du sein (résumé des études à la figure 1 dans (117)). Urbaniak *et al.* ont montré une différence significative entre la composition microbienne des tissus mammaires sains et celle du tissu normal adjacent à la tumeur (*normal tissue adjacent to the tumor*, NAT) (187). Les tissus sains étaient caractérisés par une quantité importante de *Prevotella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* et *Micrococcus*, tandis que les NAT étaient composés de *Bacillus*, *Staphylococcus*, entérobactéries, Comamonadaceae et bactéroïdètes. De plus, l'analyse de quatre représentants des entérobactéries (*E. coli*) et *Staphylococcus* (*S. epidermidis*) retrouvés préférentiellement dans le sein cancéreux a démontré leur capacité à induire des dommages à l'ADN, suggérant qu'une

dysbiose est associée au cancer du sein et peut promouvoir l'oncogenèse (187). Les connaissances sur le microbiote mammaire et son influence sur le cancer du sein restent toutefois très limitées. À la suite de résultats démontrant une diminution du risque de cancer du sein ou de mastite (inflammation mammaire) après l'administration orale de produits fermentés ou de lactobacillus sous forme de probiotiques, certains ont émis l'hypothèse selon laquelle les bactéries lactiques retrouvées principalement dans le tissu mammaire en santé auraient un effet protecteur (188, 189). Cependant, la compréhension de l'effet bénéfique ou nocif des bactéries résidentes dans le sein sur l'oncogenèse en est à ses débuts et doit continuer d'être étudiée afin de déterminer les mécanismes par lesquels le microbiote mammaire participe au contrôle de la tumeur.

#### LE MICROBIOTE INTRATUMORAL

Lors de la formation de la tumeur, le microbiote présent dans le tissu peut s'infiltrer dans l'agrégat de cellules tumorales, permettant de moduler l'inflammation, le métabolisme et la réponse immunitaire au centre du microenvironnement tumoral. L'étude de Geller *et al.* a permis entre autres d'observer, par l'utilisation de marquages contre le LPS en immunohistochimie (IHC) et l'ARNr 16S avec l'hybridation *in situ* à fluorescence (*fluorescence in situ hybridization*, FISH), la présence de ces composants bactériens au sein des adénocarcinomes canaux pancréatiques humains (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) (174). Un nouveau champ de recherche dans l'étude du microbiote et son impact dans le cancer s'est ouvert avec la découverte de cette population bactérienne, considérée comme le microbiote intratumoral.

La caractérisation de ce microbiote en est à son commencement, mais il est dorénavant connu, notamment grâce aux études sur les cancers mammaires et gastro-intestinaux, que la signature bactérienne et la charge bactérienne dans le microbiote intratumoral se différencient de celles des tissus normaux. Dans le cancer du sein, Xuan *et al.* ont montré un enrichissement de la tumeur mammaire en *M. radiotolerans*, tandis que le NAT était plutôt enrichi en *S. yanoikuyae* (190). Également, l'étude démontrait que la charge bactérienne, déterminée par la quantification qPCR du gène de l'ARNr 16S, ainsi que la réponse antibactérienne étaient moins élevées dans les tumeurs mammaires que dans les NAT appariés. Considérant qu'une réduction drastique de l'ADN bactérien dans les tumeurs du sein corrèle avec une expression plus faible des gènes immunitaires antibactériens, il est possible que la présence d'un microbiote intratumoral

soit souhaitable pour le bon fonctionnement de la réponse immunitaire antitumorale en favorisant l'inflammation locale dans le microenvironnement tumoral. Jusqu'à présent, cette hypothèse n'a pas été évaluée dans le cancer du sein. Toutefois, Riquelme *et al.* ont récemment démontré chez des patients avec un PDAC qu'une diversité bactérienne élevée dans leur tumeur, synonyme d'un microbiote intratumoral en eubiose, était un facteur déterminant dans le recrutement et l'activation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (191). De plus, la diversité bactérienne intratumorale élevée était associée à une survie à long terme augmentée pour les patients atteints de PDAC, habituellement caractérisés par leur risque élevé de récives mortelles. Par ailleurs, l'effet de certaines bactéries présentes dans le microenvironnement tumoral sur la réponse aux traitements antitumoraux ou sur le développement des cellules cancéreuses ne doit pas être négligé. Malgré la découverte et l'identification de bactéries dans le microbiote intratumoral mammaire, celui-ci est très peu caractérisé. En prenant en considération les interactions multiples que le microbiote peut avoir avec nos processus physiologiques, il est primordial de déterminer si le microbiote intratumoral mammaire a une importance pour le recrutement de cellules immunitaires et ultimement, sur le devenir clinique des patients.

#### L'UTILISATION THÉRAPEUTIQUE DES BACTÉRIES

L'utilisation des bactéries et de leurs effets sur l'inflammation pour le traitement du cancer remonte aux expériences sur *S. pyogenes* de W. Busch en 1868, F. Fehleisen en 1883 et W. Coley en 1891 (192). À la suite de l'observation d'une réduction de la taille de la tumeur chez des patients présentant un érysipèle causé par *S. pyogenes*, W. Coley a décidé d'injecter cette espèce bactérienne tuée à la chaleur avec des *S. marcescens*, un mélange connu sous le nom de la « toxine de Coley », afin de stimuler la réponse immunitaire antitumorale, créant ainsi la première immunothérapie pour le contrôle de la tumeur (193). Depuis, d'autres bactéries ont aussi été utilisées à titre de thérapie ciblée anticancéreuse ou de vecteurs pour des agents antitumoraux. L'utilisation des spores de *Clostridium* pour le contrôle tumoral a fait son apparition comme thérapie ciblée suivant les observations de Vautier qui montraient en 1813 des individus guéris de leur cancer suivant une gangrène gazeuse causée par *C. perfringens* (194). Les spores de *Clostridium*, un genre rassemblant des bactéries anaérobiques strictes, germinent préférentiellement dans des zones hypoxiques et nécrotiques retrouvées dans le

microenvironnement tumoral (194, 195). Certains représentants de ce genre ont des propriétés oncolytiques tel *C. histoliticum* par la sécrétion d'enzymes protéolytiques capables d'éliminer les cellules cancéreuses et de liquéfier la tumeur (196). La pathogénicité de certaines bactéries oncolytiques a souvent été un facteur limitant leurs bénéfices cliniques. Dorénavant, des souches non toxiques (NT) sont créées afin de réduire les dangers pour l'homme comme c'est le cas pour la *C. novyi-NT* qui montre une cytotoxicité antitumorale prometteuse avec une réponse complète de la tumeur chez 34 % des souris et 30 % des lapins après l'injection intraveineuse de ses spores (196). Des *Bifidobacterium* et *Salmonella* présentent également une colonisation sélective de la tumeur, soit à cause de leur besoin d'un environnement hypoxique/nécrotique (*Bifidobacterium* (197)) ou de nutriments abondants dans le milieu nécrotique (souche de *Salmonella* auxotrophe (198)). Avec les *Clostridium*, ces bactéries ont souvent été modifiées génétiquement afin de réduire leur pathogénicité et d'ajouter des gènes ayant des fonctions anticancéreuses. Une approche courante est d'ajouter un gène codant une enzyme qui clive la forme inactive du traitement (Ex : chimiothérapie) afin de l'activer au sein de l'environnement tumoral, et ainsi diminuer les effets systémiques secondaires de la drogue (192). D'autres agents anticancéreux peuvent être amenés dans la tumeur comme le montre l'utilisation de *B. adolescentis* pour le transport du gène de l'endostatine qui a mené à une réduction de l'angiogenèse et l'inhibition de la croissance tumorale (199). Pour finir, plusieurs bactéries peuvent servir à stimuler la réponse immunitaire antitumorale locale. D'ailleurs, le vaccin Bacillus Calmette-Guérin (BCG) est utilisé comme adjuvant de la réponse immunitaire dans le cancer de la vessie (200). Il est donc primordial d'identifier des bactéries spécifiques pour leur rôle dans l'environnement tumoral, puisque ces dernières pourraient avoir une efficacité thérapeutique intéressante.

Dernièrement, la recherche sur l'utilisation des bactéries pour la thérapie contre le cancer a évolué de l'injection de bactéries uniques à la modulation de la composition générale du microbiote, suivant les avancées sur la compréhension de la dysbiose et de son impact dans l'oncogénèse et la réponse aux traitements antitumoraux. La plupart des méthodes actuelles, qui incluent la modification de la diète et du mode de vie, la bactériothérapie fécale (*fecal microbiota transplantation*, FMT), l'utilisation de pré-, pro- et postbiotiques et la modulation ciblée (Ex : antibiotique) ont été développées pour moduler la composition du microbiote intestinal (201),

mais elles pourraient aussi avoir un impact au niveau du microbiote mammaire considérant la migration des bactéries intestinales. Le FMT, qui est un transfert du microbiote d'un individu sain vers un patient receveur, est utilisé à cause de sa capacité à altérer drastiquement le microbiote du receveur (202). Sivan *et al.* ont montré que des souris au fond génétique identique, mais provenant de différents fournisseurs, ne présentaient pas la même croissance tumorale, suggérant ainsi une implication du microbiote dans le contrôle de la tumeur. Un FMT de la souris ayant un microbiote favorable au contrôle tumoral vers celle étant permissive à la croissance de la tumeur a permis à cette dernière de limiter le développement de la tumeur (185). Ainsi, le FMT permet de prendre la composition bactérienne bénéfique d'un individu et de la transférer dans un autre ayant une signature bactérienne défavorable. Une approche plus spécifique peut être réalisée par l'ingestion de certaines bactéries bénéfiques (probiotique), de molécules favorisant la croissance d'un groupe bactérien en particulier (prébiotique) ou de métabolites (Ex : SFCA) ou composants bactériens (postbiotique) (201). De plus, il est possible d'utiliser des antibiotiques afin de réduire ou d'éliminer la présence de bactéries néfastes dans le microbiote (201). Or, ces techniques dirigées vers des bactéries ou métabolites particuliers nécessitent tout d'abord une compréhension des mécanismes bactériens engagés dans l'oncogénèse. Ces exemples démontrent qu'il existe des techniques fonctionnelles et abordables afin d'améliorer la composition du microbiote intestinal. Celles-ci pourraient être adaptées à la modification du microbiote intratumoral mammaire advenant un effet positif de celui-ci sur le devenir clinique des patientes atteintes du cancer du sein.



## Chapitre 2 – Hypothèses et objectifs

### Hypothèses

Les études d'Urbaniak *et al.* ont permis la détection et la caractérisation d'un microbiote colonisant le tissu mammaire. Par la suite, Geller *et al.* ont révélé l'existence de bactéries infiltrant la tumeur pancréatique, considérées comme le microbiote intratumoral. L'analyse des tumeurs mammaires par Xuan *et al.* a permis d'observer la présence de ce phénomène, décrivant ainsi le microbiote intratumoral du sein. Malgré les avancées qui ont été réalisées sur la relation entre le microbiote et le cancer dans d'autres types de néoplasmes, en particulier le CRC, l'importance clinique du microbiote intratumoral mammaire est jusqu'à présent indéterminée. Compte tenu qu'un bouleversement du microbiote en composition ou en quantité peut avoir une influence sur la réponse immunitaire antitumorale, la réponse aux traitements et la progression du cancer, nous avons émis l'hypothèse que la charge bactérienne ainsi que la composition du microbiote intratumoral du sein humain pourraient être utilisées comme biomarqueur pour évaluer de façon personnalisée le devenir clinique (DFS et OS) des patientes atteintes du cancer du sein.

### Objectifs

- Le premier objectif consiste à confirmer la présence de bactéries intratumorales dans le cancer du sein par la détection de composants bactériens (ARNr 16S, LPS et PGLY) grâce à la qPCR et à des techniques de marquage (FISH et IHC).
- Le deuxième objectif consiste à effectuer des études de corrélation pour évaluer l'influence du nombre relatif et de l'identité des bactéries intratumorales sur la DFS et l'OS des patientes de notre cohorte.



## Chapitre 3 – Matériel et méthodes

### Tissus humains et approbation éthique

Des échantillons de tumeurs ont été fournis par la banque de tissus du cancer du sein du Réseau de recherche sur le cancer (RRCancer) du Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) et de la Fondation du cancer du sein du Québec (FCSQ), dirigée par le laboratoire du Dr Réjean Lapointe au CRCHUM. Les tumeurs et les NAT provenaient d'une cohorte de patientes atteintes du cancer du sein (N=114) et ayant subi une mastectomie ou une tumorectomie au CHUM, Montréal, Canada. Les données cliniques et pathologiques de la cohorte sont présentées dans le **Tableau 3**. Les patientes de la cohorte, diagnostiquées entre les années 2000 et 2019, ont été sélectionnées à l'aveugle, indépendamment de leur traitement et de la présentation clinique de leur cancer du sein. Parmi la cohorte, 1 patiente avait un carcinome *in situ* (CCIS) et 3 patientes avaient un cancer de stade IV. Le suivi médian de la cohorte est de 72 mois. Les données concernant l'allaitement, la prise d'antibiotiques et de pré/probiotiques et la consommation de la cigarette étaient absentes des dossiers cliniques.

À la suite de la chirurgie, une partie de la tumeur et du NAT a été collectée à des fins de recherche scientifique dans des tubes stériles et placée sur de la glace. Puis, les échantillons ont été coupés en petits morceaux et congelés à -80°C dans une solution RNAlater® (cat#R0901, Sigma-Aldrich) jusqu'à l'extraction de l'ADN. Des blocs de tumeurs mammaires de nos patientes recrutées qui ont été archivés par fixation à la formaline et enrobage dans la paraffine (*formalin-fixed paraffin-embedded*, FFPE) par le département de pathologie du CHUM ont été collectés pour d'autres techniques de coloration. Les échantillons de banque de tissus utilisés pour la recherche sont approuvés par le comité d'éthique de la recherche du CRCHUM avec le numéro de projet suivant: 2005-1893, BD 04.002 - BSP.

### Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN humain et/ou bactérien à partir de culots bactériens ou d'échantillons de tissus humains a été réalisée à l'aide du QIAamp® Fast DNA Tissue kit (cat#51404, Qiagen). En bref, les échantillons de tissus décongelés ont été coupés aseptiquement en plus petits fragments

de 5 à 25 mg. Les échantillons ont été homogénéisés mécaniquement et chimiquement grâce à des tubes d'agitation par billes contenant un tampon de lyse et de la protéinase K et à l'aide d'un Vortex-Genie® 2 (MOBIO Laboratories). Les homogénats d'échantillons ont été transférés sur la colonne d'extraction et l'ADN a été extrait en suivant les instructions du fabricant. La pureté et la quantité d'ADN ont été mesurées avec un NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher). Les échantillons ont été congelés à -20°C jusqu'à l'analyse qPCR.

## Courbe standard de la qPCR

Des *Escherichia coli* (*E. coli*; One Shot® TOP10 Chemically Competent, ThermoFisher) ont été cultivés pendant une nuit à 37°C dans un bouillon de culture lysogène (*lysogeny broth*, LB). La suspension bactérienne a été diluée à différentes valeurs de densité optique (OD600). Les dilutions ont été étalées avec les billes ColiRollers™ Plating Beads (EMD Millipore Corporation) sur des géloses LB et incubées durant la nuit à 37°C. L'utilisation des billes permet d'optimiser la reproductibilité et la rapidité de la technique en étalant les bactéries de façon optimale sur les géloses LB. Les unités de formation de colonies (*colony forming units*, CFU) ont été dénombrées pour calculer la concentration bactérienne initiale des dilutions (CFU/ml). La première courbe standard ( $R^2=0.89$ ) a été générée pour déterminer le nombre d'*E. coli* TOP10 correspondant à 1 unité OD600 (**Figure S2A** – Figures et tableau supplémentaires en annexe). Une quantité de  $5.06 \times 10^8$  CFU/ml par unité OD600 a été mesurée. Ensuite, l'ADN a été extrait comme décrit précédemment à partir de suspensions d'*E. coli* de concentration prédéterminée, mesurée grâce à l'OD600. Une deuxième courbe standard ( $R^2=0.88$ ) a été générée pour évaluer la quantité d'ADN extraits d'une seule bactérie *E. coli* (**Figure S2B**). Avec ces données, il a été possible de préparer la courbe standard qPCR avec des standards de quantité connue d'ADN bactérien (**Figure S2C**) diluée dans de l'eau sans ADN bactérien contaminant (cat#338132; Qiagen).

## Quantification de l'ADN bactérien par qPCR

Le protocole pour quantifier le nombre de copies du gène bactérien de l'ARNr 16S dans le tissu mammaire humain a été adapté du protocole publié par nos collaborateurs au MD Anderson Cancer Center (MDACC) (174). Des échantillons d'ADN tissulaire ont été dilués dans de l'eau sans ADN bactérien contaminant pour obtenir 150 ng par puits. Un mélange d'amorces (« *Forward* »:

5'-CNACGCGAAGAACCTTANC-3', 5'-ATACGCGARGAACCTTACC-3', 5'-CTAACCGANGAACCTYACC-3', 5'-CAACGCGMARAACCTTACC-3'; « Reverse »: 5'-CGACRRCCATGCANCACCT-3') ciblant une séquence d'ADN conservée de la région V6 du gène de l'ARNr 16S a été ajouté aux puits avec le mélange pour qPCR KAPA SYBR® FAST ABI PRISM® (cat#KK4603; KAPA Biosystems). Les réactions de la qPCR sont effectuées dans 20 µL, ce qui comprend 10 µL du mélange pour qPCR, 0.2 µL des cinq amorces pré-diluées à 10 µM et 9 µL d'ADN des échantillons dilués. La quantification a été effectuée avec l'instrument StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Après une étape de dénaturation initiale de l'ADN et d'activation de l'enzyme de 3 minutes à 95°C, l'ADN cible est amplifié en 40 cycles à 95°C pendant 3 secondes (dénaturation) et 60°C pendant 20 secondes (allongement). L'amplification qPCR a été suivie d'une analyse de la courbe de fusion. La quantification de l'ADN bactérien a été effectuée en comparant les valeurs du cycle seuil (*cycle threshold*,  $C_t$ ) de chaque échantillon à la courbe standard d'*E. coli*. Comme 1 pg d'ADN d'*E. coli* correspond à environ 201 bactéries (**Figure S2B**), la quantité d'ADN bactériens (pg) pour chaque échantillon a été transformée en nombre de bactéries (équivalent bactérien) en utilisant cette équivalence. Pour évaluer la présence de bactéries dans les échantillons de tissus, ils ont été comparés à un contrôle sans matrice (no template control, NTC) et à un contrôle d'ADN humain seulement (limite de détection) contenant 150 ng d'ADN humain mâle (cat#G1471; Promega).

## Préparation des échantillons FFPE

Pour l'optimisation des marquages, des coupes FFPE d'*E. coli* seul, un mélange d'*E. coli* et de la lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) ou un mélange de MDA-MB-231 et de la lignée cellulaire de monocytes THP-1 (ATCC® TIB-202™) ont été préparés en utilisant le gel de traitement des échantillons Richard-Allan Scientific™ HistoGel™ (cat#HG-4000, ThermoFisher). Les cellules MDA-MB-231 et THP-1 ont été cultivées dans du Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (cat#350-000-CL) supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum bovin fœtal (cat#080-150), 2 mM de L-glutamine (cat#609-065-EL), 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine (cat#450-201-EL) et 10 µg/mL de gentamicine (cat#400-135-UG) (tous de Wisent Bioproducts). *E. coli* a été cultivée comme décrit précédemment. Les cellules du cancer du sein ont été regroupées dans un microtube de 1.5 ml à un ratio de 1:3 avec les bactéries ou de 2:1 avec les monocytes et mis en culot par centrifugation. Les culots cellulaires ont été remis en

suspension dans de l'HistoGel liquéfié et préparés en suivant les instructions du fabricant. Des tissus tumoraux FFPE et des coupes d'HistoGel de 4 µm ont été montés sur lames.

## **Immunohistochimie (IHC)**

La coloration IHC pour la détection des bactéries dans les tumeurs du sein a été effectuée en utilisant le système de coloration de lames automatisé BenchMark XT (cat#750-700; Ventana). Brièvement, la déparaffinisation des lames a été exécutée sur le Ventana BenchMark par réhydratation dans des bains de xylène et d'éthanol de concentration décroissante. Les échantillons ont été prétraités avec la procédure de récupération d'épitopes induite par la chaleur (*heat-induced epitope retrieval*, HIER) à pH 6 dans une solution de conditionnement cellulaire (CC1) (cat#950-124; Ventana). Les bactéries ont été marquées avec des anticorps contre le « core » du LPS (cat#HM6011; Hycult Biotech) à une dilution de 1:750 et le PGLY (cat#MAB995; Sigma-Aldrich) à une dilution de 1:1000 ou avec un anticorps isotype (cat#554645; BD Biosciences) à une dilution de 1:750. Les lames ont été visualisées avec le microscope Olympus BX61 et analysées avec le logiciel Olympus OlyVIA 2.9.

## **Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)**

La coloration FISH a été optimisée pour la détection de bactéries dans les tumeurs mammaires FFPE. Après une nuit d'incubation à 60°C, les lames ont été déparaffinées dans du xylène et déshydratées dans de l'éthanol à 100 %. Les lames ont été incubées dans un tampon salin de citrate de sodium (*saline sodium citrate*, SSC) 2X (pH 7) à 80°C pendant 25 minutes. Les lames ont été lavées à température ambiante (TA) dans de l'eau distillée pendant 3 minutes. Les échantillons ont été digérés avec de la pepsine (cat#P7012; Sigma-Aldrich) comme décrite précédemment par Trudel *et al.* (203), puis lavés dans de l'eau distillée pendant 3 minutes. Après déshydratation dans une série de bains d'éthanol, les échantillons ont été séchés à l'air puis hybridés pendant une nuit à 37°C dans 20 µL du mélange d'hybridation contenant 5 ng/µL d'une sonde spécifique à l'ARNr 16S marquée avec l'Alexa Fluor®647 (EUB338: 5'-AF647-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'), 40 % (v/v) de formamide déionisé (cat#F9037; Sigma-Aldrich), 10 % (w/v) de sulfate de dextran (cat#D6001; Sigma-Aldrich), 0.1 % (w/v) SDS (cat#B44244; BDH) et 300 ng/mL d'ADN de sperme de saumon (cat#15632011; ThermoFisher). La sonde EUB338 est remplacée par

de l'eau sans ADN bactérien contaminant pour le contrôle non marqué ou par la sonde NonEUB (5'-AF647- ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3') pour le contrôle de spécificité. Toutes les solutions mères ont été préparées dans du tampon SSC 2X. Les lames ont ensuite été lavées dans du SSC 2X/0.3 % (v/v) Tween®20 à température ambiante pendant 5 minutes pour éliminer la lamelle et dans SSC 2X/0.3 % (v/v) Tween®20 à 73°C pendant 3 minutes. Les lames ont été séchées à l'air, puis contre-colorées et montées avec le milieu de montage ProLong™ Glass Antifade (cat#P36980; ThermoFisher). Les lames ont été visualisées avec le microscope Zeiss Axio Observer Z1 et analysées avec le logiciel AxioVision 4.8.

## **Immunofluorescence (IF)**

Pour la détection des monocytes et des macrophages en utilisant l'IF, les étapes de déparaffinisation, d'HIER et de marquage avec des anticorps primaires ont été effectuées sur système de coloration de lames automatisé BenchMark XT comme décrit précédemment. Des monocytes/macrophages ont été marqués avec un anticorps primaire, l'anti-CD68 (cat#GA60961; Dako), à une dilution de 1:500. Sur la « bench », les lames ont été bloquées à TA pendant 20 minutes avec la solution de blocage BlockAid™ (cat#B10710; ThermoFisher) puis marquées à TA dans l'obscurité pendant 60 minutes avec l'anticorps secondaire anti-souris AF647 (cat # A31571; Invitrogen) à une dilution de 1:250 dans du PBS-BSA 1 %. Ensuite, les lames ont été rincées avec du PBS 1X à TA pendant 5 minutes et trempées avec du Sudan Black à 0.1 % (m/v) diluées dans de l'EtOH à 70 % à TA pendant 15 minutes. Après un rinçage final avec du PBS 1X, les lames ont été contre-colorées et montées avec le milieu de montage ProLong™ Glass Antifade. Les lames ont été visualisées avec un microscope Zeiss Axio Observer Z1 et analysées avec le logiciel AxioVision 4.8.

## **Séquençage**

Pour séquencer le gène de l'ARNr 16S bactérien dans nos échantillons de tumeurs, une technique de pyroséquençage 454 décrite précédemment par Marette *et al.* (204) a été utilisée. En bref, l'ADN extrait de la tumeur des patientes a été amplifié par PCR avec des amorces à code-barres ciblant la région V3-V4 (341F-805R) du gène de l'ARNr 16S. Ensuite, les amplicons ont été séquencés en utilisant la plateforme Roche 454 GS-FLX Titanium à l'IBIS (Institut de Biologie

Intégrative et des Systèmes - Université Laval). Les séquences ont ensuite été démultiplexées à l'aide du script Roche MID (identificateur de multiplexes).

## Étapes d'analyse des séquences ADN

Les séquences d'ADN brutes ont été préparées, assemblées et identifiées en utilisant le « *pipeline* » d'analyse du microbiote DADA2 adapté pour le pyroséquençage 454 (disponible à <https://github.com/benjjneb/dada2>) développé par Callahan *et al.* (2015). Les séquences « *paired-end* » ont tout d'abord été rognées et filtrées afin d'enlever les amorces en 5' et les nucléotides de mauvaises qualités en 3', d'établir une limite maximale de 2 pour le nombre d'erreurs attendues et d'enlever les séquences contenant des bases nucléiques inconnues (Ns). Puis, le « *denoising* » des séquences *reverse* et *forward* permet de déterminer l'abondance des séquences uniques. L'algorithme de Dada2 prend en considération le profil de qualité consensus pour chaque séquence unique afin de mieux identifier et d'enlever les erreurs de séquençage dans les séquences. Les séquences *reverse* et *forward* filtrées et complémentaires sont ensuite assemblées en fragments consensus pour former la table d'ASV (*amplicon sequence variant*) et les séquences chimériques sont retirées. La taxonomie est assignée à chaque séquence unique en la comparant à la base de données SILVA v138 (103). L'alpha-diversité a été analysée avec la librairie phyloseq dans R, tandis que la composition, la bêta-diversité (statistique déterminée avec un PERMANOVA) et le LEfSe (*linear discriminant analysis effect size*) ont été évalués avec l'outil en ligne MicrobiomeAnalyst (206-208).

## Statistiques

Pour comparer deux groupes, la normalité de la distribution des données a tout d'abord été évaluée avec le test Shapiro-Wilk. La signification statistique pour les distributions non normales a été calculée en utilisant le test bilatéral des rangs signés de Wilcoxon pour les échantillons appariés (tumeurs et NAT) ou le test bilatéral de Mann-Whitney pour les échantillons non appariés, tandis qu'un test t bilatéral a été utilisé pour les distributions normales. Pour comparer trois groupes, la signification statistique pour les distributions non normales a été calculée en utilisant l'ANOVA (*analysis of variance*) de Kruskal-Wallis, suivie d'une analyse post-hoc avec le test de Dunn pour la comparaison multiple des groupes. Seules les valeurs-p

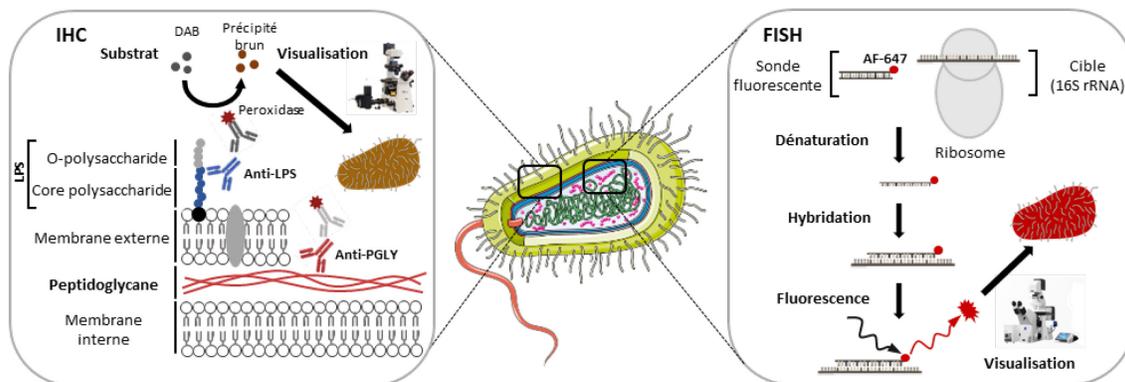
inférieures à 0.05 sont considérées comme significatives. \*, \*\*, \*\*\* et \*\*\*\* représentent respectivement une valeur  $p < 0.05$ ,  $< 0.01$ ,  $< 0.001$  et  $< 0.0001$ . L'analyse statistique des corrélations est effectuée par régression linéaire avec le coefficient de Pearson. Pour les analyses de survie, les tests de Wilcoxon et du Log-rank sont réalisés pour leur puissance dans la détection de différences précoces ou tardives dans le temps, respectivement (209). La DFS est définie comme le temps écoulé entre la date de diagnostic et la première récurrence indépendamment du site (locorégionale ou distante), tandis que l'OS est le temps entre la date de diagnostic et le décès de la patiente indépendamment de la cause. L'analyse des variables catégorielles des tableaux est effectuée par le test  $\chi^2$  ou le test exact de Fisher pour les échantillons de petite taille. Enfin, pour les analyses des modèles univarié et multivarié, des régressions de Cox ont été réalisées pour évaluer l'impact des différentes variables sur la survie. L'hypothèse des risques proportionnels a préalablement été validée en vérifiant l'interaction entre la mesure de temps et les covariables dans le modèle (SPSS). Les statistiques ont été calculées à l'aide des logiciels GraphPad Prism 8® ou IBM SPSS® Statistic 25.



## Chapitre 4 – Résultats

### La révélation des composants bactériens dans les tumeurs mammaires humaines par IHC et FISH.

La présence et la distribution de bactéries intratumorales dans les tumeurs du sein humain ont été très peu caractérisées. Ainsi, des composants bactériens ont été révélés sur des tranches de tumeurs du sein entier en utilisant deux techniques de marquage : l'IHC et le FISH (techniques résumées à la **Figure 5**).

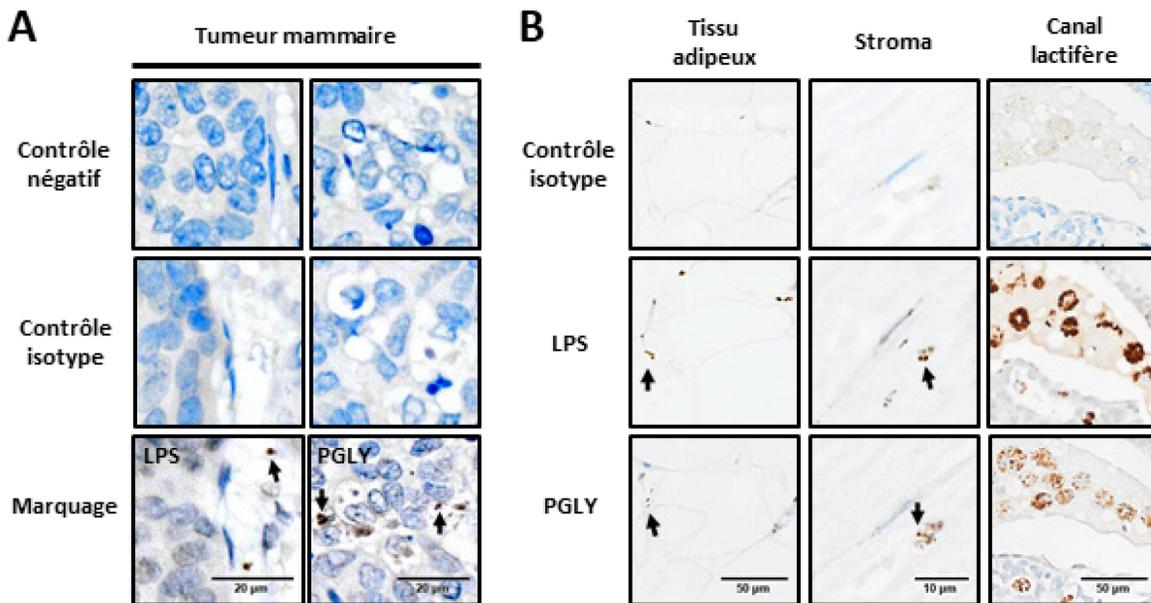


**Figure 5. – Représentation des marquages utilisés pour la détection des composants bactériens dans les tumeurs mammaires.**

Illustrations des techniques d'IHC et de FISH utilisées pour la détection de bactéries sur des tranches de tissu mammaire FFPE de 4  $\mu\text{m}$ . Les marquages en IHC et en FISH ont été réalisés sur des tranches de tumeurs entières. **(gauche)** Le LPS et le PGLY de la paroi cellulaire des bactéries ont été ciblés par des anticorps grâce à l'IHC. Les tissus ont été contre-colorés avec de l'hématoxyline. **(droite)** L'ARNr 16s des bactéries a été ciblé avec une sonde fluorescente, la EUB338-AF647, en utilisant le FISH. Les tissus ont été contre-colorés avec le Hoechst 33342 (fluorescence bleue).

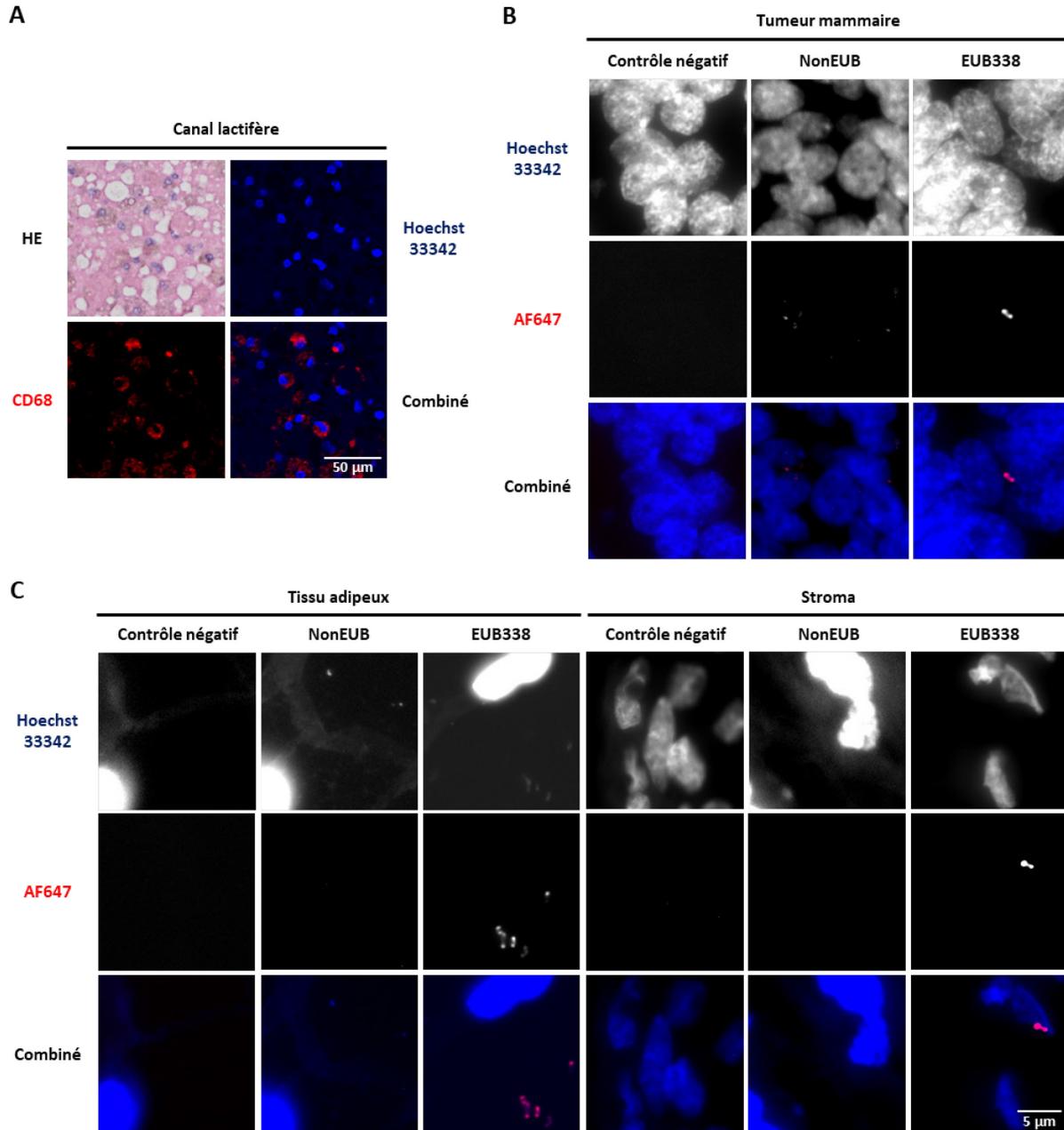
Pour la détection des bactéries avec l'IHC, nous avons utilisé un anticorps anti-LPS ciblant la membrane externe de certaines bactéries Gram négatif et un anticorps anti-PGLY ciblant la paroi cellulaire de toutes les bactéries (**Figure 5**). Tout d'abord, la spécificité des anticorps a été validée sur des cellules FFPE d'*E. coli* et de MDA-MB-231. Les deux anticorps ont montré une liaison non spécifique minimale dans la lignée cellulaire de cancer du sein, tout en étant capables

de marquer les *E. coli* sur des lames (**Figure S1A**). Ensuite, le marquage des bactéries avec ces anticorps sur des coupes de tumeurs mammaires a permis de révéler la présence de composants bactériens (LPS et PGLY) dans le microenvironnement tumoral (**Figure 6, A et B**). Ces marquages ont été comparés à un contrôle isotype pour évaluer le signal de fond non spécifique et valider notre détection bactérienne sur les tissus mammaires. Les résultats suggèrent une infiltration des bactéries dans les agrégats de cellules tumorales dans le sein comme le démontre la **Figure 6A**. Dans le microenvironnement tumoral, les composants bactériens sont principalement observés dans les tissus conjonctifs: le tissu adipeux et le stroma. De plus, pour certaines patientes, le marquage a révélé une quantité importante de composants bactériens localisés dans les cytoplasmes de cellules des canaux lactiques (**Figure 6B**). Une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) a été réalisée, et des cellules ressemblant à des macrophages ont été observées dans ces canaux (**Figure 7A**). La présence de macrophages dans les canaux lactifères a été confirmée avec un marquage anti-CD68 en utilisant l'IF (**Figure S1C** pour validation du marquage)



**Figure 6. – Révélation des composants bactériens dans le microenvironnement de la tumeur mammaire humaine à l'aide de l'IHC.**

Photos représentatives des marquages du LPS et du PGLY bactériens en IHC dans **(A)** les tumeurs du sein humain ou **(B)** les tissus du microenvironnement tumoral. Les noyaux des tissus ont été contre-colorés avec de l'hématoxyline.



**Figure 7. – Validation de la présence et localisation des bactéries du microenvironnement tumoral et de l'identité des cellules immunitaires qui leur sont associées avec le FISH et l'IF.**

(A) La morphologie des cellules associées aux bactéries dans les canaux lactifères a été analysée par coloration à l'HE. Les cellules ont également été marquées avec un anticorps anti-CD68 en utilisant l'IF et contre-colorées avec le Hoechst 33342 (coloration bleue). Un marquage FISH a été réalisé pour confirmer la présence de composants bactériens dans (B) les tumeurs du sein humain et (C) les tissus adjacents en utilisant une sonde fluorescente (AF647) qui cible l'ARNr 16S.

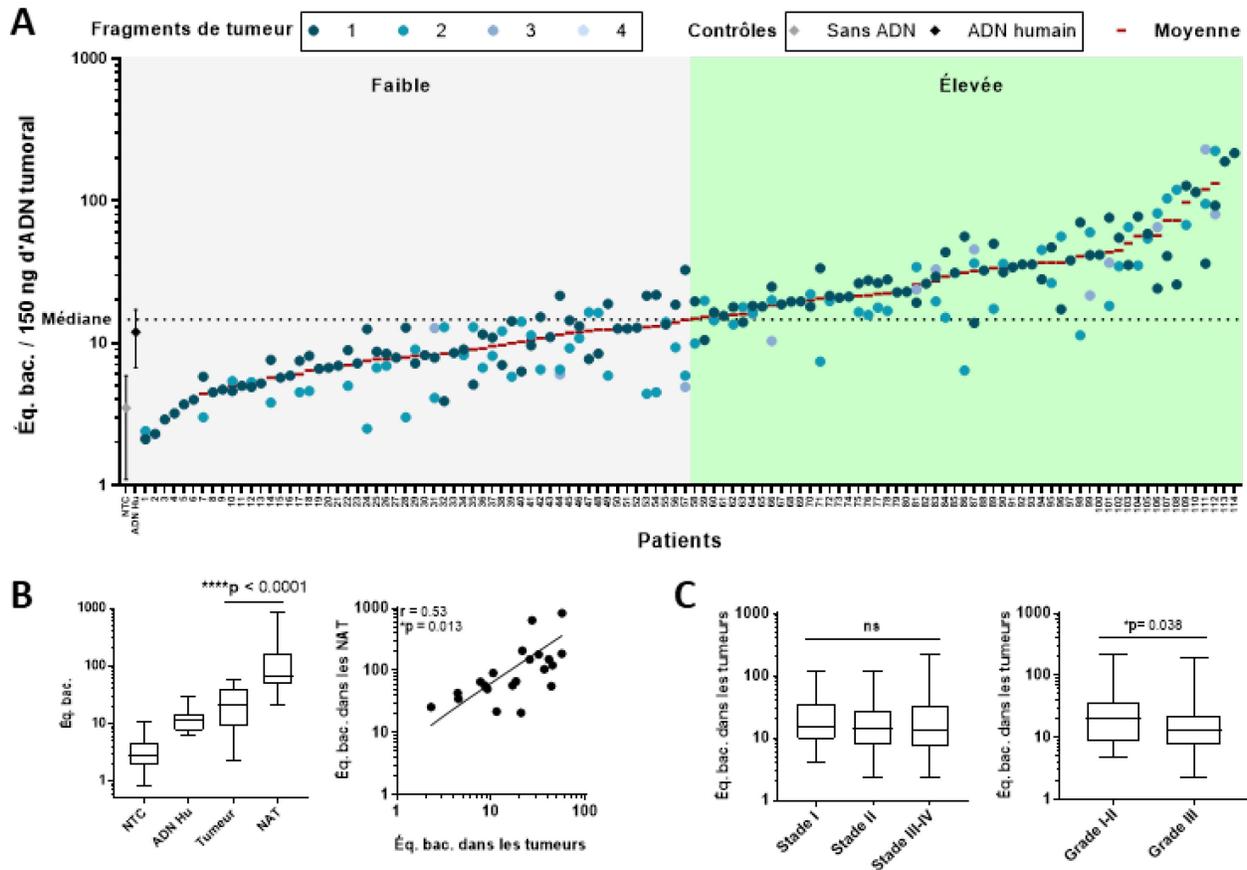
En ciblant l'ARNr bactérien 16S avec une sonde conjuguée à une molécule fluorescente (EUB338-AF647) grâce au FISH, la détection de bactéries sur les mêmes tranches tumorales a été confirmée. La spécificité de la sonde EUB338 a été contrôlée avec la même expérience utilisée pour évaluer la liaison spécifique des anticorps utilisés en IHC. Elle semble beaucoup plus spécifique aux composants bactériens puisqu'aucun marquage non spécifique n'est observé dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 (**Figure S1B**). Le marquage de l'ARNr 16S par la sonde a permis de révéler des bactéries dans le tissu tumoral mammaire de la même façon que les composants bactériens (LPS et PGLY) ciblés en utilisant l'IHC, montrant également l'affinité des bactéries pour les tissus conjonctifs (**Figure 7, B et C**). Le signal positif de l'EUB338 a été validé en le comparant à une sonde contrôle NonEUB qui permet de déterminer la spécificité de la liaison de la sonde dans les tissus mammaires. Du marquage non spécifique est observable comme on le voit à la **Figure 7B**. Cependant, si l'IHC ne permet pas l'observation des cocci et bâtonnets à cause de la diffusion du chromogène, le FISH donne un signal beaucoup plus précis. Ainsi, le signal positif de l'EUB338 est convaincant puisqu'il est similaire en taille ( $\approx 1 \mu\text{m}$ ) et en forme (bâtonnet) à celui attendu d'une bactérie, en plus de se différencier du signal non spécifique obtenu avec la sonde NonEUB. Pour finir, autant le LPS, le PGLY et l'ARNr 16S sont révélés principalement dans l'environnement extracellulaire, mis à part pour les canaux lactifères où les composants bactériens détectés avec l'IHC sont retrouvés dans le milieu intracellulaire des macrophages.

La détection des différents composants bactériens sur des coupes de tumeurs du sein suggère fortement que les bactéries peuvent infiltrer le microenvironnement tumoral en contexte de cancer du sein. De plus, les bactéries associées aux macrophages dans les canaux lactifères supportent l'hypothèse que la présence bactérienne dans le microenvironnement intratumoral pourrait façonner la réponse immunitaire antitumorale.

## **Quantification des composants bactériens dans les tumeurs du sein par qPCR.**

Pour caractériser davantage la présence du microbiote dans les tumeurs du sein humain, une méthode qPCR a été optimisée pour quantifier la charge bactérienne dans les échantillons de tumeurs de notre cohorte (**Tableau 3**) en utilisant *E. coli* comme bactérie de référence.

Premièrement, la technique qPCR quantifiant l'ADN codant l'ARNr bactérien 16S a été validée en testant sa sensibilité et sa reproductibilité dans des échantillons de tumeurs. Pour évaluer si notre qPCR pouvait faire la différence entre une tumeur avec de l'ADN bactérien indétectable et une tumeur avec de l'ADN bactérien, nous avons inoculé des fragments de tumeur qui ont un compte bactérien sous la limite de détection (Tumeur #1 et #2) avec une suspension d'*E. coli* de quantité connue avant l'extraction de l'ADN (**Figure S3A - gauche**). Le seuil de détection a été établi à  $11.9 \pm 5.2$  équivalents bactériens (Éq. bac.), résultat d'une liaison non spécifique des amorces à l'ADN humain seul. L'inoculation avec du milieu LB contenant des *E. coli* (B1 et B2) a augmenté la détection des Éq. bac. dans les fragments de tumeur au-dessus de la limite de détection, contrairement aux fragments de tumeur supplémentés uniquement avec le milieu LB (LB #1 et #2). L'expérience a confirmé que la technique de qPCR était capable de détecter une présence artificielle de bactéries dans des échantillons de tumeurs. De plus, les Éq. bac. quantifiés dans chaque fragment de tumeur n'étaient pas significativement différents de la quantité de bactéries ajoutées à l'étape d'extraction (**Figure S3A - droite**). Ensuite, pour évaluer la sensibilité de la technique, l'ADN d'une tumeur du sein a été extrait et 150 ng de cet ADN tumoral ont été mélangés à des dilutions prédéterminées d'ADN bactérien allant de 10 000 à 1 Éq. bac. (TB 1 à 13) (**Figure S3B**). Dans l'ensemble, la technique qPCR a détecté avec précision la quantité supplémentaire d'ADN bactériens (TB 2 à 9). Les échantillons supplémentés avec une quantité d'ADN bactériens supérieure à la gamme d'étalonnage couverte par les standards (TB 1) étaient les seuls à montrer une différence significative entre la quantité ajoutée et détectée d'ADN bactérien ( $p < 0.0001$ ). De plus, nous avons observé une perte de précision dans la quantification bactérienne des échantillons sous la limite de détection (TB 10 à 13). Enfin, la reproductibilité de la technique a été testée en répétant la quantification sur le même échantillon comme le montre la **Figure S3C**. Ces résultats montrent que la quantification qPCR des gènes de l'ARNr 16S est sensible et reproductible, ce qui permet une quantification précise du nombre d'Éq. bac. dans les échantillons de tumeurs du sein.



**Figure 8. – Quantification des équivalents bactériens dans le cancer du sein et le tissu normal adjacent à partir de l'ADN codant pour l'ARNr 16S bactérien**

(A) Un échantillon d'ADN extrait d'un fragment de tumeur du sein (1-4 fragment/tumeur) a été testé avec la quantification qPCR du gène de l'ARNr 16S pour quantifier la présence de bactéries chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (N=114). La quantification moyenne des fragments a été utilisée pour trier les patientes par ordre croissant. La médiane (14.7 Éq. bac.) de la quantification moyenne a été utilisée pour séparer les patientes dans les groupes de détection bactérienne faible ou élevée. (B) Comparaison entre la quantification des Éq. bac. dans les NAT (N=16) et le nombre quantifié dans les tumeurs appariées (**gauche**). La corrélation entre les Éq. bac. quantifiés dans les tumeurs et les NAT appariés a également été évaluée (**droite**). (C) Charge bactérienne moyenne dans les tumeurs classées en fonction des données cliniques du patient, soit le stade pTNM (**gauche**) ou le grade (**droite**). Les barres d'erreur représentent la moyenne  $\pm$  écart-type.

Ensuite, la technique qPCR a été utilisée pour quantifier les Éq. bac. dans les fragments de tumeur (1 à 4 fragments) de 114 patientes avec un cancer du sein. Les patientes ont été classées en fonction de la moyenne de la quantification de leurs fragments (**Figure 8A**). Certaines patientes

avaient des Éq. bac. relativement élevés (Max=215.7 Éq. bac.) dans leur tumeur par rapport à d'autres patientes ayant plusieurs fragments sous le seuil de détection (Min=2.3 Éq. bac.). Par ailleurs, pour certaines patientes, la charge bactérienne était variable entre leurs fragments tumoraux, ayant des fragments avec et sans bactéries. Cela pourrait indiquer une infiltration hétérogène des bactéries dans les tumeurs du sein. Dans la cohorte, la majorité des patientes (60 %) avaient une quantification moyenne d'ADN bactérien supérieure à la limite de détection établie par la quantification moyenne de l'ADN humain seul ( $11.9 \pm 5.2$  Éq. bac.). Nous n'avons trouvé aucune association entre le stade pTNM simplifié et la quantification bactérienne, mais nous avons constaté que le nombre de bactéries était plus faible dans les tumeurs de grade III que de grade I-II ( $p=0.038$ ) (**Figure 8C**). Ces résultats suggèrent que la charge bactérienne pourrait être importante pour le pronostic des patientes atteintes du cancer du sein.

Enfin, pour comparer la charge bactérienne dans la tumeur du sein avec des tissus sains appariés, nous avons évalué le contenu bactérien dans les NAT en utilisant la qPCR. Il y avait une différence significative ( $p<0.0001$ ) entre les tumeurs ( $23.8 \pm 17.1$  Éq. bac.) et les NAT appariés ( $151.7 \pm 206.8$ ). Nous avons détecté six fois plus de bactéries dans les tissus sains autour de la tumeur (**Figure 8B - gauche**). En outre, une corrélation positive ( $R=0.53$ ) a été observée entre la charge bactérienne des tumeurs et des NAT appariés (**Figure 8B - droite**). Les patientes avec la plus grande quantité de bactéries dans leur NAT avaient également le microbiote intratumoral le plus important.

## **La dichotomisation de la cohorte selon la quantification des bactéries intratumorales n'induit pas de facteurs confondants.**

Pour évaluer l'effet de la détection bactérienne sur les résultats cliniques des patientes de notre cohorte de cancer du sein, nous avons dichotomisé notre cohorte en deux groupes (**Figure 8A**) selon la médiane de la quantification moyenne ( $14.7$  Éq. bac.) des Éq. bac.: une charge bactérienne intratumorale faible (Éq. bac.  $< 14.7$ ) ou élevée (Éq. bac.  $\geq 14.7$ ).

Selon les données cliniques des patientes dans chaque groupe, nous avons trouvé une association entre la détection bactérienne et la récurrence ( $p=0.018$ ), avec 20/29 (69 %) récurrences locorégionales et distantes se produisant dans le groupe de détection bactérienne faible (**Tableau**

**3).** De plus, l'association entre la détection bactérienne et la survie globale était proche de la signification ( $p=0.082$ ) avec 18/28 (64 %) décès survenant chez les patientes avec un faible contenu bactérien dans leur tumeur. Cela suggère qu'une charge bactérienne faible dans les tumeurs pourrait se traduire par un mauvais pronostic pour les patientes avec un cancer du sein. Par conséquent, cela nous a amenés à évaluer l'impact de la détection bactérienne intratumorale sur les résultats cliniques des patientes avec un cancer du sein grâce à des analyses de survie de Kaplan-Meier.

Tout d'abord, pour déterminer si la séparation des patientes en deux groupes aurait pu créer des facteurs confondants, nous avons contrôlé plusieurs variables clinicopathologiques telles que l'âge, le sexe, le type de cancer, le stade pathologique, le grade et les traitements antérieurs reçus (**Tableau 3**). Aucune association n'a été trouvée entre la détection bactérienne et la majorité des variables clinicopathologiques testées. Or, nous avons obtenu significativement plus de patientes traitées par hormonothérapie néoadjuvante dans le groupe de détection bactérienne faible ( $p=0.027$ ). Cette variable pourrait être un facteur de confusion potentiel dans l'analyse de survie. Cependant, comme les patientes traitées par hormonothérapie néoadjuvante ne représentent qu'une petite partie de notre cohorte ( $N=6$ ), leur impact sur l'analyse serait donc mineur. Puis, les bactéries intratumorales de chaque groupe de détection bactérienne ont été identifiées et analysées afin de déterminer si leur composition microbienne diverge, et pourrait ainsi être responsable en partie des résultats obtenus par les analyses de survie.

**Tableau 3. – Caractéristiques clinico-pathologiques de la cohorte du cancer du sein et leur association avec la quantification bactérienne.**

| Caractéristiques                            | Cohorte entière,<br>n (%) | Détection bactérienne |               | Valeur p |
|---|---------------------------|-----------------------|---------------|----------|
|   |                           | Faible, n (%)         | Élevée, n (%) |          |
| <b>n</b>                                    | 114 (100)                 | 57 (100)              | 57 (100)      |          |
| <b>Sexe, Femelle</b>                        | 113 (99)                  | 57 (100)              | 56 (98)       | 1.000    |
| <b>Temps de suivi (Mois)</b>                |                           |                       |               | 0.851    |
| Médiane (EI)                                | 72 (37-105)               | 72 (38-108)           | 71 (37-105)   |          |
| < 70  | 55 (48)                   | 27 (47)               | 26 (46)       |          |
| ≥ 70  | 59 (52)                   | 30 (53)               | 31 (54)       |          |
| <b>Âge au diagnostic (Années)</b>           |                           |                       |               | 0.574    |
| Médiane (EI)                                | 61 (50-71)                | 62 (52-75)            | 59 (49-67)    |          |
| < 60  | 55 (48)                   | 26 (46)               | 29 (51)       |          |
| ≥ 60  | 59 (52)                   | 31 (54)               | 28 (49)       |          |
| <b>Statut de la ménopause*</b>              |                           |                       |               | 0.441    |
| Préménopause                                | 24 (21)                   | 14 (25)               | 10 (18)       |          |
| Postménopause                               | 79 (69)                   | 39 (68)               | 40 (70)       |          |
| <b>Type d'intervention chirurgical</b>      |                           |                       |               | 0.277    |
| Tumorectomie                                | 67 (59)                   | 36 (63)               | 31 (54)       |          |
| Mastectomie                                 | 44 (39)                   | 19 (33)               | 25 (44)       |          |
| <b>Type de cancer du sein</b>               |                           |                       |               | 0.658    |
| Carcinome invasif tubulaire                 | 9 (8)                     | 3 (5)                 | 6 (11)        |          |
| Carcinome invasif canalaire                 | 85 (75)                   | 44 (77)               | 41 (72)       |          |
| Autres                                      | 20 (18)                   | 10 (18)               | 10 (18)       |          |
| <b>Sous-type de cancer du sein</b>          |                           |                       |               | 0.377    |
| Luminal A                                   | 29 (25)                   | 16 (28)               | 13 (23)       |          |
| Luminal B-like-HER2 <sup>-</sup>            | 22 (19)                   | 9 (16)                | 13 (23)       |          |
| Luminal B-like-HER2 <sup>+</sup>            | 25 (22)                   | 10 (18)               | 15 (26)       |          |
| HER2 <sup>+</sup> (non-luminal)             | 12 (11)                   | 5 (9)                 | 7 (12)        |          |
| Triple-négatif                              | 25 (22)                   | 16 (28)               | 9 (16)        |          |
| <b>Stade pathologique T</b>                 |                           |                       |               | 0.256    |
| pT 0-1                                      | 41 (36)                   | 19 (33)               | 22 (39)       |          |
| pT 2  | 58 (51)                   | 32 (56)               | 26 (46)       |          |
| pT 3-4                                      | 13 (11)                   | 4 (7)                 | 9 (16)        |          |
| <b>Stade pathologique N</b>                 |                           |                       |               | 0.567    |
| pN 0  | 53 (46)                   | 28 (49)               | 25 (44)       |          |
| pN 1-3                                      | 57 (50)                   | 27 (47)               | 30 (53)       |          |
| <b>Grade de Nottingham</b>                  |                           |                       |               | 0.235    |
| I   | 8 (7)                     | 5 (9)                 | 3 (5)         |          |
| II  | 36 (32)                   | 14 (25)               | 22 (39)       |          |
| III   | 70 (61)                   | 38 (67)               | 32 (56)       |          |
| <b>Thérapie adjuvante</b>                   |                           |                       |               | 0.406    |
| Non   | 15 (13)                   | 9 (16)                | 6 (12)        |          |
| Oui   | 99 (87)                   | 48 (84)               | 51 (89)       |          |
| <b>Chimiothérapie</b>                       |                           |                       |               | 0.452    |
| Non   | 52 (46)                   | 28 (49)               | 24 (42)       |          |
| Oui   | 62 (54)                   | 29 (51)               | 33 (58)       |          |
| <b>Hormonothérapie</b>                      |                           |                       |               | 0.255    |
| Non   | 48 (42)                   | 27 (47)               | 21 (37)       |          |
| Oui   | 66 (58)                   | 30 (53)               | 36 (63)       |          |
| <b>Radiothérapie</b>                        |                           |                       |               | 0.548    |
| Non   | 37 (32)                   | 17 (30)               | 20 (35)       |          |
| Oui   | 77 (68)                   | 40 (70)               | 37 (65)       |          |
| <b>Thérapie néoadjuvant</b>                 |                           |                       |               | 0.022    |
| Non   | 100 (88)                  | 46 (81)               | 54 (95)       |          |
| Oui   | 14 (12)                   | 11 (19)               | 3 (5)         |          |
| <b>Chimiothérapie</b>                       |                           |                       |               | 1.000    |
| Non   | 107 (94)                  | 53 (93)               | 54 (95)       |          |
| Oui   | 7 (6)                     | 4 (7)                 | 3 (5)         |          |
| <b>Hormonothérapie</b>                      |                           |                       |               | 0.027    |
| Non   | 108 (95)                  | 51 (89)               | 57 (100)      |          |
| Oui   | 6 (5)                     | 6 (11)                | 0 (0)         |          |
| <b>Radiothérapie</b>                        |                           |                       |               | 0.496    |
| Non   | 112 (98)                  | 55 (96)               | 57 (100)      |          |
| Oui   | 2 (2)                     | 2 (4)                 | 0 (0)         |          |
| <b>Récidive (locorégionale ou distante)</b> | 29 (25)                   | 20 (35)               | 9 (16)        | 0.046    |
| <b>Décès global</b>                         | 28 (25)                   | 18 (32)               | 10 (18)       | 0.082    |

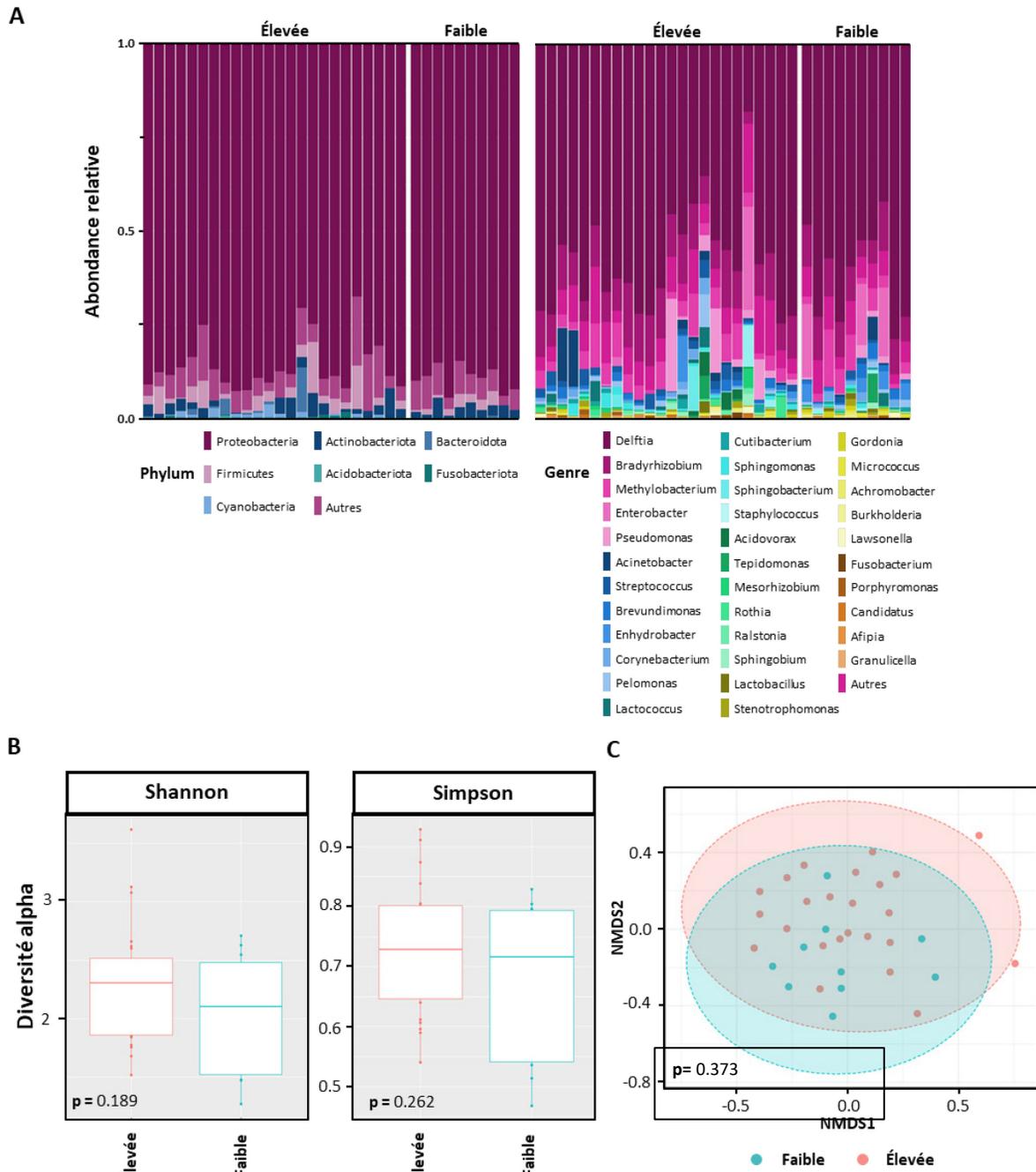
EI : Écart interquartile; ER : Récepteur d'estrogènes; PR : Récepteur de progestérone

\* Imputation de la ménopause: les valeurs manquantes pour les femmes ont été imputées comme préménopausée (moins de 45 ans) ou postménopausée (plus de 55 ans).

## **La composition du microbiote intratumoral mammaire n'est pas significativement différente entre les deux groupes de détection.**

Pour évaluer si la dichotomisation des patientes et les analyses de survie qui en découlent sont influencées par la composition microbienne spécifique à chaque groupe de détection qPCR, 10 échantillons d'ADN tumoral contenant une quantité bactérienne faible et 24 échantillons d'ADN tumoral contenant une quantité bactérienne élevée ont été séquencés, puis comparés.

La composition générale du microbiote au niveau taxonomique du phylum et du genre a tout d'abord été déterminée pour les deux groupes de détection bactérienne (**Figure 9A**). La composition bactérienne des échantillons de tumeurs mammaires montre une distribution homogène entre les échantillons d'une quantité abondante de protéobactéries (autour de 70-80 %), puis de firmicutes et d'actinobactéries en quantité moins importante (environ 5-10 %). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus lors des études de Xuan *et al.* et Urbaniak *et al.* qui caractérisaient le microbiote de la tumeur du sein et du NAT. À part pour les cyanobactéries et les bactéroïdètes observés dans une minorité d'échantillons du groupe élevée, les compositions bactériennes entre les groupes ne divergent pas à l'analyse des phylums et des genres.



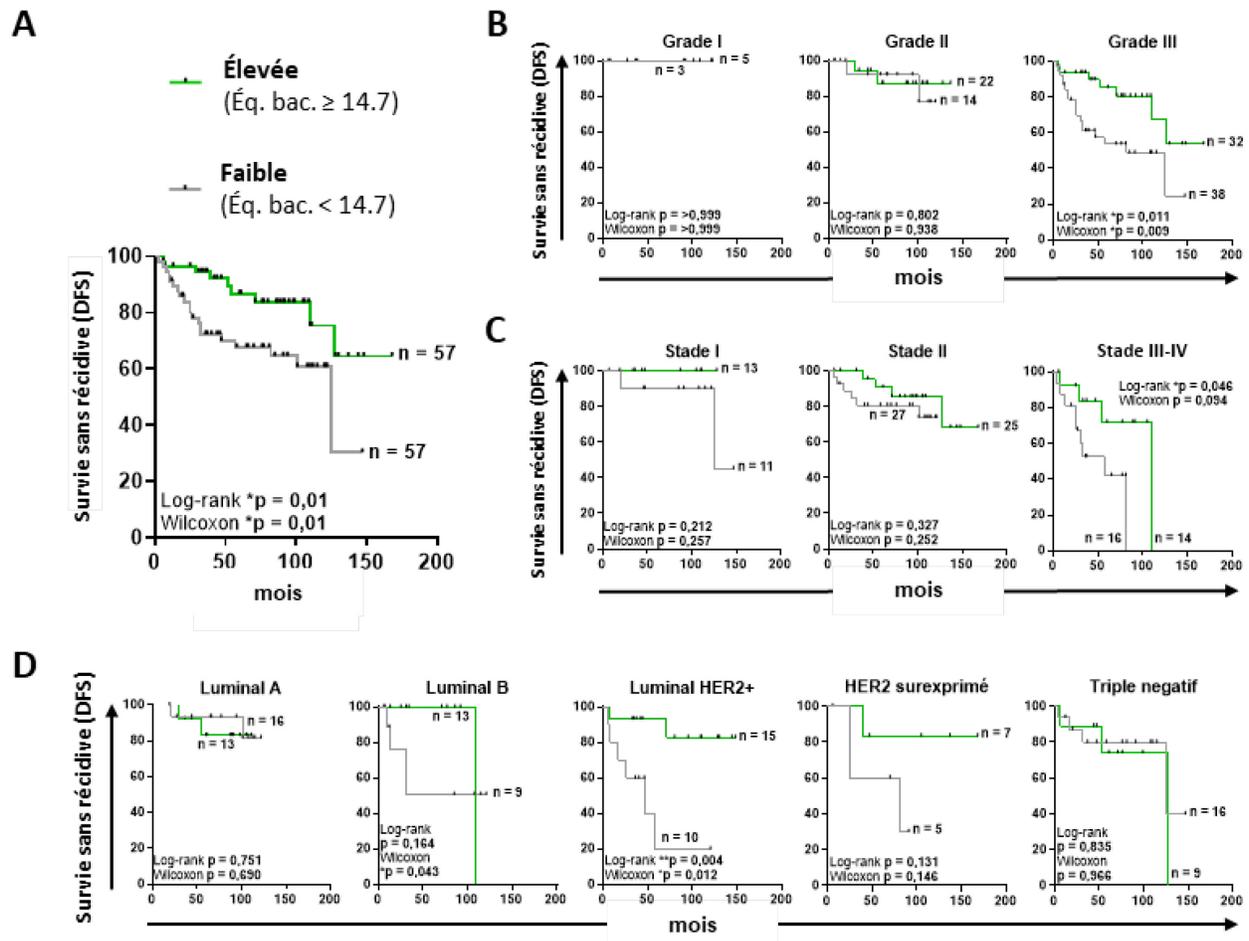
**Figure 9. – La composition et la diversité du microbiote intratumoral ne se différencie pas en fonction de la dichotomisation qPCR de la cohorte du cancer du sein.**

**(A)** Diagramme à barres représentant la composition bactérienne des échantillons tumoraux au niveau du phylum et du genre. L'abondance relative est illustrée pour chaque échantillon (0-100 %) **(B)** Graphique à boîtes représentant la diversité alpha calculée avec les indices de Shannon et de Simpson. **(C)** Bêta diversité déterminée avec un NMDS basé sur l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis.

Pour explorer plus en profondeur les différences dans la composition bactérienne entre les deux groupes de détection, les diversités alpha et bêta ont été évaluées. Malgré une légère tendance à la hausse pour le nombre d'espèces bactériennes (Shannon) et leur uniformité (Simpson) dans les échantillons tumoraux avec une quantification bactérienne élevée, l'analyse de ces indices n'a pas permis de trouver une différence significative (Shannon,  $p=0.189$ ; Simpson,  $p=0.262$ ) dans la diversité alpha des deux groupes (**Figure 9B**). Par la suite, la quantité de taxa spécifiques à chaque groupe a été déterminée en comparant les deux groupes avec l'analyse de positionnement multidimensionnel non métrique (*non-metric multidimensional scaling*, NMDS). L'analyse montre une similarité entre les données des deux groupes, puisqu'aucune séparation évidente n'est observable (**Figure 9C**). Pour s'assurer de la ressemblance entre la composition bactérienne des deux groupes, une analyse LEfSe pour identifier les ASV enrichis dans chaque groupe de détection a été réalisée. Après la correction de la valeur  $p$  avec le FDR (*false discovery rate*), aucune bactérie significativement plus abondante dans un des groupes n'a pu être identifiée, validant ainsi l'homogénéité de la composition bactérienne dans les échantillons tumoraux de la cohorte malgré sa dichotomisation (données non illustrées).

## **Une quantification bactérienne importante dans la tumeur du sein est associée à un meilleur devenir clinique des patientes.**

L'analyse de Kaplan-Meier a démontré une différence significative du risque de récurrence entre les patientes avec une charge bactérienne élevée et faible ( $p=0.01$ ) (**Figure 10A**), présentant un DFS après 5 ans de 86.7 % contre 67.7 % respectivement. Une tendance pour une meilleure OS des patientes possédant une charge bactérienne intratumorale élevée a également pu être observée, principalement dans les premiers mois après la chirurgie (Wilcoxon:  $p=0.081$ ) (**Figure S4A**). La OS à 5 ans était de 86.7 % pour le groupe de détection élevée, contre 71.8 % pour le groupe de détection faible ( $p=0.081$ ).



**Figure 10. – Évaluation de la survie sans récurrence des patientes séparées en fonction de la quantification de leurs équivalents bactériens**

(A) Courbe de Kaplan-Meier pour la DFS de toute la cohorte classée en deux groupes, faible ou élevée, déterminés selon le nombre d'Éq. bac. quantifiés dans leur tumeur avec la technique qPCR. Courbes pour la DFS dans les sous-groupes de patientes avec des Éq. bac. faibles ou élevés classés par (B) le grade, (C) le stade pTNM ou (D) le sous-type de cancer.

Sur la base de ces résultats, la quantification des Éq. bac. dans la tumeur basée sur la qPCR pourrait servir d'outil potentiel afin d'évaluer le risque de récurrence pour les patientes avec un cancer du sein, sans tenir compte des autres variables cliniques. Ensuite, la cohorte de cancer du sein a été séparée en fonction du stade pTNM, du grade et du sous-type du cancer afin d'évaluer si l'effet protecteur d'une détection bactérienne intratumorale élevée était spécifique à certains sous-groupes de patientes. Une survie prolongée (Log-rank:  $p=0.033$ ) et une récurrence moins fréquente (Log-rank:  $p=0.011$ ) ont été constatées pour les patientes cancéreuses de grade III avec

une détection bactérienne élevée, tandis que les bactéries n'avaient aucun effet protecteur chez les patientes cancéreuses de grade I et II (**Figure 10B** et **Figure S4B**). Selon le stade pTNM, des résultats similaires ont été observés quant au plus faible nombre de récurrence (Log-rank:  $p=0.046$ ) chez les patientes cancéreuses de stade III-IV (**Figure 10C**).

Pour résumer, nous avons remarqué que la quantification bactérienne dans les tumeurs du sein pouvait être utilisée comme facteur pronostique principalement chez les patientes atteintes d'une maladie avancée. De plus, les patientes avec un sous-type luminal HER2<sup>+</sup> (voir le **Tableau 1** pour la classification en sous-types moléculaires) étaient les plus affectées par les variations de charge bactérienne dans leur tumeur. Les patientes avec ce sous-type de cancer ayant un faible nombre de bactéries dans leur tumeur avaient significativement plus de récurrence (Log-rank:  $p=0.004$ ) et de décès ( $p=0.003$ ) (**Figure 10D** et **Figure S4D**). Pour ce sous-type, la détection des Éq. bac. pourrait être une indication puissante de la survie à long terme de la patiente et de son risque de récurrence. Il y avait également une tendance à un nombre de récurrence plus faible chez les patientes avec des sous-types de cancer du sein luminal B (Wilcoxon:  $p=0.043$ ) ou HER2 surexprimé (Log-rank:  $p=0,131$ ) avec une charge bactérienne élevée, cependant, ces groupes étaient sous-représentés alors ces résultats devront être validés avec plus de patientes.

Les **Tableaux 4** et **S1** fournissent les résultats d'analyses univariées effectuées sur plusieurs variables clinicopathologiques et sur l'infiltration bactérienne intratumorale pour valider leur importance clinique. La charge bactérienne a été identifiée comme un facteur pronostique univarié significatif pour le risque de récurrence (HR=0.38,  $p=0.018$ ), mais pas pour la survie globale à long terme (HR=0.57,  $p=0.151$ ). Sur la base de ces résultats, nous avons décidé de concentrer l'analyse sur la DFS uniquement (**Tableau S1**). Comme prévu, un pN (HR= 3.21,  $p=0.007$ ) et un grade (HR=4.42,  $p=0.006$ ) élevés étaient des facteurs pronostiques significatifs d'une mauvaise DFS, tandis que les traitements adjuvants (HR=0.21,  $p<0.001$ ) avaient un effet protecteur significatif. Nous avons également identifié l'hormonothérapie néoadjuvante comme un facteur pronostique négatif significatif (HR=3.10,  $p=0.038$ ). Aucune différence n'a été trouvée dans la DFS des patientes séparées selon la taille de leur tumeur ou le sous-type de leur cancer. Plusieurs modèles multivariés de risques proportionnels de Cox ont été créés pour inclure les variables univariées significatives et évaluer leur impact sur la capacité pronostique de la charge

bactérienne (**Tableau 4**). Les résultats montrent que l'infiltration bactérienne intratumorale est un facteur pronostique positif significatif indépendant du stade pathologique simplifié (pTNM), du grade, de la thérapie adjuvante et de l'hormonothérapie néoadjuvante. Dans un modèle comprenant la charge bactérienne, l'hormonothérapie néoadjuvante a perdu de sa signification ( $p=0.181$ ) suggérant que la caractérisation de l'infiltration bactérienne intratumorale est un facteur pronostique plus puissant.

Nos analyses suggèrent donc que la quantification bactérienne basée sur la qPCR pourrait être utilisée en association avec d'autres paramètres cliniques pour évaluer le risque de récurrence chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.

**Tableau 4. – Analyses univariées et multivariées des variables clinicopathologiques associées à la récurrence.**

|   | Analyse univariée |                |                  | Analyse multivariée |                |                  |
|---|-------------------|----------------|------------------|---------------------|----------------|------------------|
|   | HR                | (95% IC)       | Valeur p         | HR                  | (95% IC)       | Valeur p         |
| <b>Modèle 1</b>                         |                   |                |                  |                     |                |                  |
| Stade pTNM                              | 3.06              | (1.59 - 5.87)  | <b>0.001</b>     | 3.26                | (1.68 - 6.34)  | <b>0.001</b>     |
| Infiltration bactérienne intratumorale* | 0.38              | (0.17 - 0.85)  | <b>0.018</b>     | 0.39                | (0.17 - 0.91)  | <b>0.028</b>     |
| <b>Modèle 2</b>                         |                   |                |                  |                     |                |                  |
| Grade                                   | 4.42              | (1.53 - 12.74) | <b>0.006</b>     | 4.38                | (1.52 - 12.65) | <b>0.006</b>     |
| Infiltration bactérienne intratumorale* | 0.38              | (0.17 - 0.85)  | <b>0.018</b>     | 0.39                | (0.17 - 0.86)  | <b>0.020</b>     |
| <b>Modèle 3</b>                         |                   |                |                  |                     |                |                  |
| Thérapie adjuvante                      | 0.21              | (0.09 - 0.47)  | <b>&lt;0.001</b> | 0.22                | (0.10 - 0.50)  | <b>&lt;0.001</b> |
| Infiltration bactérienne intratumorale* | 0.38              | (0.17 - 0.85)  | <b>0.018</b>     | 0.40                | (0.17 - 0.90)  | <b>0.027</b>     |
| <b>Modèle 4</b>                         |                   |                |                  |                     |                |                  |
| Hormonothérapie néoadjuvante            | 3.10              | (1.07 - 8.99)  | <b>0.038</b>     | 2.12                | (0.71 - 6.38)  | 0.181            |
| Infiltration bactérienne intratumorale* | 0.38              | (0.17 - 0.85)  | <b>0.018</b>     | 0.42                | (0.18 - 0.97)  | <b>0.042</b>     |

HR : Hazard ratio; IC : Intervalle de confiance; \* : Variable dichotomique

Voir **Tableau S1** pour les analyses univariées détaillées (DFS et OS)



## Chapitre 5 – Discussion et perspectives

L'impact régulateur d'un microbiote sur le développement du cancer n'est pas limité qu'à la communauté bactérienne intestinale et au CRC. Différents types de microbiotes deviennent des facteurs de risque à évaluer dans l'oncogénèse locale, notamment les microbiotes intratumoraux. En effet, l'influence des bactéries sur l'inflammation, la réponse immunitaire antitumorale, la réponse aux traitements, le métabolisme et plusieurs autres processus physiologiques encouragent des études approfondies sur leur rôle dans le microenvironnement tumoral. Le cancer du sein est une maladie mortelle malgré les avancées dans la prise en charge des patientes et les traitements, principalement en raison de la récurrence métastatique qui reste difficile à prédire et à prévenir. La présence de bactéries dans la tumeur mammaire qui influenceraient les processus cellulaires et physiologiques nommés précédemment pourrait avoir un impact sur la survie des patientes, mais ce rôle n'a pas été déterminé jusqu'à présent. C'est pourquoi nous voulions étudier dans ce projet l'influence du microbiote intratumoral mammaire sur le risque de récurrence et de décès des patientes avec un cancer du sein.

Dans notre étude, l'existence d'une population bactérienne intratumorale mammaire a tout d'abord été observée par la révélation de multiples composants bactériens (LPS, PGLY et ARNr 16S) sur des coupes de tumeurs du sein. Ensuite, la caractérisation de la charge bactérienne des tumeurs mammaires et des NAT à l'aide de la qPCR a permis d'identifier une altération du microbiote au cœur du microenvironnement tumoral. Une réduction importante du microbiote dans la tumeur, caractérisée par une charge bactérienne faible (Éq. bac. < 14.7), a été associée à un nombre de récurrence plus élevée pour la patiente, comparativement à une tumeur composée d'une population bactérienne plus importante (Éq. bac. ≥ 14.7). Notre étude est la première à établir que le microbiote intratumoral peut avoir une influence sur le devenir clinique des patientes atteintes d'un cancer du sein. Contrairement à notre hypothèse de départ, aucune influence de la composition du microbiote intratumoral mammaire sur le devenir clinique n'a pu être observée jusqu'à présent. Il a toutefois été possible de valider l'hypothèse selon laquelle la quantité de bactéries intratumorales est un biomarqueur intéressant pour l'identification des patientes à risque de récurrence.

Dans les prochaines sections, un résumé des résultats présentés au chapitre 4 sera réalisé en les remettant en contexte avec la littérature récente qui décrit la relation entre le microbiote et le cancer. Des expériences seront également proposées pour la poursuite du projet afin d'obtenir une compréhension plus approfondie sur le rôle du microbiote intratumoral mammaire dans la survie des patientes.

## Détection d'un microbiote intratumoral du sein humain

### Marquages du LPS, du PGLY et de l'ARNr 16S

#### RETOUR SUR LES RÉSULTATS

Nous avons présenté les expériences de détection des composants bactériens dans des tumeurs de patientes (N=6) afin de valider la présence d'un microbiote intratumoral dans le sein (**Figure 6 et 7**). La détection de composants bactériens dans les tumeurs du sein était attendue, considérant l'étude de Xuan *et al.* qui rapportait la présence des gènes de l'ARNr 16S quantifiés avec la qPCR dans le microenvironnement tumoral mammaire (190). Or, puisque la biomasse bactérienne est probablement faible dans les tissus profonds, il peut y avoir des biais lors de l'utilisation de la technique qPCR causés par de l'ADN bactérien contaminant (discuté à la prochaine section). Il est ainsi primordial de combiner des techniques (qPCR, IHC et FISH) de détection bactérienne dans les tissus profonds afin de s'assurer de la présence d'un microbiote local.

Les marquages moléculaires permettent aussi de décrire la localisation des bactéries dans les tissus, ainsi que leur relation avec les cellules qui s'y trouvent. L'observation des composants bactériens dans les tumeurs mammaires démontre une affinité des bactéries pour les tissus adipeux et le stroma, avec peu d'infiltration dans les cellules tumorales (**Figure 6, A et B**). Il a été montré que l'établissement de bactéries intestinales dans certains tissus adipeux (subcutané, omental et mésentérique) à la suite d'une translocation bactérienne menait à la formation d'une communauté composée principalement de protéobactéries et de firmicutes (210). De plus, une étude a montré une corrélation positive entre le métabolisme des acides gras et la présence de protéobactéries et de firmicutes, en particulier les *Bacilli* (211). Ainsi, les protéobactéries et les firmicutes, deux phylums formant une majorité du microbiote du tissu et de la tumeur mammaire

(**Figure 9A** pour la composition de la tumeur), pourraient se retrouver principalement dans le tissu adipeux grâce à leurs capacités métaboliques y favorisant leur croissance. Puis, il a été établi qu'une hypoxie intermittente dans le microbiote intestinal affectait négativement l'abondance des protéobactéries et des bactéroïdètes, mais pas des firmicutes (212). Donc, il est possible que le milieu hypoxique de la tumeur mammaire limite l'infiltration d'une partie de la population bactérienne du sein dans le microenvironnement tumoral.

Jusqu'à tout récemment, la révélation de différents composants bactériens dans la tumeur mammaire n'avait jamais été réalisée. Toutefois, un groupe (Nejman *et al.*, 2020) vient de publier une étude décrivant la distribution du LPS, de l'ARNr 16S et de l'acide lipotéichoïque (LTA), présent à la surface des bactéries Gram-positif, dans sept types de cancers, incluant le cancer du sein (213). Si l'utilisation du même anticorps anti-LPS et de la même sonde ciblant l'ARNr 16S (EUB338) leur a permis, comme dans notre étude, de détecter ces composants bactériens dans les tumeurs mammaires, leur caractérisation de la présence bactérienne dans les tumeurs du sein présente des différences importantes. Leurs signaux positifs (LPS et ARNr 16S) sont retrouvés principalement à l'intérieur des cellules tumorales et immunitaires, et ceux-ci sont très abondants dans la tumeur, recouvrant une surface majoritaire des TMA (*tissu microarray*). Au contraire, nos résultats, autant avec l'anti-LPS et -PGLY que la sonde EUB338, présentent une population limitée de bactéries parmi les cellules tumorales, les adipocytes ou les fibroblastes sur des coupes complètes de tumeurs (**Figure 6 et 7**). Par ailleurs, la localisation du signal semble principalement extracellulaire dans nos tumeurs, bien que certaines bactéries intracellulaires aient été observées dans les macrophages du canal lactifère ou dans des cellules du tissu. Dans leur étude, Nejman *et al.* montrent par quantification des gènes de l'ARNr 16S que la charge bactérienne intratumorale est semblable dans les tissus mammaires et pancréatiques (213). Pourtant, leur détection de composants bactériens avec l'IHC et le FISH est plus abondante que ce qui est obtenu par Geller *et al.* lors de leur étude du microbiote des tumeurs pancréatiques (174). Geller *et al.* rapportent plutôt des résultats similaires à nos observations dans le tissu mammaire au niveau de la quantité de composants bactériens et de leur localisation (174).

Dans notre étude, nous avons porté une attention particulière lors de l'optimisation de la dilution des anticorps pour l'IHC et de la technique du FISH à la possibilité d'un marquage non

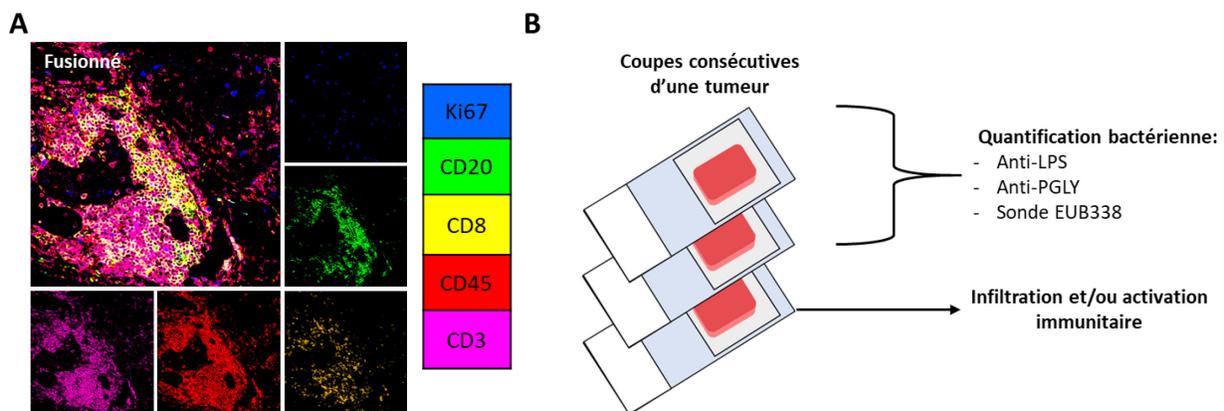
spécifique dans les cellules mammaires du tissu. C'est pourquoi, lors de l'optimisation, des cellules MDA-MD-231 ont été utilisées comme contrôle pour vérifier cette éventualité et adapter la méthodologie (Ex. : augmenter la dilution des anticorps ou de la sonde) (**Figure S1**). Malgré les optimisations sur la lignée cellulaire, une variabilité de la spécificité des anticorps et de la sonde entre les lames a pu être observée lors de l'utilisation du FISH, mais aussi en IHC même si le processus est automatisé. Plusieurs contrôles ont donc été ajoutés comme la sonde NonEUB et l'anticorps isotypique pour vérifier la localisation du signal non spécifique dans le tissu mammaire et valider le marquage positif. Également, les culots de cellules MDA-MB-231 et d'*E. coli* ont été analysés en parallèle à chaque expérience qui visait la détection de composants bactériens dans les tissus mammaires. Le contrôle interne a permis de s'assurer que l'absence de signal n'était pas due à un problème lors de la technique par l'observation des *E. coli* contrôles, ou au contraire, qu'un signal trop intense ne soit pas dû à un marquage non spécifique par l'observation des MDA-MB-231 contrôles. Ainsi, grâce à tous ces contrôles, nous sommes confiants de nos marquages. Il est possible que les résultats obtenus par Nejman *et al.* qui présentent un signal positif étendu à la majorité des cellules de leur TMA de tumeurs mammaires soient dus en partie à un marquage non spécifique de l'anticorps et de la sonde, puisque l'étude ne présente aucune validation de leur technique et aucun contrôle de spécificité (contrôle isotype et NonEUB).

#### PERSPECTIVES

Tout d'abord, nos conclusions ont été réalisées par l'observation d'un petit nombre de coupes tumorales complètes (N=6). Il est possible que les tumeurs mammaires analysées aient été faiblement infiltrées par les bactéries. De plus, ce faible nombre d'échantillons ne permet pas de prendre en considération l'hétérogénéité de la présentation clinique du cancer du sein. Ainsi, il est important de confirmer nos résultats quant à la localisation et l'abondance des composants bactériens à l'aide d'un échantillon de tumeurs mammaires plus large. Pour ce faire, nous voulons tester prochainement le marquage du LPS, du PGLY et de l'ARNr 16S sur les TMA de la cohorte QBCF-TMAC, contenant 2000 échantillons de tumeurs mammaires provenant du CHUM, du CUSM et du CHUQ.

Ensuite, il est important de mieux comprendre les processus fondamentaux qui expliquent une meilleure survie des patientes atteintes de cancer du sein lors de la présence d'un microbiote

intratumoral important. Dans notre étude, la relation observée entre les macrophages du canal lactifère et les composants bactériens donnent un aperçu de l'influence des bactéries sur la réponse immunitaire. Nous voulons aller plus loin en évaluant la relation qui pourrait exister entre la présence d'un microbiote intratumoral important et le recrutement des cellules du système immunitaire. L'expérience consisterait à marquer des coupes consécutives de tumeurs complètes avec la sonde EUB338, l'anti-LPS, l'anti-PGLY et notre « *panel* » d'anticorps pour la détection et l'identification des cellules immunitaires présentes sur le tissu en utilisant l'IF (**Figure 11, A et B**). Puis, on corrèlerait la quantité de bactéries calculée en utilisant les différentes techniques de marquage avec la quantité de cellules immunitaires dans la tumeur mammaire afin d'évaluer l'impact des bactéries intratumorales sur le recrutement des cellules immunitaires. Une expérience similaire, mais utilisant cette fois-ci un « *panel* » d'anticorps ciblant des marqueurs d'activation et des cytokines, permettrait de déterminer l'influence du microbiote intratumoral sur la stimulation de la réponse immunitaire.



**Figure 11. – Technique pour l'évaluation de l'impact de la charge bactérienne intratumorale sur l'infiltration immunitaire.**

**(A)** Marquages représentatifs des leucocytes (CD45<sup>+</sup>), soit les lymphocytes T cytotoxiques (CD8<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) et B (CD20<sup>+</sup>), dans une tumeur mammaire. **(B)** Représentation de l'expérience future pour déterminer la corrélation entre l'infiltration immunitaire, calculée à l'aide du « *panel* » d'anticorps illustrés en **A**, et la quantité de composants bactériens intratumoraux.

## Quantification des gènes de l'ARNr 16S

### RETOUR SUR LES RÉSULTATS

Nous avons présenté les résultats de la caractérisation de la charge bactérienne dans 114 tumeurs mammaires et 16 NAT appariés (**Figure 8, A et B**). La technique qPCR utilisée est adaptée de la méthode de Geller *et al.* et consiste à amplifier les gènes de l'ARNr 16S à l'aide de quatre paires d'amorces ciblant la région V6 et d'évaluer le nombre de bactéries à l'aide de la quantité d'ADN obtenue (174). Elle permet d'analyser l'ensemble de la communauté bactérienne de la tumeur, en prenant à la fois en considération les bactéries probiotiques et pathogènes dans l'estimation de la quantité bactérienne intratumorale.

Lors de la caractérisation de la charge bactérienne dans les tissus mammaires de notre cohorte, nous avons observé une différence significative entre la quantité de bactéries retrouvées dans les tumeurs du sein et les NAT appariés (**Figure 8B – gauche**). Six fois plus d'Éq. bac. ont pu être détectées dans le NAT que dans la tumeur mammaire, tandis que Xuan *et al.* ont plutôt obtenu dix fois plus de bactéries dans le NAT (190). La méthodologie utilisée par Xuan *et al.* pour la quantification peut expliquer la légère différence entre nos résultats. Notamment, l'utilisation d'amorces ciblant une autre région de l'ARNr 16S (V2) que celle visée par notre technique (V6) pourrait être la cause principale de cette divergence (214), mais aussi l'extraction de l'ADN à partir de tissus FFPE, la courbe standard et la normalisation des résultats. Malgré cette différence, les résultats obtenus par Xuan *et al.* et notre étude confirment une altération du microbiote mammaire dans le microenvironnement tumoral du sein humain. Il est possible que l'hypoxie dans la tumeur et d'autres mécanismes mis en place par les cellules tumorales dans le microenvironnement limitent la survie et/ou la prolifération des bactéries intratumorales. Dans notre étude, nous avons aussi observé une corrélation entre l'abondance des bactéries dans la tumeur et le NAT apparié. Il a été proposé comme hypothèse que les bactéries intratumorales puissent provenir de la circulation sanguine qui alimente la tumeur, ou bien des tissus sains environnants (213). Il a été observé que l'augmentation de l'abondance des bactéries dans le NAT est liée à l'augmentation de l'abondance des bactéries dans la tumeur appariée, supportant l'idée que les bactéries puissent infiltrer la tumeur à partir des tissus adjacents. D'ailleurs, ces résultats supportent les conclusions établies quant à l'affinité des bactéries du microbiote mammaire pour

les tissus adipeux et le stroma, comme cela a été démontré avec le marquage moléculaire des composants bactériens.

Dans les tumeurs du sein caractérisées, et aussi parmi les fragments de la même tumeur, la charge bactérienne calculée est variable (**Figure 8A**). Ainsi, plusieurs tumeurs possèdent une population bactérienne aussi abondante que certains NAT, tandis que d'autres tumeurs ont une charge bactérienne sous le seuil de détection de la qPCR. Globalement, nous avons détecté les gènes de l'ARNr 16S dans 68/114 (60 %) tumeurs mammaires analysées, supportant par le fait même la présence d'un microbiote intratumoral grâce à la détection de l'ADN bactérien dans la tumeur du sein humain, en plus du LPS, du PGLY et de l'ARNr 16S. Cette détection est similaire à celle obtenue par Nejman *et al.* qui montrent une proportion de 62.7 % de tumeurs mammaires avec une détection positive de l'ADN bactérien (213). De plus, l'hétérogénéité de la quantification bactérienne obtenue pour chaque fragment de tumeur peut être expliquée partiellement par la nature même du tissu composant le fragment tumoral. Comme il a été démontré précédemment avec les marquages moléculaires, la quantité bactérienne est moindre dans l'agrégat tumoral en comparaison des tissus adipeux et du stroma. Ainsi, un fragment contenant une concentration plus élevée de stroma par exemple pourrait être associé à une quantification bactérienne plus élevée. Toutefois, cette variabilité pourrait seulement être attribuable à une hétérogénéité de l'infiltration bactérienne dans les différentes sections de la tumeur, comme cela est observable pour l'infiltration immunitaire dans le cancer du sein (215, 216).

L'abondance du microbiote intratumoral quantifiée à l'aide de la qPCR peut varier entre les études en raison de la méthodologie choisie, en particulier de la région variable ciblée et des paires d'amorces « universelles » utilisées. L'objectif était d'utiliser une technique qui détecte l'ensemble des bactéries présentes dans un échantillon afin de limiter la sous-représentation de certaines espèces qui pourraient avoir de l'importance clinique. Les différentes régions variables (V1-V9) du gène de l'ARNr 16S possèdent toutes des séquences conservées qui sont importantes pour le fonctionnement de l'ARNr 16S (voir structure du gène à la **Figure 12**). Or, les régions conservées n'offrent pas toutes la possibilité de développer des paires d'amorces « universelles » fiables, puisque certaines présentent tout de même une variabilité au niveau de leur séquence nucléotidique. Il a été suggéré que les régions variables de la classe I (V4 à V6), qui forment des

structures essentielles à la fonction de l'ARNr 16S telles que le 690 *hairpin* et le centre de décodage, pourraient évoluer plus lentement et donc, présenter une meilleure stabilité (214). De ce fait, en ciblant les régions conservées encadrant la région V6 lors de la qPCR, nous optimisons la probabilité de détecter et quantifier la majorité des bactéries du microbiote intratumoral du sein. De plus, pour augmenter nos chances d'avoir une quantification optimale de la population bactérienne intratumorale mammaire, quatre paires d'amorces dégénérées ont été utilisées. Les amorces dégénérées permettent d'accommoder des séquences conservées qui présentent des mutations à des positions moins préservées entre les espèces bactériennes, ce qui augmente la sensibilité de la qPCR pour la détection bactérienne, mais réduit la spécificité des amorces (217). C'est pour cette raison que les contrôles d'ADN humain seulement ont été ajoutés à chaque qPCR pour évaluer les Éq. bac. quantifiés à cause de la liaison non spécifique des amorces dans les échantillons d'ADN humain et bactérien. Grâce à cette méthodologie qui favorise la sensibilité et qui considère les faux positifs, nous sommes confiants de notre quantification du microbiote intratumoral mammaire. Toutefois, il aurait été intéressant de quantifier d'autres régions V du gène de l'ARNr 16S afin de valider notre caractérisation du microbiote intratumoral mammaire.



**Figure 12. – Représentation de la structure du gène de l'ARNr 16S formé de régions variables et conservées (adapté de (218)).**

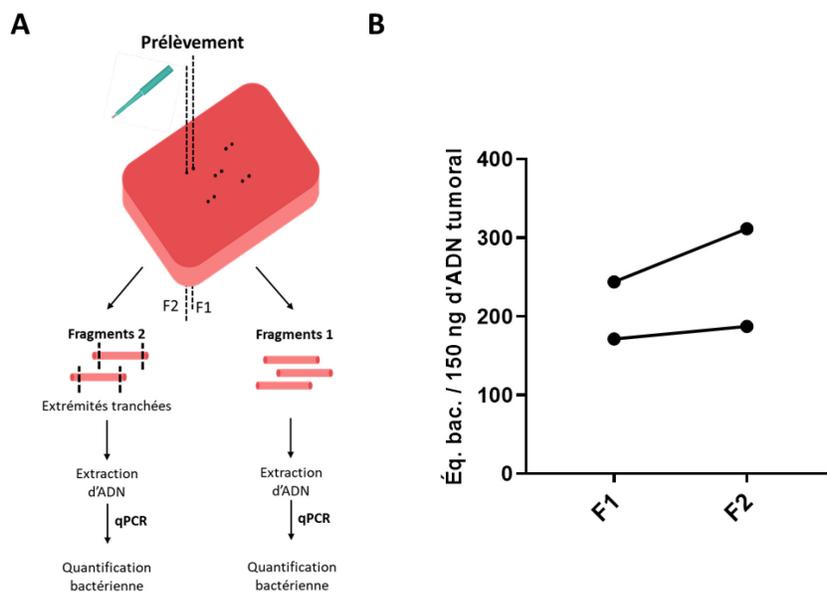
Une limitation importante de la technique utilisée pour la caractérisation du microbiote intratumoral mammaire, qui a une petite biomasse, est la contamination par de l'ADN bactérien qui pourrait biaiser la quantification bactérienne de nos échantillons. La qPCR est une technique avec une sensibilité élevée, ce qui a permis la révélation d'une présence bactérienne dans des localisations corporelles pensées préalablement stériles. Or, la sensibilité élevée de la qPCR fait en sorte qu'elle détecte aussi efficacement les contaminants incorporés dans les échantillons lors des manipulations (219). Il a été démontré par Salter *et al.* que les sources de contamination par

de l'ADN bactérien étaient variées en laboratoire, allant jusqu'aux réactifs et aux kits d'extraction d'ADN utilisés pour préparer l'échantillon d'ADN tumoral (220). Lors de notre étude, nous avons suivi une méthodologie pour réduire l'impact de la contamination sur nos résultats, en utilisant du matériel *microbial DNA-free* validé par qPCR (eau et microtube), en manipulant dans un environnement contrôlé et nettoyé (hotte biologique) et en incluant des contrôles tels que de l'eau stérile lors de l'extraction d'ADN et un NTC lors de la qPCR pour vérifier la contamination engendrée par les manipulations (219). Cette méthodologie permet de diminuer le risque de contamination dans le laboratoire, mais elle ne garantit pas l'asepsie lors de la prise en charge de la tumeur à l'hôpital. Si le maintien d'un environnement aseptique est important lors de l'intervention chirurgicale pour réduire le risque de maladies nosocomiales pour les patients (221), il n'en ait pas de même pour la procédure en pathologie qui vise à préparer l'échantillon tumoral pour l'archivage. Il est possible qu'une contamination bactérienne de nos échantillons provienne de l'hôpital. Or, les échantillons tumoraux ont tous été traités de manière similaire lors de leur préparation en pathologie ce qui a probablement nivelé de potentielles contaminations, n'ayant pas d'impact significatif sur la séparation des patientes en groupe de détection élevée ou faible pour les analyses subséquentes.

#### PERSPECTIVES

Puisque la contamination avec de l'ADN bactérien est une critique récurrente dans ce type de projet, il faut s'assurer que les manipulations soient faites de manière la plus stérile possible. Malgré l'utilisation de multiples contrôles pour évaluer ou réduire cette contamination dans le laboratoire, très peu d'informations sont disponibles concernant la contamination bactérienne provenant du processus d'excision et de préparation de l'échantillon tumoral en pathologie. Dans l'étude d'Urbaniak *et al.*, un tube contenant un tampon phosphate salin (*phosphate-buffered saline*, PBS) a été laissé ouvert durant l'intervention chirurgicale, puis a suivi le processus d'extraction d'ADN pour être utilisé à titre de contrôle de la contamination aérienne pendant l'opération (119). Nous voulions évaluer plus spécifiquement la contamination bactérienne introduite par les manipulations des pathologistes qui s'occupent de plusieurs types de tissus ayant une biomasse bactérienne variée (intestin, foie, pancréas) dans le même environnement (hotte, équipement) que nos tumeurs mammaires. Ainsi, nous avons développé une expérience

qui consiste à faire deux biopsies contigües à l'aide d'un emporte-pièce (*punch* à biopsie) stérile sur l'échantillon tumoral frais lors de la réception du tissu en provenance de l'hôpital (**Figure 13A**). Les extrémités d'une des carottes tumorales obtenues par le « *punch* » à biopsie sont coupées à l'aide d'un scalpel stérile (fragment 2, F2) puisque celles-ci ont été en contact avec les surfaces et équipements lors de l'excision de la tumeur. Les manipulations en pathologie sont rapides alors on présume que les bactéries contaminantes n'ont pas eu le temps d'infiltrer profondément le tissu et sont ainsi retrouvées principalement à la surface. Puis, l'ADN de chaque carotte, avec (F1) ou sans (F2) extrémités, est extrait et le nombre d'Éq. bac. est quantifié avec la qPCR afin de déterminer si la contamination bactérienne en pathologie a un impact significatif sur la quantification de nos échantillons tumoraux. Les résultats démontrés à la **Figure 13B** sont préliminaires et l'expérience devra être poursuivie sur plusieurs échantillons, ce qui peut s'échelonner sur une longue période à cause de la nécessité d'obtenir des échantillons tumoraux frais. Cependant, jusqu'à présent, il ne semble pas y avoir une tendance apparente montrant une quantité plus importante d'Éq. bac. en conservant les extrémités, suggérant que la contamination bactérienne à l'hôpital pourrait être négligeable.



**Figure 13. – Expérience pour l'évaluation de la contamination bactérienne introduite dans les échantillons par la manipulation à l'hôpital.**

**(A)** Représentation du protocole développé pour évaluer la contamination à la surface d'un échantillon tumoral frais à sa réception au laboratoire. **(B)** Résultats préliminaires réalisés sur deux paires (F1-F2) de fragments pour évaluer la faisabilité de l'expérience.

## Dichotomisation de notre cohorte du cancer du sein

### La stratification des patientes et les facteurs confondants

RETOUR SUR LES RÉSULTATS

Pour évaluer si l'abondance du microbiote intratumoral a un impact sur le devenir clinique des patientes de la cohorte du cancer du sein (N=114), nous l'avons séparé en deux groupes de détection bactérienne, élevée ou faible, en utilisant la médiane (**Figure 8A**, médiane=14.7 Éq. bac.) puis nous avons évalué la survie (OS, DFS) respective à chaque groupe (N=57). La dichotomisation est utile d'un point de vue clinique afin de trouver une vraie valeur seuil (*true threshold value*) permettant rapidement de stratifier les patientes en fonction de leur niveau de risque. Or, le choix de la médiane à titre de seuil de séparation est discutable. La médiane ou la moyenne ont souvent été utilisées pour la dichotomisation afin de simplifier l'interprétation et

les analyses statistiques, mais l'utilisation de ces valeurs réduit la comparaison des résultats interétudes et ne représente pas nécessairement la vraie valeur seuil (222).

Pour soutenir l'utilisation de notre médiane comme seuil de séparation, nous avons utilisé le programme X-Tile (Université de Yale, USA) permettant de trouver la valeur seuil minimisant la valeur p en suivant une méthode statistique rigoureuse impliquant un « *training set* » puis un « *validation set* » (223). D'ailleurs, il a été démontré que la maximisation du  $\chi^2$  (khi carré), la statistique utilisée par X-Tile, est une méthode peu biaisée et avec une faible variabilité permettant de trouver la vraie valeur seuil (222). En utilisant X-Tile, il a été possible de vérifier si la dichotomisation de notre cohorte donnait un meilleur résultat que sa séparation optimale en trois groupes de détection : faible (<6 Éq. bac.), moyen (entre 6 et 26 Éq. bac.) et élevé (>26 Éq. bac.). Même si la séparation en trois groupes démontrait une amélioration graduelle du devenir clinique en fonction de l'augmentation du nombre d'Éq. bac. intratumoraux, la meilleure séparation était obtenue par la dichotomisation de la cohorte avec une valeur seuil d'environ 13 à 15 Éq. bac. Cette valeur seuil se rapprochait de la médiane, alors nous avons décidé de poursuivre avec cette dernière. Évidemment, des études supplémentaires devront être menées sur des cohortes plus importantes afin de valider et préciser la valeur seuil optimale.

Un problème majeur lié à la dichotomisation d'une cohorte est la production de facteurs confondants qui viennent complexifier et biaiser l'interprétation des résultats. Nous avons vérifié la répartition des variables les plus fréquemment contrôlées dans les études cliniques portant sur le cancer du sein, telles que le stade pTNM, le grade, le sous-type et les traitements néoadjuvants et adjuvants, entre les deux groupes de détection bactérienne (**Tableau 3**). Il y a trois critères pour qu'une variable soit considérée comme un facteur confondant (biais) : être un facteur de risque pour le cancer du sein, être associée avec la détection bactérienne et ne pas être un effet de la détection bactérienne (224). Dans notre étude, la seule association trouvée entre une variable clinicopathologique et la détection bactérienne implique le traitement néoadjuvant et plus précisément, la thérapie hormonale néoadjuvante. Cela facilite fortement l'interprétation des résultats de survie puisque notre étude ne comprend qu'une seule variable pouvant être un potentiel facteur confondant. Tout d'abord, il a été démontré par l'étude du microbiote de la bouche que la transformation d'estrogène et de progestérone en vitamine K avait un effet positif

sur la croissance de certaines bactéries (225, 226). Or, il a aussi été démontré que l'estrogène et la progestérone protègent l'intégrité de la muqueuse intestinale, réduisant par le fait même la translocation bactérienne et leur migration dans des tissus distants (voie entéromammaire) (227, 228). Avec ces résultats, l'association entre l'hormonothérapie (inhibiteur de l'aromatase) et la détection bactérienne intratumorale reste incertaine, puisqu'une diminution des hormones sexuelles féminines pourrait favoriser ou au contraire, réduire la présence de bactéries dans la tumeur. Il manque aussi un lien apparent entre le devenir clinique et l'hormonothérapie néoadjuvante. Elle est principalement utilisée pour réduire le stade de la tumeur et faciliter une intervention chirurgicale conservatrice, et non pour réduire le risque de récurrence comme la thérapie hormonale adjuvante (229). Elle est aussi associée à un risque de récurrence et de décès similaire à la chimiothérapie néoadjuvante (230). En considérant les connaissances actuelles, nous avons décidé de conserver les patientes ayant suivi une thérapie hormonale néoadjuvante puisque la variable ne semble pas remplir tous les critères d'un facteur confondant. En plus, il est possible que le faible nombre de patientes ayant reçu de l'hormonothérapie néoadjuvante (N=6) ne nous permette pas d'évaluer précisément l'association de cette variable avec la détection bactérienne.

#### PERSPECTIVES

Plusieurs variables qui sont d'intérêts dans les études sur le microbiote n'ont pas pu être contrôlées à cause de l'absence de ces informations dans les dossiers cliniques des patientes de notre cohorte. C'est le cas de la consommation de tabac, de la prise d'antibiotiques et de probiotiques et de l'allaitement entre autres. L'utilisation d'antibiotiques pourrait moduler la présence bactérienne intratumorale. Or, il a aussi été démontré que l'utilisation de doxycycline, un antibiotique, réduit le nombre de cellules souches cancéreuses qui favorisent la récurrence du cancer du sein (231). Puisque la prise d'antibiotiques est un facteur qui pourrait à la fois influencer la quantité de bactéries et le devenir clinique de nos patientes, il devrait être évalué pour faciliter la corrélation entre la charge bactérienne intratumorale et la récurrence. Il en est de même pour l'allaitement qui réduit de 30 % les risques de récurrence du cancer du sein (232), tout en pouvant possiblement modifier le microbiote mammaire par un processus d'inoculation rétrograde (124). Il serait compliqué de recontacter les patientes ou leur famille pour obtenir ces informations, en

considérant que certaines ont été suivies pendant 15 ans et que d'autres sont maintenant décédées, puisque des données au sujet de la prise d'antibiotiques/probiotiques par exemple pourraient avoir été oubliées. Dorénavant, les nouvelles patientes qui sont incluses dans notre biobanque de cancer du sein passent un questionnaire incluant ces informations. Ainsi, il pourrait être possible de caractériser le microbiote intratumoral d'une cohorte plus récente afin d'évaluer si ces facteurs confondants affectent la quantification bactérienne.

## **Identification des espèces bactériennes par séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S**

### RETOUR SUR LES RÉSULTATS

En considérant l'impact crucial que peuvent avoir certaines espèces bactériennes spécifiques sur le développement tumoral (brisure à l'ADN, inflammation) et/ou sur la réponse immunitaire antitumorale, nous voulions déterminer si la dichotomisation des patientes de notre cohorte en deux groupes de détection bactérienne (élevée vs faible) pouvait provoquer une différence notable dans leur composition microbienne. Une présence plus abondante de certaines espèces pathogènes ou probiotiques associées au développement du cancer dans un des deux groupes aurait suggéré un effet de certaines bactéries spécifiques sur le risque de récurrence des patientes atteintes du cancer du sein, ne nous permettant pas de considérer la quantité de bactéries dans la tumeur mammaire comme le seul paramètre ayant un impact sur le devenir clinique.

Dans notre étude, autant l'observation générale de la signature bactérienne dans les deux groupes de patientes (**Figure 9, A et C**) que la comparaison approfondie des espèces bactériennes uniques à chaque groupe (LEfSe, non illustré) n'a pas permis la détection de différences significatives entre la composition des deux groupes de patientes. La différence observée par la comparaison de la diversité alpha et bêta entre les groupes était aussi négligeable. Nous nous attendions à voir une différence plus marquée de la diversité alpha et de la composition bactérienne, puisque dans l'étude de Riquelme *et al.* sur le microbiote intratumoral du cancer pancréatique, la survie des LTS (*long-term survivors*) était expliquée par une diversité bactérienne élevée et la présence de genres bactériens spécifiques (191). Les résultats obtenus suggèrent que

dans le cancer du sein, l'abondance du microbiote intratumoral est le principal facteur expliquant le faible risque de récurrence. Pour en être certain, il faudrait toutefois augmenter le nombre d'échantillons dans notre séquençage afin de mieux représenter l'hétérogénéité de la maladie. De plus, il serait intéressant d'évaluer la composition microbienne dans les différents sous-types moléculaires, puis de réaliser les analyses de comparaison pour chaque sous-type.

Le séquençage permet aussi de confirmer que les échantillons d'ADN tumoral quantifiés pour caractériser la cohorte contiennent de l'ADN bactérien provenant du microbiote mammaire. En effet, la composition bactérienne obtenue pour chaque échantillon séquençé correspond à la signature bactérienne attendue. De la même façon que Xuan *et al.*, nous avons observé dans nos échantillons une abondance de protéobactéries, suivi des firmicutes, des actinobactéries et des bactérioidètes (190). Nous sommes la première étude à illustrer la composition du microbiote intratumoral mammaire au niveau phylogénétique du genre. Toutefois, cette analyse des genres bactériens présents dans nos échantillons suggère une contamination bactérienne. Eisenhofer *et al.* ont dressé une liste des genres bactériens souvent retrouvés dans les contrôles négatifs dans les expériences de séquençage du microbiote (219). Parmi ceux-ci, on retrouve par exemple *Methylobacterium*, *Rothia* et *Mesorhizobium* qui sont aussi présents dans la composition de nos échantillons (**Figure 9A – droite**). L'origine de la contamination est difficile à évaluer et il est possible qu'elle soit limitée aux manipulations réalisées pour le séquençage. Il faudrait ajouter dans le futur plusieurs contrôles négatifs aux étapes de notre séquençage afin de déterminer cette origine. Malgré le fait qu'une certaine contamination puisse avoir été présente lors de la qPCR ou du séquençage, sa distribution homogène entre les échantillons suggère qu'elle n'a pas pu affecter significativement la classification des patientes avec la quantification qPCR ou la comparaison de la composition des deux groupes à la suite du séquençage.

Pour terminer, la méthode bio-informatique utilisée pour analyser nos séquences du gène de l'ARNr 16S comporte des limites et des biais. DADA2 a montré une sensibilité plus élevée que d'autres « pipelines » bio-informatiques couramment utilisés (Ex : MOTHUR, Qiime2-Deblur) en identifiant correctement l'ensemble des espèces dans une population bactérienne avec une composition prédéterminée (233). Or, contrairement à USEARCH-UNOISE3 et Qiime2-Deblur, DADA2 a présenté une spécificité plus faible en produisant de faux ASV ce qui pourrait influencer

la diversité bactérienne dans les échantillons. Ensuite, en appliquant les « *pipelines* » les plus performants (sensible et spécifique) à une base de données du microbiote fécal, il a été possible d'observer une différence importante dans le nombre d'ASV détectés par chaque outil bio-informatique (233). Toutes les méthodes ont permis de trouver des ASV uniques, non-partagés par les autres « *pipelines* ». De plus, une nouvelle méthode d'analyse bio-informatique (ANCHOR) permet d'avoir une identification plus précise des bactéries d'un échantillon en se rendant plus souvent jusqu'à l'espèce, tandis que d'autres « *pipelines* » d'analyse comme DADA2 se limitent souvent au genre (234). Il est possible que l'utilisation seule de DADA2 empêche l'observation d'une différence significative dans les diversités bêta et alpha des deux groupes à cause du manque d'informations sur certaines bactéries ou d'ASV non-détectés, malgré la présence potentielle d'un signal. Ainsi, il aurait été intéressant de combiner des techniques d'analyses pour valider l'homogénéité de la composition bactérienne entre les deux groupes de détection.

## **Le microbiote intratumoral mammaire et le devenir clinique**

### RETOUR SUR LES RÉSULTATS

Pour vérifier l'impact de la quantité bactérienne intratumorale sur le devenir clinique, soit le risque de récurrence et de décès, ces variables ont été évaluées pour chaque groupe de détection bactérienne (faible ou élevée) à l'aide de courbes de Kaplan-Meier (**Figures 10 et S4**) et de modèles uni- et multivariés (**Tableaux 4 et S1**). La cohorte utilisée pour faire ces analyses représente bien la présentation clinique du cancer du sein avec une majorité de carcinomes canaux (75 %), de cancers hormonaux dépendants (67 %) et de tumeurs provenant de la femme (99 %) (**Tableau 3**) (34). Toutefois, la proportion de cancers ER et/ou PR positifs est légèrement inférieure à ce qui est normalement observé, puisque nous voulions incorporer à notre étude suffisamment de tumeurs présentant des sous-types rares (Triple négatif, HER2<sup>+</sup> et Luminal HER2) afin d'évaluer l'impact de la détection bactérienne sur la survie des patientes ayant ces types de cancer du sein. Cet objectif a été difficile à réaliser pour certains sous-types, comme le HER2 surexprimé à cause de la rareté de ce sous-type moléculaire dans notre biobanque de cancer du sein. Il est possible que cette volonté d'étudier les différents sous-types ait pu biaiser la représentation intégrale de l'effet de l'abondance bactérienne sur le risque de récurrence de la

cohorte (**Figure 10A**), en donnant un poids trop important à des sous-types rares. Cette analyse sur l'ensemble de la cohorte a tout de même permis d'observer une augmentation significative ( $p=0.01$ ) du nombre de récurrence chez les patientes lorsqu'elles ont une présence bactérienne intratumorale faible, avec une réduction de 20 % de leur probabilité de survie sans récurrence après 5 ans comparativement aux patientes du groupe de détection élevée. De plus, il y avait une tendance similaire dans les analyses d'OS, sans toutefois obtenir de différence significative entre les deux groupes (**Figure S4A**). Dans la cohorte de notre biobanque, la cause de la mort de la patiente est souvent inconnue. L'utilisation du DSS au lieu de l'OS aurait peut-être produit une meilleure corrélation entre la survie et l'abondance bactérienne intratumorale, mais un plus grand nombre d'évènements (décès causés par le cancer du sein) serait nécessaire pour réaliser cette analyse.

La corrélation entre le risque de récurrence et la quantité bactérienne intratumorale obtenue avec l'ensemble de la cohorte nous a poussés à vérifier si elle est spécifique à certains groupes de patientes, déterminés par le sous-type moléculaire, le grade ou le stade pTNM. Au vu des résultats obtenus par les études Kaplan-Meier en fonction des sous-types moléculaires (**Figure 10D**), la quantité bactérienne semble être un facteur de risque à surveiller dans les cancers de type Luminal HER2, Luminal B et HER2 surexprimé, même si ces deux derniers groupes manquent de patientes pour avoir une bonne puissance statistique. Cette différence dans l'importance de la quantité bactérienne sur le risque de récurrence pourrait être expliquée en partie par la réponse immunitaire antitumorale impliquée dans le contrôle de chaque sous-type moléculaire. Une des hypothèses du projet est que les bactéries intratumorales influencent l'infiltration et l'activation immunitaire dans l'environnement tumoral ce qui affecte le devenir clinique des patientes, d'où notre volonté de l'évaluer à l'aide des marquages décrits à la **Figure 11**. Il a d'ailleurs été montré dans certains tissus adipeux que la charge bactérienne corrèle avec l'expression du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  et avec l'infiltration de macrophages (210). L'infiltration et l'activation de certaines cellules immunitaires dans le cancer du sein n'a pas le même impact clinique pour chaque sous-type moléculaire. Par exemple, la fréquence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, T CD4<sup>+</sup> mémoires activés et T CD8<sup>+</sup> dans la tumeur du sein influence positivement la DFS dans les tumeurs HER2 positives ce qui n'est pas le cas pour les tumeurs HER2 négatives (235). Donc, il est possible que la quantité

élevée de bactéries dans la tumeur mammaire induisent une réponse immunitaire favorable pour les tumeurs luminales B, luminales HER2 et HER2 surexprimé, mais pas pour les tumeurs luminales A et triple négatif. Cela pourrait aussi expliquer pourquoi l'impact de la charge bactérienne sur la survie est seulement observé dans les tumeurs de haut grade (III) et stade pTNM (III-IV) (**Figure 10, B et C**). Il a été démontré que l'influence positive de la fréquence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires activées et B naïfs et de plasmocytes sur la DFS croissait avec l'augmentation du grade (235). Toutefois, il est aussi probable que le nombre d'évènements (récidive ou décès) ne soit pas suffisant dans les stades et grades I et II, ou les tumeurs luminales A pour observer une séparation significative entre les deux groupes de détection bactérienne.

La plupart des facteurs pronostiques qui permettaient de prédire significativement le risque de récurrence dans l'analyse univariée, soit le stade pTNM ( $p=0.001$ ), le grade ( $p=0.006$ ), la thérapie adjuvante ( $p<0.001$ ) et la détection bactérienne ( $p=0.018$ ), prédisaient aussi de façon indépendante la récurrence dans les modèles multivariés (**Tableau 4**). L'hormonothérapie néoadjuvante ( $p=0.038$ ) est le seul facteur ayant prédit significativement le risque de récurrence dans le modèle univarié, mais n'étant pas indépendant de la détection bactérienne dans le modèle multivarié. La corrélation que nous avons observée avec le grade histologique est supportée par les études d'Abdollahi *et al.* et de Brewster *et al.* (236, 237). L'étude d'Abdollahi *et al.* a aussi démontré une corrélation du risque de récurrence avec l'atteinte ganglionnaire et la taille de la tumeur, ce qui est similaire à nos résultats qui montrent une association avec le stade pTNM, mais principalement à cause de l'influence de l'atteinte ganglionnaire ( $p=0.007$ ) (**Tableau S1**). L'association du risque de récurrence avec la thérapie adjuvante est aussi comparable avec l'étude de Clark *et al.*, même si dans cette dernière, l'hormonothérapie adjuvante n'a pas d'influence tandis qu'elle est près de la signification dans notre étude ( $p=0.055$ ) (238). Les différences entre les corrélations observées dans notre étude et celles provenant des autres études sur les facteurs pronostiques de la récurrence peuvent être expliquées par la taille de l'échantillon, notre étude étant réalisée sur un nombre inférieur de patientes, et sur la diversité de la présentation clinique des patientes incluses dans l'étude. En bref, selon les résultats obtenus, la présence bactérienne intratumorale est un facteur pronostique indépendant à évaluer, en plus du grade, du stade et de

la thérapie adjuvante afin de déterminer le risque de récurrence des patientes atteintes du cancer du sein.

#### PERSPECTIVES

Une étude intéressante serait d'avoir une cohorte de validation pour vérifier les résultats obtenus avec la technique qPCR, soit qu'une charge bactérienne élevée est associée à un meilleur devenir clinique de nos patientes. Une de nos expériences futures pour compléter l'objectif #1 de notre projet qui consiste à révéler la présence d'un microbiote intratumoral dans le sein est de détecter des composants bactériens (PGLY, LPS et ARNr 16S) sur un nombre de tumeurs plus important par l'utilisation d'un échantillon de 2000 TMA de cancer du sein (cohorte QBCF-TMAC). Parmi ces TMA, certains proviennent de tumeurs de patientes incluses dans notre étude qPCR. Il serait possible de calculer l'abondance des composants bactériens (PGLY et LPS) sur les TMA de nos patientes, puis de déterminer si une quantité élevée dans ces tumeurs mammaires à un effet similaire le devenir clinique.



# Chapitre 6 - Conclusion

## Réalisations

Notre étude soutient la découverte du microbiote intratumoral mammaire par Xuan *et al.* grâce à la détection dans les tumeurs de multiples composants bactériens (LPS, PGLY, ARNr 16S et gènes de l'ARNr 16S). La différence observée entre la charge bactérienne quantifiée dans les NAT et les tumeurs appariées supporte l'hypothèse d'une altération du microbiote mammaire dans la tumeur qui pourrait être associée au développement du cancer du sein. Parmi les tumeurs analysées, une réduction plus importante de la population bactérienne, définie par une charge bactérienne intratumorale faible, a été reliée à un nombre de récurrences élevé. Il pourrait être envisagé que cette altération du microbiote intratumoral soit définie comme une « dysbiose », et qu'une dysbiose intratumorale plus importante ait pour conséquence un mauvais pronostic. Or, nos connaissances sur l'eubiose dans le tissu et la tumeur mammaires restent limitées. D'autres études devront être réalisées pour mieux comprendre ce qui est considéré comme une population bactérienne normale dans ces tissus et les altérations qui induisent une dysbiose. Pour expliquer nos résultats, nous postulons qu'une quantité bactérienne élevée dans le microenvironnement tumoral pourrait permettre de recruter et stimuler fortement la réponse immunitaire antitumorale, réduisant ainsi le nombre de cellules tumorales résiduelles à la suite de la chirurgie, mais cette hypothèse reste à évaluer à l'aide de nos prochaines expériences.

Également, notre étude est la première à démontrer l'influence de la charge bactérienne du microbiote intratumoral sur le devenir clinique des patientes atteintes du cancer du sein. Nos résultats suggèrent que la caractérisation de la quantité bactérienne dans la tumeur mammaire pourrait servir de biomarqueur pour la prédiction du risque de récurrence des patientes. Finalement, l'influence des bactéries sur la survie serait principalement observée dans les cancers du sein avancés ou de sous-type moléculaire Luminal HER2<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup> et Luminal B, suggérant que le microbiote intratumoral puisse être une cible thérapeutique à évaluer dans ces types de cancer.

## Projets futurs

Les recherches sur le microbiote mammaire en sont encore à leur début. D'ailleurs, une étude clinique sera effectuée pour déterminer si la prise orale de probiotiques, des lactobacilles, peut permettre de modifier le microbiote local du sein en étudiant principalement la diversité microbienne (239). Or, nos travaux suggèrent que l'abondance du microbiote intratumoral est une variable cruciale à prendre en considération, davantage que des espèces bactériennes spécifiques. De prochaines études cliniques devront être menées afin d'évaluer l'impact des pro- et prébiotiques sur la charge bactérienne intratumorale. À long terme, l'influence de ce type d'intervention sur le devenir clinique des patientes devra aussi être envisagée afin d'illustrer le lien de cause à effet entre les bactéries et la survie.

## Références bibliographiques

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424.
2. Singletary SE. Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg*. 2003;237(4):474-82.
3. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology*. 2001;2(3):133-40.
4. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2015;72(2):333-8.
5. Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, et al. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer*. 2005;6(5):391-401.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70(1):7-30.
7. Kachuri L, De P, Ellison LF, Semenciw R. Cancer incidence, mortality and survival trends in Canada, 1970-2007. *Chronic Dis Inj Can*. 2013;33(2):69-80.
8. Burton R, Bell R. The global challenge of reducing breast cancer mortality. *Oncologist*. 2013;18(11):1200-2.
9. Narod SA, Iqbal J, Miller AB. Why have breast cancer mortality rates declined? *Journal of Cancer Policy*. 2015;5:8-17.
10. Mittmann N, Porter JM, Rangrej J, Seung SJ, Liu N, Saskin R, et al. Health system costs for stage-specific breast cancer: a population-based approach. *Curr Oncol*. 2014;21(6):281-93.
11. Butti R, Gunasekaran VP, Kumar TVS, Banerjee P, Kundu GC. Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2019;107:38-52.
12. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
14. Wu S, Zhu W, Thompson P, Hannun YA. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat Commun*. 2018;9(1):3490-.
15. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1137-46.
16. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*. 2002;3(11):991-8.
17. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *Oncologist*. 2004;9(4):361-77.
18. Nahta R, Hortobágyi GN, Esteva FJ. Growth Factor Receptors in Breast Cancer: Potential for Therapeutic Intervention. *Oncologist*. 2003;8(1):5-17.
19. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol*. 2000;182(2):150-62.
20. Carbognin L, Miglietta F, Paris I, Dieci MV. Prognostic and Predictive Implications of PTEN in Breast Cancer: Unfulfilled Promises but Intriguing Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9):1401.

21. Dimri GP. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*. 2005;7(6):505-12.
22. Herbert BS, Wright WE, Shay JW. Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2001;3(3):146-9.
23. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(1):68-78.
24. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death & Differentiation*. 2018;25(1):104-13.
25. Børresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat*. 2003;21(3):292-300.
26. Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama JV. Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J Clin Med*. 2016;5(2):13.
27. Cheng CW, Wu PE, Yu JC, Huang CS, Yue CT, Wu CW, et al. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene*. 2001;20(29):3814-23.
28. Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015;20:1144-63.
29. Hughes S, Agbaje O, Bowen RL, Holliday DL, Shaw JA, Duffy S, et al. Matrix Metalloproteinase Single-Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes Predict Breast Cancer Progression. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(22):6673.
30. Relf M, LeJeune S, Scott PAE, Fox S, Smith K, Leek R, et al. Expression of the Angiogenic Factors Vascular Endothelial Cell Growth Factor, Acidic and Basic Fibroblast Growth Factor, Tumor Growth Factor  $\beta$ -1, Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor, Placenta Growth Factor, and Pleiotrophin in Human Primary Breast Cancer and Its Relation to Angiogenesis. *Cancer Research*. 1997;57(5):963-9.
31. Longatto Filho A, Lopes JM, Schmitt FC. Angiogenesis and breast cancer. *J Oncol*. 2010;2010:576384.
32. Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med*. 1998;49:407-24.
33. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny*. 2015;14(3):196-202.
34. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5(1):66.
35. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;165(1):193-200.
36. Group ECW. Hormones and breast cancer. *Human Reproduction Update*. 2004;10(4):281-93.
37. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med*. 2019;18(3):121-6.
38. Agnoli C, Grioni S, Pala V, Allione A, Matullo G, Gaetano CD, et al. Biomarkers of inflammation and breast cancer risk: a case-control study nested in the EPIC-Varese cohort. *Scientific reports*. 2017;7(1):12708-.
39. Deapen D, Liu L, Perkins C, Bernstein L, Ross RK. Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *Int J Cancer*. 2002;99(5):747-50.

40. John EM, Phipps AI, Davis A, Koo J. Migration History, Acculturation, and Breast Cancer Risk in Hispanic Women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005;14(12):2905-13.
41. Hamer J, Warner E. Lifestyle modifications for patients with breast cancer to improve prognosis and optimize overall health. *CMAJ*. 2017;189(7):E268-E74.
42. Ellison RC, Zhang Y, McLennan CE, Rothman KJ. Exploring the relation of alcohol consumption to risk of breast cancer. *Am J Epidemiol*. 2001;154(8):740-7.
43. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun S-S, Adami H-O, Beeson L, Folsom AR, et al. Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk. *American Journal of Epidemiology*. 2000;152(6):514-27.
44. Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, et al. Dual Effects of Weight and Weight Gain on Breast Cancer Risk. *JAMA*. 1997;278(17):1407-11.
45. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 2000;21(6):167-223.
46. Dieli-Conwright CM, Lee K, Kiwata JL. Reducing the Risk of Breast Cancer Recurrence: an Evaluation of the Effects and Mechanisms of Diet and Exercise. *Current Breast Cancer Reports*. 2016;8(3):139-50.
47. Street SEA, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(1):129-34.
48. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107-11.
49. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(5):755-60.
50. Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, et al. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nature immunology*. 2005;6(7):722-9.
51. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.
52. Garg AD, Dudek AM, Agostinis P. Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: What, when, and how? *BioFactors*. 2013;39(4):355-67.
53. Dhar P, Wu JD. NKG2D and its ligands in cancer. *Curr Opin Immunol*. 2018;51:55-61.
54. Wajant H. CD95L/FasL and TRAIL in Tumour Surveillance and Cancer Therapy. In: Dalglish AG, Haefner B, editors. *The Link Between Inflammation and Cancer: Wounds that do not heal*. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 141-65.
55. Vigneron N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *Biomed Res Int*. 2015;2015:948501-.
56. Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Allison JP. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev*. 2011;241(1):104-18.
57. Kassardjian A, Shintaku PI, Moatamed NA. Expression of immune checkpoint regulators, cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and programmed death-ligand 1 (PD-L1), in female breast carcinomas. *PloS one*. 2018;13(4):e0195958-e.
58. Garrido F. MHC/HLA Class I Loss in Cancer Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1151:15-78.

59. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nature immunology*. 2002;3(11):999-1005.
60. Ghiringhelli Fo, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- $\beta$ -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;202(7):919-29.
61. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(10):715-27.
62. Tower H, Ruppert M, Britt K. The Immune Microenvironment of Breast Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9).
63. Young JL, Jr., Ward KC, Wingo PA, Howe HL. The incidence of malignant non-carcinomas of the female breast. *Cancer Causes Control*. 2004;15(3):313-9.
64. Yerushalmi R, Hayes MM, Gelmon KA. Breast carcinoma--rare types: review of the literature. *Annals of Oncology*. 2009;20(11):1763-70.
65. Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res*. 2010;1(2):109-26.
66. Wen HY, Brogi E. Lobular Carcinoma In Situ. *Surg Pathol Clin*. 2018;11(1):123-45.
67. Salvatorelli L, Puzzo L, Vecchio GM, Caltabiano R, Virzì V, Magro G. Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: An Update with Emphasis on Radiological and Morphological Features as Predictive Prognostic Factors. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):609.
68. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2013;24(9):2206-23.
69. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer: Challenges for Personalized Medicine. *The American Journal of Pathology*. 2013;183(4):1113-24.
70. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.
71. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *The American journal of pathology*. 2013;183(4):1113-24.
72. Aysola K, Desai A, Welch C, Xu J, Qin Y, Reddy V, et al. Triple Negative Breast Cancer - An Overview. *Hereditary Genet*. 2013;2013(Suppl 2):001.
73. Liu MC, Pitcher BN, Mardis ER, Davies SR, Friedman PN, Snider JE, et al. PAM50 gene signatures and breast cancer prognosis with adjuvant anthracycline- and taxane-based chemotherapy: correlative analysis of C9741 (Alliance). *NPJ Breast Cancer*. 2016;2:15023.
74. Joh JE, Esposito NN, Kiluk JV, Laronga C, Lee MC, Loftus L, et al. The effect of Oncotype DX recurrence score on treatment recommendations for patients with estrogen receptor-positive early stage breast cancer and correlation with estimation of recurrence risk by breast cancer specialists. *Oncologist*. 2011;16(11):1520-6.
75. 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*. 1991;19(5):403-10.

76. Koh J, Kim MJ. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean J Radiol.* 2019;20(1):69-82.
77. Rostas JW, Dyess DL. Current operative management of breast cancer: an age of smaller resections and bigger cures. *Int J Breast Cancer.* 2012;2012:516417-.
78. Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2001;27(3):137-42.
79. Puhalla S, Bhattacharya S, Davidson NE. Hormonal therapy in breast cancer: a model disease for the personalization of cancer care. *Mol Oncol.* 2012;6(2):222-36.
80. Hassan MS, Ansari J, Spooner D, Hussain SA. Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncol Rep.* 2010;24(5):1121-31.
81. Mehanna J, Haddad FG, Eid R, Lambertini M, Kourie HR. Triple-negative breast cancer: current perspective on the evolving therapeutic landscape. *Int J Womens Health.* 2019;11:431-7.
82. Gatti-Mays ME, Balko JM, Gameiro SR, Bear HD, Prabhakaran S, Fukui J, et al. If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2019;5(1):37.
83. Swoboda A, Nanda R. Immune Checkpoint Blockade for Breast Cancer. *Cancer Treat Res.* 2018;173:155-65.
84. Segovia-Mendoza M, Morales-Montor J. Immune Tumor Microenvironment in Breast Cancer and the Participation of Estrogen and Its Receptors in Cancer Physiopathology. *Frontiers in immunology.* 2019;10:348-.
85. Cohen IJ, Blasberg R. Impact of the Tumor Microenvironment on Tumor-Infiltrating Lymphocytes: Focus on Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl).* 2017;11:1178223417731565-.
86. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol.* 2016;2(10):1354-60.
87. Filipovic A, Miller G, Bolen J. Progress Toward Identifying Exact Proxies for Predicting Response to Immunotherapies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2020;8(155).
88. Solinas C, Gombos A, Latifyan S, Piccart-Gebhart M, Kok M, Buisseret L. Targeting immune checkpoints in breast cancer: an update of early results. *ESMO Open.* 2017;2(5):e000255-e.
89. Mina LA, Lim S, Bahadur SW, Firoz AT. Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer: Emerging New Data. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2019;11:321-8.
90. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006;24(34):5373-80.
91. Syed Khaja AS, Toor SM, El Salhat H, Faour I, Ul Haq N, Ali BR, et al. Preferential accumulation of regulatory T cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. *Oncotarget.* 2017;8(20):33159-71.
92. Emens LA. Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012;12(12):1597-611.
93. Li X, Gruosso T, Zuo D, Omeroglu A, Meterissian S, Guiot M-C, et al. Infiltration of CD8+ T cells into tumor cell clusters in triple-negative breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2019;116(9):3678-87.
94. Gruosso T, Gigoux M, Manem VSK, Bertos N, Zuo D, Perlitch I, et al. Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. *J Clin Invest.* 2019;129(4):1785-800.

95. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606-16.
96. Hung M, Xu J, Nielson D, Bounsanga J, Gu Y, Hansen AR, et al. Evaluating the Prediction of Breast Cancer Survival Using Lymph Node Ratio. *J Breast Cancer*. 2018;21(3):315-20.
97. Engelhardt EG, Garvelink MM, Haes JCJMd, Hoeven JJMvd, Smets EMA, Pieterse AH, et al. Predicting and Communicating the Risk of Recurrence and Death in Women With Early-Stage Breast Cancer: A Systematic Review of Risk Prediction Models. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(3):238-50.
98. Hadziavdic K, Lekang K, Lanzen A, Jonassen I, Thompson EM, Troedsson C. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PloS one*. 2014;9(2):e87624-e.
99. Lafontaine DLJ, Tollervey D. The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(7):514-20.
100. Mitreva M. 8 - The Microbiome in Infectious Diseases. In: Cohen J, Powderly WG, Opal SM, editors. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*: Elsevier; 2017. p. 68-74.e2.
101. Kralik P, Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol*. 2017;8(108).
102. Fricker AM, Podlesny D, Fricke WF. What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *J Adv Res*. 2019;19:105-12.
103. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D590-D6.
104. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(7):5069-72.
105. Maidak BL, Olsen GJ, Larsen N, Overbeek R, McCaughey MJ, Woese CR. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res*. 1997;25(1):109-11.
106. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787-803.
107. Purvis A, Hector A. Getting the measure of biodiversity. *Nature*. 2000;405(6783):212-9.
108. Morris EK, Caruso T, Buscot F, Fischer M, Hancock C, Maier TS, et al. Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecol Evol*. 2014;4(18):3514-24.
109. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*. 2017;3(1):71-82.
110. Group NHW, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19(12):2317-23.
111. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.
112. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*. 2016;14(8):e1002533.
113. Rojo D, Méndez-García C, Raczowska BA, Bargiela R, Moya A, Ferrer M, et al. Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(4):453-78.

114. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med.* 2016;8(1):51-.
115. Ford WW. On the Bacteriology of Normal Organs. *J Hyg (Lond).* 1901;1(2):277-84.
116. Udaondo Z, Molina-Santiago C. Microbiomes as the new keystone for life sciences development. *Microb Biotechnol.* 2019;12(4):579-81.
117. O'Connor H, MacSharry J, Bueso YF, Lindsay S, Kavanagh EL, Tangney M, et al. Resident bacteria in breast cancer tissue: pathogenic agents or harmless commensals? *Discov Med.* 2018;26(142):93-102.
118. Gosiewski T, Ludwig-Galezowska AH, Huminska K, Sroka-Oleksiak A, Radkowski P, Salamon D, et al. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method - the observation of DNAemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(2):329-36.
119. Urbaniak C, Cummins J, Brackstone M, Macklaim JM, Gloor GB, Baban CK, et al. Microbiota of human breast tissue. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(10):3007-14.
120. Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiology.* 2013;13(1):116.
121. Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology.* 2011;34(2):148-55.
122. Perez PF, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics.* 2007;119(3):e724-32.
123. Urbaniak C, Burton JP, Reid G. Breast, Milk and Microbes: A Complex Relationship that Does Not End with Lactation. *Women's Health.* 2012;8(4):385-98.
124. Moossavi S, Azad MB. Origins of human milk microbiota: new evidence and arising questions. *Gut Microbes.* 2019:1-10.
125. Chan AA, Bashir M, Rivas MN, Duvall K, Sieling PA, Pieber TR, et al. Characterization of the microbiome of nipple aspirate fluid of breast cancer survivors. *Sci Rep.* 2016;6:28061.
126. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UME, Beck DL, Abdo Z, et al. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLOS ONE.* 2011;6(6):e21313.
127. Blekhman R, Goodrich JK, Huang K, Sun Q, Bukowski R, Bell JT, et al. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology.* 2015;16(1):191.
128. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012;486(7402):222-7.
129. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(33):14691-6.
130. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Stora A, Laghi L, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut.* 2016;65(11):1812-21.
131. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(31):11070-5.

132. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016;352(6285):560-4.
133. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012;70 Suppl 1(Suppl 1):S38-S44.
134. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science (New York, NY)*. 2009;326(5960):1694-7.
135. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148(6):1258-70.
136. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(5):1137-50.
137. Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev*. 2004;9(2):180-97.
138. Bailey MT, Coe CL. Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Dev Psychobiol*. 1999;35(2):146-55.
139. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS biology*. 2008;6(11):e280-e.
140. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4554-61.
141. Huang Y, Yang W, Liu H, Duan J, Zhang Y, Liu M, et al. Effect of high-dose methotrexate chemotherapy on intestinal Bifidobacteria, Lactobacillus and Escherichia coli in children with acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Biology and Medicine*. 2012;237(3):305-11.
142. Iacob S, Iacob DG. Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. *Front Microbiol*. 2019;10(1676).
143. Deriu E, Liu Janet Z, Pezeshki M, Edwards Robert A, Ochoa Roxanna J, Contreras H, et al. Probiotic Bacteria Reduce Salmonella Typhimurium Intestinal Colonization by Competing for Iron. *Cell Host & Microbe*. 2013;14(1):26-37.
144. Frawley ER, Fang FC. The ins and outs of bacterial iron metabolism. *Mol Microbiol*. 2014;93(4):609-16.
145. Parmanand BA, Kellingray L, Le Gall G, Basit AW, Fairweather-Tait S, Narbad A. A decrease in iron availability to human gut microbiome reduces the growth of potentially pathogenic gut bacteria; an in vitro colonic fermentation study. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2019;67:20-7.
146. Yilmaz B, Li H. Gut Microbiota and Iron: The Crucial Actors in Health and Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018;11(4):98.
147. Moszak M, Szulińska M, Bogdański P. You Are What You Eat-The Relationship between Diet, Microbiota, and Metabolic Disorders-A Review. *Nutrients*. 2020;12(4):1096.
148. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2018;57(1):1-24.
149. Liu H, Wang J, He T, Becker S, Zhang G, Li D, et al. Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Advances in nutrition (Bethesda, Md)*. 2018;9(1):21-9.

150. Magnúsdóttir S, Ravcheev D, de Crécy-Lagard V, Thiele I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. *Front Genet.* 2015;6:148-.
151. Said HM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem J.* 2011;437(3):357-72.
152. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews Immunology.* 2009;9(5):313-23.
153. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and Maintaining the Gastrointestinal Ecosystem: What We Know and Need To Know from Gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1998;62(4):1157.
154. Kennedy EA, King KY, Baldridge MT. Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. *Front Physiol.* 2018;9:1534-.
155. Schaefer AK, Melnyk JE, He Z, Del Rosario F, Grimes CL. Chapter 14 - Pathogen- and Microbial- Associated Molecular Patterns (PAMPs/MAMPs) and the Innate Immune Response in Crohn's Disease. In: Chatterjee S, Jungraithmayr W, Bagchi D, editors. *Immunity and Inflammation in Health and Disease: Academic Press; 2018.* p. 175-87.
156. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* 2014;33(10):1104-16.
157. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature immunology.* 2008;9(7):769-76.
158. Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res.* 2015;2015:489821-.
159. Valentini M, Piermattei A, Di Sante G, Migliara G, Delogu G, Ria F. Immunomodulation by gut microbiota: role of Toll-like receptor expressed by T cells. *J Immunol Res.* 2014;2014:586939-.
160. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013;504(7480):451-5.
161. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):449-90.
162. Lobionda S, Sittipo P, Kwon HY, Lee YK. The Role of Gut Microbiota in Intestinal Inflammation with Respect to Diet and Extrinsic Stressors. *Microorganisms.* 2019;7(8):271.
163. Ding R-x, Goh W-R, Wu R-n, Yue X-q, Luo X, Khine WWT, et al. Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. *Journal of Food and Drug Analysis.* 2019;27(3):623-31.
164. West CE, Renz H, Jenmalm MC, Kozyrskyj AL, Allen KJ, Vuillermin P, et al. The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: Associations and potentials for gut microbiota therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2015;135(1):3-13.
165. Minerbi A, Gonzalez E, Brereton NJB, Anjarkouchian A, Dewar K, Fitzcharles MA, et al. Altered microbiome composition in individuals with fibromyalgia. *Pain.* 2019;160(11):2589-602.
166. Zeng MY, Inohara N, Nuñez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol.* 2017;10(1):18-26.

167. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science*. 2015;348(6230):80-6.
168. Vivarelli S, Salemi R, Candido S, Falzone L, Santagati M, Stefani S, et al. Gut Microbiota and Cancer: From Pathogenesis to Therapy. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1):38.
169. Fulbright LE, Ellermann M, Arthur JC. The microbiome and the hallmarks of cancer. *PLoS pathogens*. 2017;13(9):e1006480-e.
170. Rhee K-J, Wu S, Wu X, Huso DL, Karim B, Franco AA, et al. Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2009;77(4):1708-18.
171. Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, et al. *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science*. 2006;313(5788):848-51.
172. Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut*. 2014;63(12):1932-42.
173. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, Yamin R, Abed J, Gamliel M, et al. Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity*. 2015;42(2):344-55.
174. Geller LT, Barzily-Rokni M, Danino T, Jonas OH, Shental N, Nejman D, et al. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science*. 2017;357(6356):1156-60.
175. Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, Sadler WD, Petrosino JF, Chen GY, et al. The Gut Microbiome Modulates Colon Tumorigenesis. *mBio*. 2013;4(6):e00692-13.
176. Raskov H, Burcharth J, Pommergaard H-C. Linking Gut Microbiota to Colorectal Cancer. *J Cancer*. 2017;8(17):3378-95.
177. Jan G, Belzacq AS, Haouzi D, Rouault A, Métivier D, Kroemer G, et al. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death & Differentiation*. 2002;9(2):179-88.
178. Chai F, Evdokiou A, Young GP, Zalewski PD. Involvement of p21Waf1/Cip1 and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis*. 2000;21(1):7-14.
179. Steliou K, Boosalis MS, Perrine SP, Sangerman J, Faller DV. Butyrate histone deacetylase inhibitors. *Biores Open Access*. 2012;1(4):192-8.
180. Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, Ueno N, Moriichi K, Sasajima J, et al. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. *Nat Commun*. 2016;7(1):12365.
181. Zhan Y, Chen P-J, Sadler WD, Wang F, Poe S, Núñez G, et al. Gut Microbiota Protects against Gastrointestinal Tumorigenesis Caused by Epithelial Injury. *Cancer Research*. 2013;73(24):7199-210.
182. González-Sarrías A, Tomé-Carneiro J, Bellesia A, Tomás-Barberán FA, Espín JC. The ellagic acid-derived gut microbiota metabolite, urolithin A, potentiates the anticancer effects of 5-fluorouracil chemotherapy on human colon cancer cells. *Food Funct*. 2015;6(5):1460-9.
183. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*. 2013;342(6161):971-6.

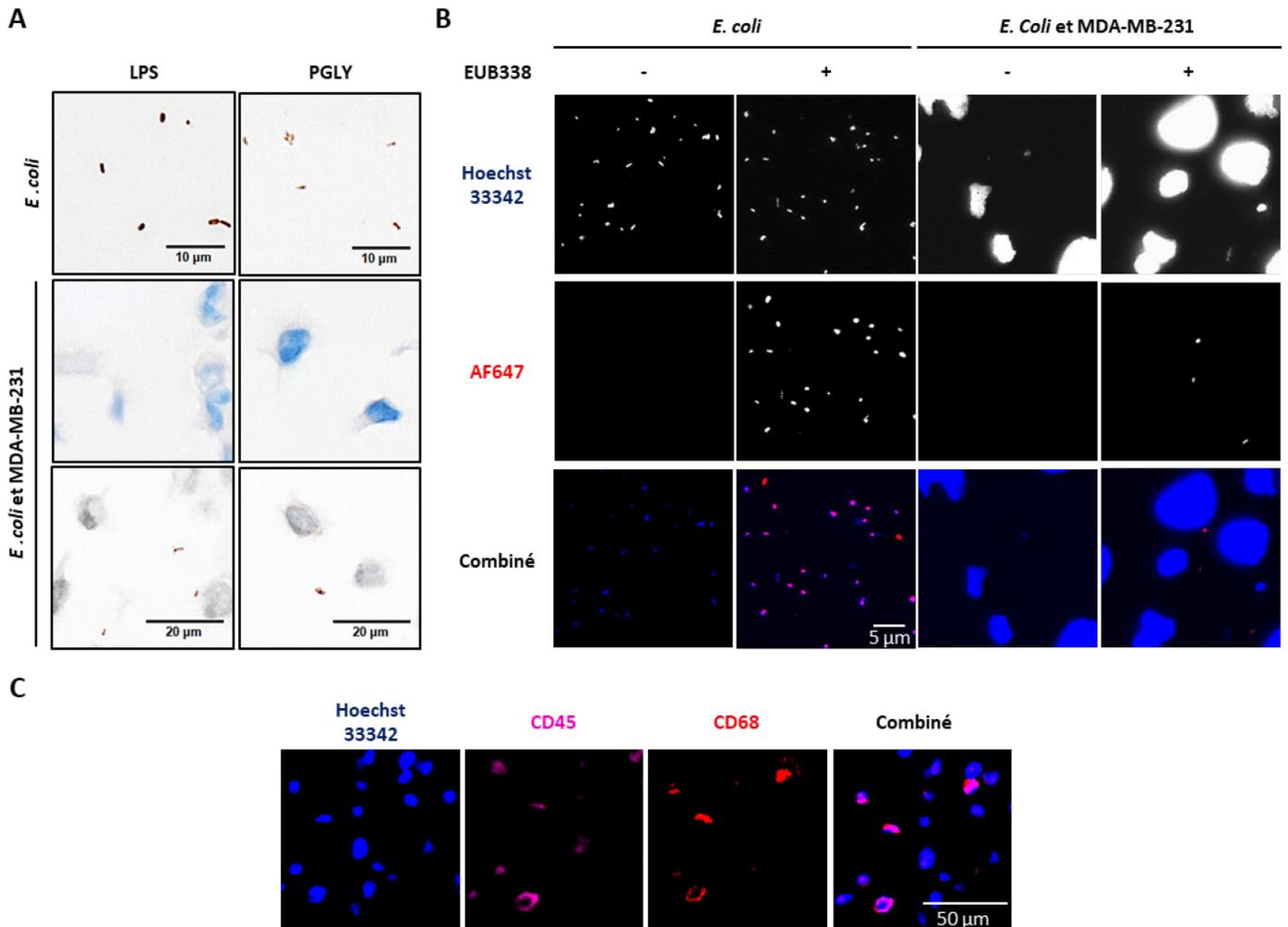
184. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*. 2013;342(6161):967-70.
185. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015;350(6264):1084-9.
186. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*. 2015;350(6264):1079-84.
187. Urbaniak C, Gloor GB, Brackstone M, Scott L, Tangney M, Reid G. The Microbiota of Breast Tissue and Its Association with Breast Cancer. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(16):5039-48.
188. Hurtado JA, Maldonado-Lobón JA, Díaz-Ropero MP, Flores-Rojas K, Uberos J, Leante JL, et al. Oral Administration to Nursing Women of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 Prevents Lactational Mastitis Development: A Randomized Controlled Trial. *Breastfeed Med*. 2017;12(4):202-9.
189. Urbaniak C, Burton JP, Reid G. Breast, milk and microbes: a complex relationship that does not end with lactation. *Womens Health (Lond)*. 2012;8(4):385-98.
190. Xuan C, Shamonki JM, Chung A, Dinome ML, Chung M, Sieling PA, et al. Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS One*. 2014;9(1):e83744.
191. Riquelme E, Zhang Y, Zhang L, Montiel M, Zoltan M, Dong W, et al. Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. *Cell*. 2019;178(4):795-806 e12.
192. Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Bacteria as tumour-targeting vectors. *The Lancet Oncology*. 2003;4(9):548-56.
193. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J*. 2006;26:154-8.
194. Barbé S, Van Mellaert L, Anné J. The use of clostridial spores for cancer treatment. *Journal of Applied Microbiology*. 2006;101(3):571-8.
195. Lambin P, Theys J, Landuyt W, Rijken P, van der Kogel A, van der Schueren E, et al. Colonisation of *Clostridium* in the body is restricted to hypoxic and necrotic areas of tumours. *Anaerobe*. 1998;4(4):183-8.
196. Mowday AM, Guise CP, Ackerley DF, Minton NP, Lambin P, Dubois LJ, et al. Advancing *Clostridia* to Clinical Trial: Past Lessons and Recent Progress. *Cancers (Basel)*. 2016;8(7):63.
197. Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, Sasaki T, Amano J, Kano Y, et al. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2001;66(2):165-70.
198. Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a Novel Anticancer Vector. *Cancer Research*. 1997;57(20):4537-44.
199. Li X, Fu G-F, Fan Y-R, Liu W-H, Liu X-J, Wang J-J, et al. *Bifidobacterium adolescentis* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: Selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Therapy*. 2003;10(2):105-11.
200. Kawai K, Miyazaki J, Joraku A, Nishiyama H, Akaza H. *Bacillus Calmette–Guerin* (BCG) immunotherapy for bladder cancer: Current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Science*. 2013;104(1):22-7.

201. Helmink BA, Khan MAW, Hermann A, Gopalakrishnan V, Wargo JA. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature Medicine*. 2019;25(3):377-88.
202. Chen D, Wu J, Jin D, Wang B, Cao H. Fecal microbiota transplantation in cancer management: Current status and perspectives. *Int J Cancer*. 2019;145(8):2021-31.
203. Trudel D, Zafarana G, Sykes J, Have CL, Bristow RG, van der Kwast T. 4FISH-IF, a four-color dual-gene FISH combined with p63 immunofluorescence to evaluate NKX3.1 and MYC status in prostate cancer. *J Histochem Cytochem*. 2013;61(7):500-9.
204. Anhe FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*. 2015;64(6):872-83.
205. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. 2016;13(7):581-3.
206. Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat Protoc*. 2020;15(3):799-821.
207. Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W180-w8.
208. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*. 2013;8(4):e61217-e.
209. Martinez C, Maria RL. Diagnostics for Choosing between Log-Rank and Wilcoxon Tests. *Dissertations*. 2007(895).
210. Massier L, Chakaroun R, Tabei S, Crane A, Didt KD, Fallmann J, et al. Adipose tissue derived bacteria are associated with inflammation in obesity and type 2 diabetes. *Gut*. 2020:gutjnl-2019-320118.
211. El Aidy S, Derrien M, Merrifield CA, Levenez F, Doré J, Boekschoten MV, et al. Gut bacteria-host metabolic interplay during conventionalisation of the mouse germfree colon. *ISME J*. 2013;7(4):743-55.
212. Moreno-Indias I, Torres M, Montserrat JM, Sanchez-Alcoholado L, Cardona F, Tinahones FJ, et al. Intermittent hypoxia alters gut microbiota diversity in a mouse model of sleep apnoea. *European Respiratory Journal*. 2015;45(4):1055.
213. Nejman D, Livyatan I, Fuks G, Gavert N, Zwang Y, Geller LT, et al. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science*. 2020;368(6494):973-80.
214. Yang B, Wang Y, Qian P-Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*. 2016;17(1):135.
215. Nawaz S, Heindl A, Koelble K, Yuan Y. Beyond immune density: critical role of spatial heterogeneity in estrogen receptor-negative breast cancer. *Mod Pathol*. 2015;28(6):766-77.
216. Mani NL, Schalper KA, Hatzis C, Saglam O, Tavassoli F, Butler M, et al. Quantitative assessment of the spatial heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):78.
217. Iserle JA, Stephan BI, Goñi SE, Borio CS, Ghiringhelli PD, Lozano ME. Family-specific degenerate primer design: a tool to design consensus degenerated oligonucleotides. *Biotechnol Res Int*. 2013;2013:383646-.

218. Renvoisé A, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V, Aubry A. Broad-range PCR: Past, present, or future of bacteriology? *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2013;43(8):322-30.
219. Eisenhofer R, Minich JJ, Marotz C, Cooper A, Knight R, Weyrich LS. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. *Trends in Microbiology*. 2019;27(2):105-17.
220. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol*. 2014;12:87-.
221. Dallolio L, Raggi A, Sanna T, Mazzetti M, Orsi A, Zanni A, et al. Surveillance of Environmental and Procedural Measures of Infection Control in the Operating Theatre Setting. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;15(1):46.
222. Prince Nelson SL, Ramakrishnan V, Nietert PJ, Kamen DL, Ramos PS, Wolf BJ. An evaluation of common methods for dichotomization of continuous variables to discriminate disease status. *Commun Stat Theory Methods*. 2017;46(21):10823-34.
223. Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-Tile. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(21):7252.
224. Jager KJ, Zoccali C, MacLeod A, Dekker FW. Confounding: What it is and how to deal with it. *Kidney International*. 2008;73(3):256-60.
225. Neuman H, Debelius JW, Knight R, Koren O. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(4):509-21.
226. Kornman KS, Loesche WJ. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun*. 1982;35(1):256-63.
227. Zhou Z, Bian C, Luo Z, Guille C, Ogunrinde E, Wu J, et al. Progesterone decreases gut permeability through upregulating occludin expression in primary human gut tissues and Caco-2 cells. *Scientific Reports*. 2019;9(1):8367.
228. van der Giessen J, van der Woude CJ, Peppelenbosch MP, Fuhler GM. A Direct Effect of Sex Hormones on Epithelial Barrier Function in Inflammatory Bowel Disease Models. *Cells*. 2019;8(3):261.
229. Barroso-Sousa R, Silva DDAFR, Alessi JVM, Mano MS. Neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer: current role and future perspectives. *Ecancermedicalscience*. 2016;10:609-.
230. Marcus DM, Switchenko JM, Prabhu R, O'Regan R, Zelnak A, Fasola C, et al. Neoadjuvant Hormonal Therapy is Associated with Comparable Outcomes to Neoadjuvant Chemotherapy in Post-Menopausal Women with Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Frontiers in oncology*. 2013;3:317-.
231. Scatena C, Roncella M, Di Paolo A, Aretini P, Menicagli M, Fanelli G, et al. Doxycycline, an Inhibitor of Mitochondrial Biogenesis, Effectively Reduces Cancer Stem Cells (CSCs) in Early Breast Cancer Patients: A Clinical Pilot Study. *Frontiers in oncology*. 2018;8:452-.
232. Mayor S. Breast feeding reduces risk of breast cancer recurrence, study finds. *BMJ : British Medical Journal*. 2015;350:h2325.
233. Prodan A, Tremaroli V, Brolin H, Zwinderman AH, Nieuwdorp M, Levin E. Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLoS one*. 2020;15(1):e0227434-e.
234. Gonzalez E, Pitre FE, Brereton NJB. ANCHOR: a 16S rRNA gene amplicon pipeline for microbial analysis of multiple environmental samples. *Environmental Microbiology*. 2019;21(7):2440-68.

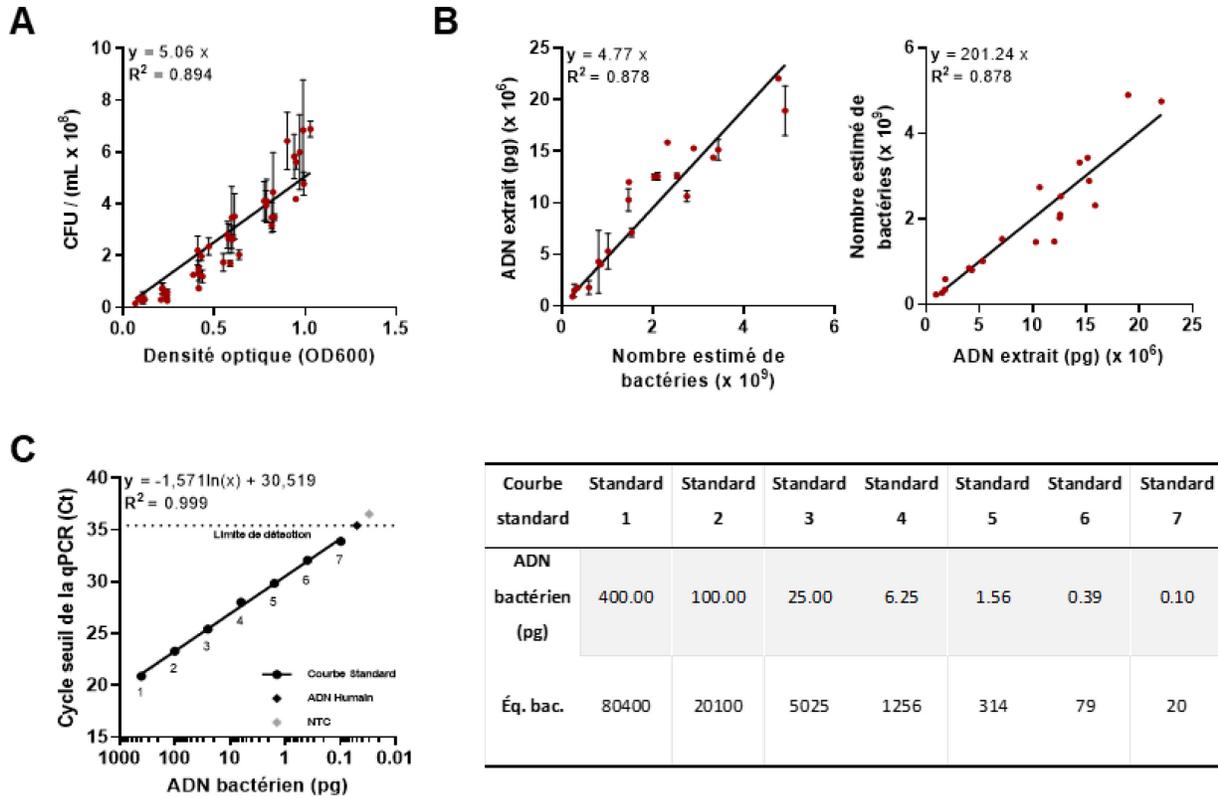
235. Zhang S-C, Hu Z-Q, Long J-H, Zhu G-M, Wang Y, Jia Y, et al. Clinical Implications of Tumor-Infiltrating Immune Cells in Breast Cancer. *J Cancer*. 2019;10(24):6175-84.
236. Brewster AM, Hortobagyi GN, Broglio KR, Kau S-W, Santa-Maria CA, Arun B, et al. Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(16):1179-83.
237. Abdollahi A, Zadeh HS, Akbari M, Tahmasbi S, Talei A, Hassanzadeh J. Investigation of Prognostic Factors and Survival without Recurrence in Patients with Breast Cancer. *Adv Biomed Res*. 2017;6:42-.
238. Clark GM, Sledge GW, Jr., Osborne CK, McGuire WL. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 1987;5(1):55-61.
239. Brackstone M, Reid G. Probiotics and Breast Health *ClinicalTrials.gov*2019 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT03290651>].

## Annexes – Figures et tableaux supplémentaires



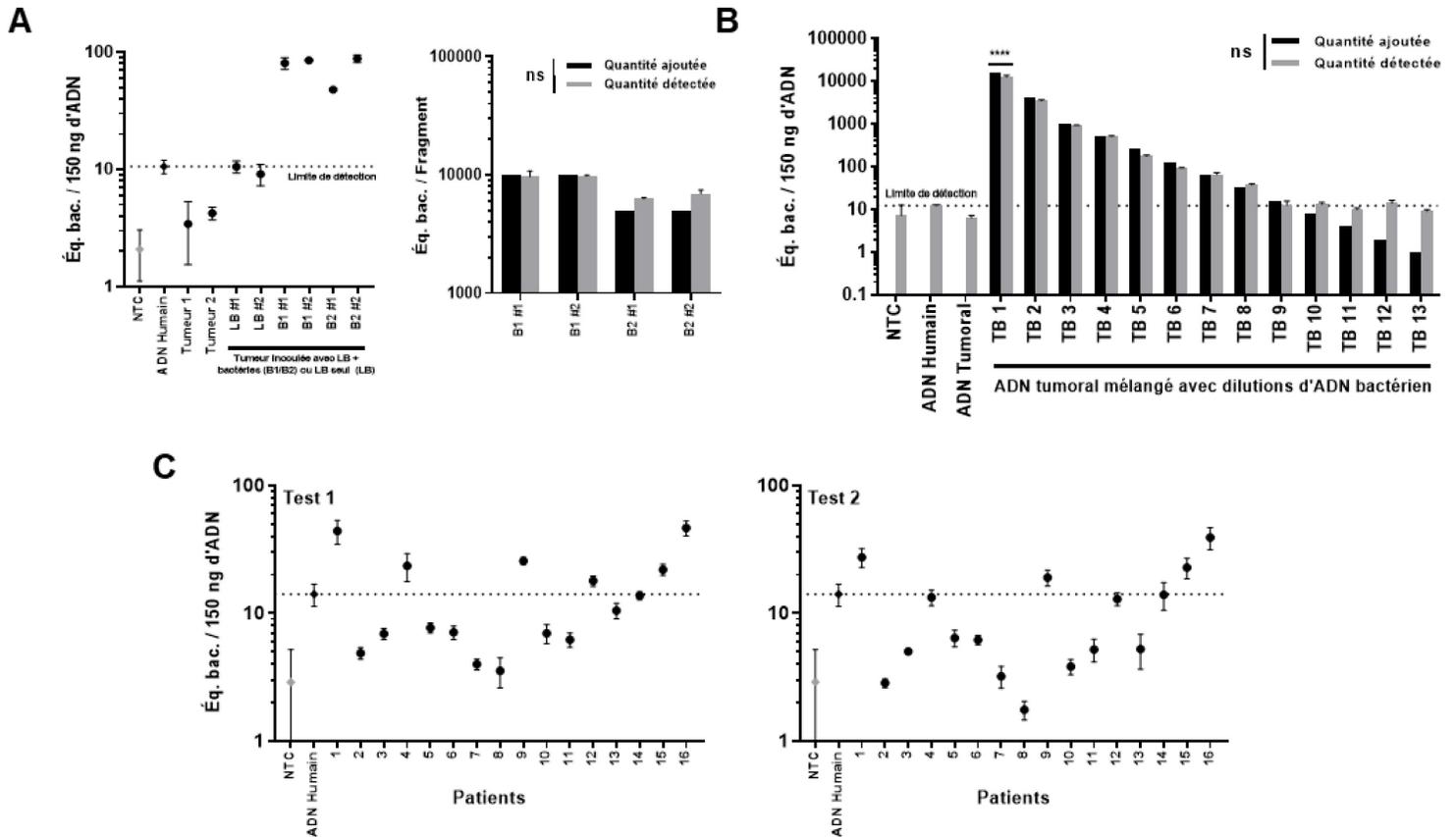
**Figure S1. – Optimisation des marquages moléculaires sur des *E. coli*, MDA-MB-231 et THP-1 en HistoGels.**

Pour optimiser le rapport signal/bruit pour les marquages, plusieurs dilutions des anticorps utilisés en IHC ou de la sonde utilisée en FISH ont été testées sur des *E. coli* seules et un mélange d'*E. coli* et de MDA-MB-231. Les anticorps utilisés en IF ont été testés sur un mélange des lignées cellulaires THP-1 et MDA-MB-231. Des images des dilutions optimales pour **(A)** les anticorps anti-LPS (1:750) ou anti-PGLY (1:1250) en IHC et pour **(C)** l'anticorps anti-CD68 (1:500) en IF sont présentées. Les noyaux cellulaires ont été contre-colorés avec de l'hématoxyline en IHC ou avec le Hoechst 33342 en IF. **(B)** Image représentant le protocole de FISH optimal pour la détection des séquences d'ARNr 16S avec la sonde EUB338-AF647 (5 ng/μL).



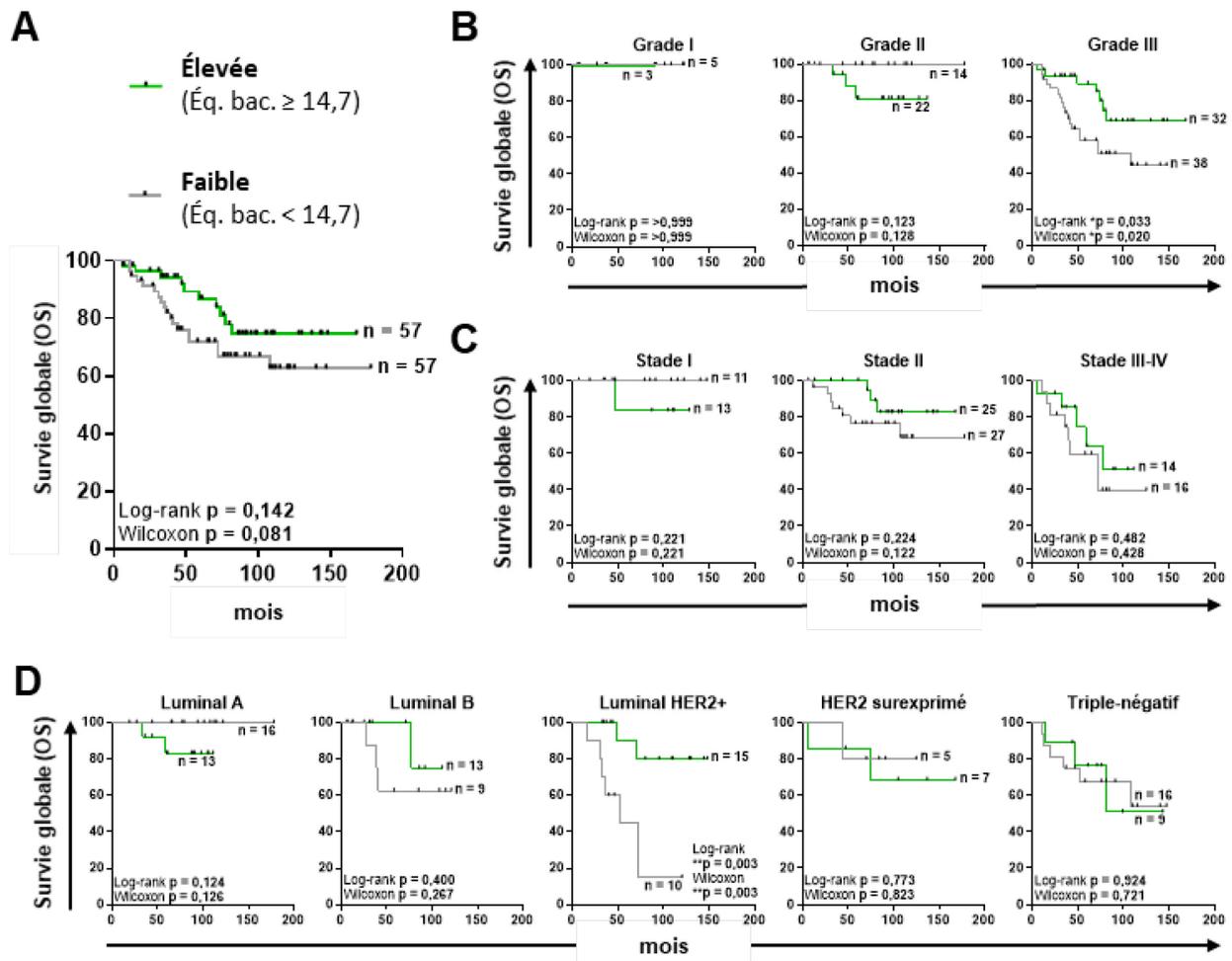
**Figure S2. – Établissement d’une courbe standard pour la quantification des équivalents bactériens dans les tumeurs du sein basée sur la qPCR et *E. coli* comme bactérie de référence.**

(A) Les suspensions d'*E. coli* ont été diluées à plusieurs densités optiques (OD600) et étalées sur des géloses LB. Les CFU ont été comptées et la concentration bactérienne initiale a été calculée (CFU/mL). La moyenne ± écart-type obtenue à partir du décompte de 3 plaques par dilution est indiquée. (B) Les suspensions d'*E. coli* de concentration bactérienne connue (calculée avec l’OD) sont mis en culot. L’ADN est extrait et quantifié à l’aide du NanoDrop. Chaque point représente 1-2 tube d’extraction de la même suspension bactérienne (moyenne ± écart-type). (C) Tableau représentant les standards qPCR établis qui sont utilisés pour la quantification des Éq. bac. et un test représentatif de la courbe standard et des contrôles (NTC et ADN humain uniquement).



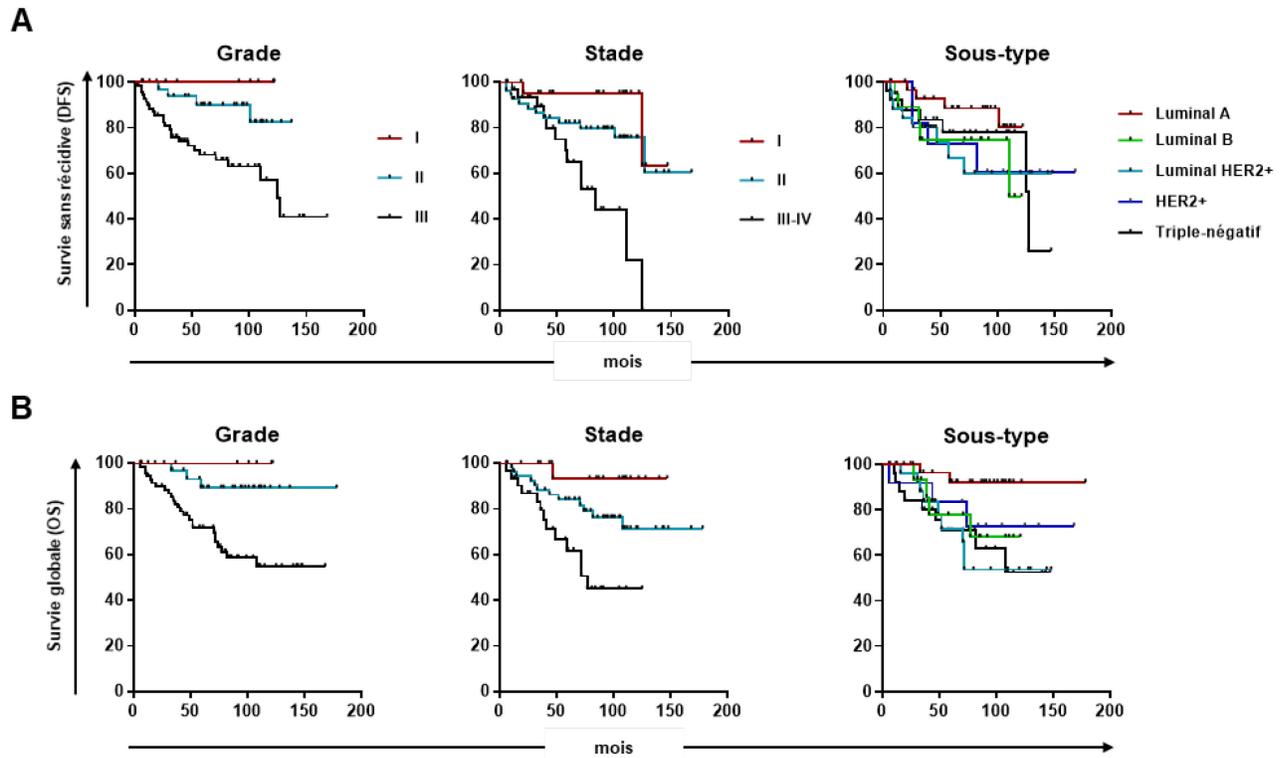
**Figure S3. – Validation de la précision et reproductibilité de la quantification des équivalents bactériens dans les tumeurs du sein avec la qPCR**

**(A)** Des échantillons tumoraux (#1 et #2) ont été inoculés par du milieu LB avec (B1 et B2) ou sans bactérie (LB) avant l'extraction d'ADN. La quantité bactérienne ajoutée est estimée à 10000 pour B1 et 5000 pour B2. Les Éq. bac. présents dans 150 ng d'ADN de l'échantillon tumoral ont été quantifiés avec la qPCR ciblant le gène de l'ARNr 16S (gauche). Le compte bactérie pour 150 ng d'ADN est transposé à la quantité totale d'ADN extraits de l'échantillon tumoral (à droite). **(B)** L'ADN d'un fragment de tumeur (ADN tumoral) a été combiné avec différentes quantités d'ADN d'*E. coli* (TB1 à 13) et testé avec la technique qPCR. Le contenu bactérien de TB1 et TB13 correspond respectivement à 16 384 et 1 Éq. bac. L'ADN bactérien a été dilué 1:4 de TB1 à TB3 et 1:2 de TB3 à TB13. La statistique calculée n'inclut pas les contrôles. **(C)** La quantification qPCR des Éq. bac. a été testée deux fois sur le même échantillon d'ADN tumoral pour évaluer la reproductibilité.



**Figure S4. – Une charge bactérienne intratumorale élevée influence la survie à long terme des patientes atteintes du cancer du sein.**

(A) Courbe de Kaplan-Meier pour l'OS de toute la cohorte classée en deux groupes, faible ou élevée, déterminés selon le nombre d'Éq. bac. quantifiés dans leur tumeur avec la technique qPCR. Courbes pour l'OS dans les sous-groupes de patientes avec des Éq. bac. faibles ou élevés classés par (B) le grade, (C) le stade pTNM ou (D) le sous-type de cancer. La signification statistique a été calculée avec le test Log-rank et le test Gehan-Breslow-Wilcoxon.



**Figure S5. – Analyses de survie supplémentaires de la cohorte complète.**

Les courbes de survie de Kaplan-Meier sont présentées pour **(A)** la DFS ou **(B)** l'OS de toute la cohorte classée en fonction du grade, du stade pTNM ou du sous-type de cancer du sein.

**Tableau S1. – Analyses univariées de variables clinicopathologiques associées avec la récurrence et la survie globale.**

| Caractéristique                               | n (%)    | Récurrence<br>n (%) | Temps avant la récurrence |                |                  | Décès<br>n (%) | Survie globale |                  |              |
|---|----------|---------------------|---------------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|------------------|--------------|
|   |          |                     | HR                        | (95% CI)       | valeur p         |                | HR             | (95% CI)         | valeur p     |
| <b>Âge au diagnostic (Années)</b>             |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| < 60  | 55 (48)  | 16 (29)             |                           | Réf.           |                  | 12 (22)        |                | Réf.             |              |
| ≥ 60  | 59 (52)  | 13 (22)             | 0.85                      | (0.41 - 1.78)  | 0.670            | 16 (27)        | 1.44           | (0.68 - 3.04)    | 0.343        |
| <b>Statut de la ménopause</b>                 |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Préménopause                                  | 24 (21)  | 7 (29)              |                           | Réf.           |                  | 4 (17)         |                | Réf.             |              |
| Postménopause                                 | 79 (69)  | 18 (23)             | 0.86                      | (0.35 - 2.06)  | 0.737            | 19 (24)        | 1.63           | (0.55 - 4.79)    | 0.377        |
| <b>Grossesse</b>                              |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Non   | 14 (12)  | 3 (21)              |                           | Réf.           |                  | 3 (21)         |                | Réf.             |              |
| Oui   | 75 (66)  | 20 (27)             | 1.12                      | (0.33 - 3.83)  | 0.852            | 17 (23)        | 1.19           | (0.35 - 4.08)    | 0.777        |
| <b>Historique familiale de cancer du sein</b> |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Non   | 66 (58)  | 17 (26)             |                           | Réf.           |                  | 15 (23)        |                | Réf.             |              |
| Oui   | 41 (36)  | 9 (22)              | 0.81                      | (0.36 - 1.83)  | 0.612            | 9 (22)         | 0.84           | (0.37 - 1.92)    | 0.682        |
| <b>Type d'intervention chirurgicale</b>       |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Tumorectomie                                  | 67 (59)  | 13 (19)             |                           | Réf.           |                  | 11 (16)        |                | Réf.             |              |
| Mastectomie                                   | 44 (39)  | 13 (30)             | 1.78                      | (0.82 - 3.85)  | 0.124            | 15 (34)        | 2.43           | (1.11 - 5.30)    | <b>0.026</b> |
| <b>Type de cancer du sein</b>                 |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Carcinome invasif tubulaire                   | 9 (8)    | 2 (22)              |                           | Réf.           |                  | 1 (11)         |                | Réf.             |              |
| Carcinome invasif canalaire                   | 85 (75)  | 21 (25)             | 0.97                      | (0.23 - 4.14)  | 0.964            | 19 (22)        | 1.71           | (0.23 - 12.74)   | 0.603        |
| Autres  | 20 (18)  | 6 (30)              | 1.16                      | (0.23 - 5.81)  | 0.853            | 8 (40)         | 3.13           | (0.39 - 25.08)   | 0.282        |
| <b>Statut des récepteurs hormonaux</b>        |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| ER et/ou PR positif                           | 76 (67)  | 17 (22)             |                           | Réf.           |                  | 15 (20)        |                | Réf.             |              |
| ER et PR négatif                              | 37 (32)  | 11 (30)             | 1.23                      | (0.58 - 2.65)  | 0.590            | 12 (32)        | 1.53           | (0.72 - 3.28)    | 0.270        |
| <b>Statut HER2</b>                            |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Positif                                       | 37 (32)  | 12 (32)             |                           | Réf.           |                  | 12 (32)        |                | Réf.             |              |
| Négatif                                       | 76 (67)  | 16 (21)             | 0.72                      | (0.34 - 1.55)  | 0.402            | 15 (20)        | 0.63           | (0.29 - 1.34)    | 0.231        |
| <b>Stade pTNM</b>                             |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| I   | 24 (21)  | 2 (8)               |                           | Réf.           |                  | 1 (4)          |                | Réf.             |              |
| II  | 54 (47)  | 12 (22)             | 2.68                      | (0.60 - 12.01) | 0.197            | 12 (22)        | 5.03           | (0.65 - 38.66)   | 0.121        |
| III-IV  | 31 (27)  | 13 (42)             | 8.62                      | (1.88 - 39.48) | <b>0.006</b>     | 13 (42)        | 13.12          | (1.71 - 100.76)  | <b>0.013</b> |
| <b>Stade pathologique T</b>                   |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| pT 0-1  | 41 (36)  | 9 (22)              |                           | Réf.           |                  | 4 (10)         |                | Réf.             |              |
| pT 2  | 58 (51)  | 15 (26)             | 1.29                      | (0.56 - 2.94)  | 0.550            | 17 (29)        | 3.34           | (1.12 - 9.23)    | <b>0.030</b> |
| pT 3-4  | 13 (11)  | 3 (23)              | 1.29                      | (0.35 - 4.78)  | 0.704            | 5 (38)         | 5.29           | (1.41 - 19.79)   | <b>0.013</b> |
| <b>Stade pathologique N</b>                   |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| pN 0  | 53 (46)  | 8 (15)              |                           | Réf.           |                  | 8 (15)         |                | Réf.             |              |
| pN 1-3  | 57 (50)  | 19 (33)             | 3.21                      | (1.38 - 7.47)  | <b>0.007</b>     | 18 (32)        | 2.53           | (1.09 - 5.85)    | <b>0.030</b> |
| <b>Grade de Nottingham</b>                    |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| I-II  | 44 (39)  | 4 (9)               |                           | Réf.           |                  | 3 (7)          |                | Réf.             |              |
| III   | 70 (61)  | 25 (36)             | 4.42                      | (1.53 - 12.74) | <b>0.006</b>     | 25 (36)        | 5.79           | (1.75 - 19.19)   | <b>0.004</b> |
| <b>Thérapie adjuvante</b>                     |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Non   | 15 (13)  | 9 (60)              |                           | Réf.           |                  | 6 (40)         |                | Réf.             |              |
| Oui   | 99 (87)  | 20 (20)             | 0.21                      | (0.09 - 0.47)  | <b>&lt;0.001</b> | 22 (22)        | 0.40           | (0.16 - 0.99)    | <b>0.047</b> |
| <b>Chimiothérapie</b>                         |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Non   | 46 (40)  | 15 (33)             |                           | Réf.           |                  | 16 (35)        |                | Réf.             |              |
| Oui   | 68 (60)  | 14 (21)             | 0.52                      | (0.25 - 1.09)  | 0.084            | 12 (18)        | 0.47           | (0.22 - 0.99)    | <b>0.046</b> |
| <b>Hormonothérapie</b>                        |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Non   | 48 (42)  | 16 (33)             |                           | Réf.           |                  | 16 (33)        |                | Réf.             |              |
| Oui   | 66 (58)  | 13 (20)             | 0.48                      | (0.23 - 1.01)  | 0.055            | 12 (18)        | 0.45           | (0.21 - 0.96)    | <b>0.037</b> |
| <b>Radiothérapie</b>                          |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Non   | 36 (32)  | 15 (42)             |                           | Réf.           |                  | 12 (33)        |                | Réf.             |              |
| Oui   | 78 (68)  | 14 (18)             | 0.36                      | (0.18 - 0.76)  | <b>0.007</b>     | 16 (21)        | 0.55           | (0.26 - 1.16)    | 0.116        |
| <b>Thérapie néoadjuvante</b>                  |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Non   | 100 (88) | 23 (23)             |                           | Réf.           |                  | 23 (23)        |                | Réf.             |              |
| Oui   | 14 (12)  | 6 (43)              | 2.19                      | (0.88 - 5.45)  | 0.091            | 5 (36)         | 1.50           | (0.57 - 3.96)    | 0.408        |
| <b>Chimiothérapie</b>                         |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Non   | 107 (94) | 27 (25)             |                           | Réf.           |                  | 26 (24)        |                | Réf.             |              |
| Oui   | 7 (6)    | 2 (29)              | 1.59                      | (0.37 - 6.78)  | 0.529            | 2 (29)         | 1.31           | (0.31 - 5.55)    | 0.710        |
| <b>Hormonothérapie</b>                        |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Non   | 108 (95) | 25 (23)             |                           | Réf.           |                  | 25 (23)        |                | Réf.             |              |
| Oui   | 6 (5)    | 4 (67)              | 3.10                      | (1.07 - 8.99)  | <b>0.038</b>     | 3 (50)         | 1.98           | (0.60 - 6.56)    | 0.264        |
| <b>Radiothérapie</b>                          |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Non   | 112 (98) | 28 (25)             |                           | Réf.           |                  | 28 (25)        |                | Réf.             |              |
| Oui   | 2 (2)    | 1 (50)              | 1.48                      | (0.20 - 10.97) | 0.700            | 0 (0)          | 0.05           | (0.00 - 1467.88) | 0.564        |
| <b>Infiltration bactérienne intratumorale</b> |          |                     |                           |                |                  |                |                |                  |              |
| Faible  | 57 (50)  | 20 (35)             |                           | Réf.           |                  | 18 (32)        |                | Réf.             |              |
| Élevée  | 57 (50)  | 9 (16)              | 0.38                      | (0.17 - 0.85)  | <b>0.018</b>     | 10 (18)        | 0.57           | (0.26 - 1.23)    | 0.151        |