



Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Médecine



ANNEE 2022

N°

TITRE DE LA THESE

Les tumeurs mammaires HER2-low : analyse comparative clinico-pathologique et moléculaire de cette nouvelle entité

THESE
Présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 03 juin 2022

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par Céline ANDRÉ
Née le 16 mai 1994
A EVREUX (27)

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à la disposition de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement dans la rédaction de vos travaux.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagiat, reproductions illicites encourrent une poursuite pénale.

De juridiction constante, en s'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans son propre document, l'étudiant se rend coupable d'un délit de contrefaçon (au sens de l'article L.335.1 et suivants du code de la propriété intellectuelle). Ce délit est dès lors constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics.

ANNEE 2022

N°

TITRE DE LA THESE

**Les tumeurs mammaires HER2-low : analyse comparative
clinico-pathologique et moléculaire de cette nouvelle entité**

THESE
Présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 03 juin 2022

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par Céline ANDRÉ
Née le 16 mai 1994
A EVREUX (27)

Année Universitaire 2021-2022
au 1^{er} Septembre 2021

Doyen :
Assesseurs :

M. Marc MAYNADIÉ
M. Pablo ORTEGA-DEBALLON
Mme Laurence DUVILLARD

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

			Discipline
M.	Jean-Louis	ALBERINI	Biophysiques et médecine nucléaire
M.	Sylvain	AUDIA	Médecine interne
M.	Marc	BARDOU	Pharmacologie clinique
M.	Jean-Noël	BASTIE	Hématologie - transfusion
M.	Emmanuel	BAULOT	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Christophe	BEDANE	Dermato-vénéréologie
M.	Yannick	BEJOT	Neurologie
Mme	Christine	BINQUET	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	Philippe	BONNIAUD	Pneumologie
M.	Alain	BONNIN	Parasitologie et mycologie
M.	Bernard	BONNOTTE	Immunologie
M.	Olivier	BOUCHOT	Chirurgie cardiovasculaire et thoracique
M.	Belaid	BOUHEMAD	Anesthésiologie - réanimation chirurgicale
M.	Alexis	BOZORG-GRAYELI	Oto-Rhino-Laryngologie
Mme	Marie-Claude	BRINDISI	Nutrition
M.	Alain	BRON	Ophthalmologie
Mme	Mary	CALLANAN (WILSON)	Hématologie type biologique
M.	Patrick	CALLIER	Génétique
Mme	Catherine	CHAMARD-NEUWIRTH	Bactériologie - virologie; hygiène hospitalière
M.	Pierre-Emmanuel	CHARLES	Réanimation
M.	Jean-Christophe	CHAUVET-GELINIER	Psychiatrie d'adultes, Addictologie
M.	Nicolas	CHEYNEL	Anatomie
M.	Alexandre	COCHET	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Luc	CORMIER	Urologie
M.	Yves	COTTIN	Cardiologie
M.	Charles	COUTANT	Gynécologie-obstétrique
M.	Gilles	CREHANGE	Oncologie-radiothérapie
Mme	Catherine	CREUZOT-GARCHER	Ophthalmologie
M.	Frédéric	DALLE	Parasitologie et mycologie
M.	Alexis	DE ROUGEMONT	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M.	Hervé	DEVILLIERS	Médecine interne
Mme	Laurence	DUVILLARD	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Olivier	FACY	Chirurgie générale
Mme	Laurence	FAIVRE-OLIVIER	Génétique médicale
Mme	Patricia	FAUQUE	Biologie et Médecine du Développement
Mme	Irène	FRANCOIS-PURSSELL	Médecine légale et droit de la santé
Mme	Marjolaine	GEORGES	Pneumologie
M.	François	GHIRINGHELLI	Cancérologie
M.	Pierre Grégoire	GUINOT	Anesthésiologie – réanimation chirurgicale
M.	Frédéric	HUET	Pédiatrie
Mme	Agnès	JACQUIN	Physiologie
M.	Pierre	JOUANNY	Gériatrie
M.	Philippe	KADHEL	Gynécologie-obstétrique
M.	Sylvain	LADOIRE	Histologie
M.	Gabriel	LAURENT	Cardiologie
M.	Côme	LEPAGE	Hépatogastroentérologie
M.	Romarc	LOFFROY	Radiologie et imagerie médicale
M.	Luc	LORGIS	Cardiologie

M.	Jean-Francis	MAILLEFERT	Rhumatologie
M.	Cyriaque Patrick	MANCKOUNDIA	Gériatrie
M.	Sylvain	MANFREDI	Hépatogastroentérologie
M.	Laurent	MARTIN	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	David	MASSON	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Marc	MAYNADIÉ	Hématologie – transfusion
M.	Marco	MIDULLA	Radiologie et imagerie médicale
M.	Thibault	MOREAU	Neurologie
Mme	Christiane	MOUSSON	Néphrologie
M.	Paul	ORNETTI	Rhumatologie
M.	Pablo	ORTEGA-DEBALLON	Chirurgie Générale
M.	Pierre Benoit	PAGES	Chirurgie thoracique et vasculaire
M.	Jean-Michel	PETIT	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Christophe	PHILIPPE	Génétique
M.	Lionel	PIROTH	Maladies infectieuses
Mme	Catherine	QUANTIN	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Jean-Pierre	QUENOT	Réanimation
M.	Patrick	RAY	Médecine d'urgence
M.	Patrick	RAT	Chirurgie générale
M.	Jean-Michel	REBIBOU	Néphrologie
M.	Frédéric	RICOLFI	Radiologie et imagerie médicale
M.	Paul	SAGOT	Gynécologie-obstétrique
M	Maxime	SAMSON	Médecine interne
M.	Emmanuel	SAPIN	Chirurgie Infantile
M.	Emmanuel	SIMON	Gynécologie-obstétrique
M.	Éric	STEINMETZ	Chirurgie vasculaire
Mme	Christel	THAUVIN	Génétique
M.	Benoit	TROJAK	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
M.	Pierre	VABRES	Dermato-vénéréologie
			(Mission temporaire à Londres du 01/09/2021 au 31/08/2023)
M.	Bruno	VERGÈS	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Narcisse	ZWETYENGA	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES MEDICALES

			Discipline Universitaire
Mme	Lucie	AMOUREUX BOYER	Bactériologie
Mme	Louise	BASMACIYAN	Parasitologie-mycologie
Mme	Shaliha	BÉCHOUA	Biologie et médecine du développement
			(Disponibilité du 16/11/2020 au 15/11/2021)
M.	Mathieu	BLOT	Maladies infectieuses
M.	Benjamin	BOUILLET	Endocrinologie
Mme	Marie-Lorraine	CHRETIEN	Hématologie
Mme	Vanessa	COTTET	Nutrition
M.	Damien	DENIMAL	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Valentin	DERANGERE	Histologie
Mme	Ségolène	GAMBERT	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Françoise	GOIRAND	Pharmacologie fondamentale
M.	Charles	GUENANCIA	Physiologie
M.	Alain	LALANDE	Biophysique et médecine nucléaire
Mme	Stéphanie	LEMAIRE-EWING	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Anne-Sophie	MARIET	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Pierre	MARTZ	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Thomas	MOUILLOT	Physiologie
M.	Alain	PUTOT	Gériatrie
Mme	Claire	TINEL	Néphrologie
M.	Antonio	VITOBELLO	Génétique
M.	Paul-Mickaël	WALKER	Biophysique et médecine nucléaire

PROFESSEURS EMERITES

M.	Jean-François	BESANCENOT	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Bernard	BONIN	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Laurent	BRONDEL	(01/09/2021 au 31/08/2024)
M.	François	BRUNOTTE	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Philippe	CAMUS	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Jean-Marie	CASILLAS-GIL	(01/09/2020 au 31/08/2023)
M.	Pascal	CHAVANET	(01/09/2021 au 31/08/2024)
M.	Jean-Pierre	DIDIER	(01/11/2018 au 31/10/2021)
M.	Serge	DOUVIER	(15/12/2020 au 14/12/2023)
M.	Claude	GIRARD	(01/01/2019 au 31/12/2021)
M.	Maurice	GIROUD	(01/09/2019 au 31/12/2021)
M.	Patrick	HILLON	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Henri-Jacques	SMOLIK	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Pierre	TROUILLOUD	(01/09/2020 au 31/08/2023)

PROFESSEUR ASSOCIE DES DISCIPLINES MEDICALES

M.	Jacques	BEURAIN	Neurochirurgie
----	---------	----------------	----------------

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	Katia	MAZALOVIC	Médecine Générale
Mme	Claire	ZABAWA	Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Didier	CANNET	Médecine Générale
M.	Clément	CHARRA	Médecine Générale
M.	Arnaud	GOUGET	Médecine Générale
M.	François	MORLON	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Jérôme	BEAUGRAND	Médecine Générale
Mme	Anne	COMBERNOUX -WALDNER	Médecine Générale
M.	Benoit	DAUTRICHE	Médecine Générale
M.	Alexandre	DELESVAUX	Médecine Générale
M.	Rémi	DURAND	Médecine Générale
M.	Olivier	MAIZIERES	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Lucie	BERNARD	Anglais
Mme	Anaïs	CARNET	Anglais
Mme	Catherine	LEJEUNE	Pôle Epidémiologie
M.	Gaëtan	JEGO	Biologie Cellulaire

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Marianne	ZELLER	Physiologie
-----	----------	---------------	-------------

PROFESSEURS AGREGES de L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE

Mme	Marceline	EVARD	Anglais
Mme	Lucie	MAILLARD	Anglais

PROFESSEUR CERTIFIE

M.	Philippe	DE LA GRANGE	Anglais
----	----------	---------------------	---------

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Mathieu	BOULIN	Pharmacie clinique
M.	François	GIRODON	Sciences biologiques, fondamentales et cliniques
Mme	Evelyne	KOHLI	Immunologie

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES
PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES**

Mme	Amélie	CRANSAC	Pharmacie clinique
M.	Philippe	FAGNONI	Pharmacie clinique
M.	Marc	SAUTOUR	Botanique et cryptogamie
M.	Antonin	SCHMITT	Pharmacologie

L'UFR des Sciences de Santé de Dijon, Circonscription Médecine, déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

COMPOSITION DU JURY

Président : Monsieur le Professeur Laurent MARTIN

Membres : Monsieur le Professeur Sylvain LADOIRE

Monsieur le Docteur Laurent ARNOULD

Madame le Docteur Isabelle DESMOULINS

Monsieur le Docteur Romain BOIDOT

SERMENT D'HIPPOCRATE

"Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque."

REMERCIEMENTS

A mon Président de thèse,

Monsieur le Professeur Laurent MARTIN

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous suis reconnaissante pour votre soutien, votre bienveillance, votre patience et votre apprentissage dispensé durant ces quatre premières années d'internat.

Veillez recevoir mes plus sincères remerciements et mon plus profond respect.

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Sylvain LADOIRE

Vous me faites l'honneur de compter parmi les membres de ce jury. Je vous remercie de la considération que vous portez à ce travail et de votre implication reconnue auprès des internes.

Veillez recevoir ma gratitude ainsi que mon profond respect.

Monsieur le Docteur Laurent ARNOULD, Directeur de thèse

Vous m'avez fait l'honneur de me confier ce travail pour lequel je vous suis extrêmement reconnaissante. Je vous remercie pour votre confiance, votre grande disponibilité, votre encadrement et vos précieux conseils tout au long de la réalisation de ce projet. Je vous remercie également pour la qualité de votre enseignement qui a infiniment contribué à ma formation.

Soyez assuré de mon immense gratitude et de mon plus profond respect.

Madame le Docteur Isabelle DESMOULINS

Vous me faites l'honneur de siéger au sein de ce jury afin de juger mon travail de thèse. Je vous remercie pour votre intérêt et pour votre expertise en cancérologie.

Recevez l'expression de ma gratitude et de mon respect.

Monsieur le Docteur Romain BOIDOT

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce projet, de votre précieuse implication et de vos conseils dans la réalisation de ce travail.

Recevez l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Mes remerciements vont également :

Aux médecins du service de pathologie du CHU de Dijon,

Merci à Mathilde, Catherine, Haingo, Alice, Fara, Georges et Romain, pour votre enseignement tout au long de ces quatre années d'internat, votre patience et vos conseils.

Merci à Marie-Hélène pour ce semestre de dermatopathologie qui je l'espère m'a permis d'acquérir des connaissances précieuses. Je vous remercie pour votre bienveillance et pour la qualité de votre enseignement.

Sans oublier Selim et Charles-Henri, qui étaient toujours disponibles en cas de besoin. Merci pour votre bonne humeur.

Aux médecins du service de pathologie du CGFL,

Laurent Arnould, Céline, Françoise, Anthony et Émilie, je ne vous remercierai jamais assez pour ces deux semestres des plus enrichissants. Vous savez transmettre votre passion pour notre spécialité ! Céline, merci pour votre patience et votre partage des compétences durant mon apprentissage en tissus mous qui m'a permis d'apprécier ce domaine. Françoise, merci pour ton soutien sans limite et ta disponibilité. Anthony et Émilie, merci pour votre enseignement et votre disponibilité. Encore merci à tous pour votre sympathie, votre intégration des internes au sein de votre équipe et votre envie constante de nous faire partager vos connaissances.

A l'équipe du service de Biologie Moléculaire du CGFL,

Je tiens à remercier l'ensemble des techniciens de la plateforme de pathologie moléculaire pour le travail considérable effectué ayant permis la réalisation de ce projet. Un remerciement particulier à Romain et Corentin, sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour, vous m'avez donné l'occasion de travailler avec vous et avez toujours répondu à toutes mes (nombreuses !) questions avec patience, gentillesse et pédagogie.

A l'ensemble de l'équipe (techniciens et secrétaires) du service de pathologie du CGFL,

Aux filles, Céline, Mylène, Marie Line et Nadège merci pour votre soutien, nos petites pauses discussions dans le bureau des internes, vos encouragements et votre bonne humeur ! Ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe (Maxime, Sonia, Inès, Laurène, Johanna, Alisson...) un énorme merci à vous pour tout le travail demandé que vous avez toujours effectué avec efficacité, votre implication a été super ! Laura, merci pour ta patience, ta douceur et ta bienveillance.

Ton aide a été des plus précieuses. Marie, Rabéa et Amandine, merci pour votre accueil et votre sympathie durant ces deux semestres passés avec vous.

Aux techniciens du service de pathologie du CHU de Dijon,

Sophie, Anne-Cécile, Carole, Carinnette, Karibou, Damien, Claire, Amandines, Cindy, Stéphanie, Mélanie, Aurore... Merci pour votre implication dans la formation des internes et votre disponibilité.

A l'équipe du service de Biologie Moléculaire du CHU de Dijon,

Merci à Caroline, Benjamin, Nadège et Lyse-Marie pour votre disponibilité et votre apprentissage. Un merci particulier à Alicia, Célia et Manon, les filles merci pour votre accueil et pour nos petites sorties durant ce travail m'ayant permis de décompresser un peu !

Au service de Médecine Légale du CHU de Dijon,

A l'équipe médicale (Mélanie, Thibault, Bruno, Mme le Pr FRANCOIS-PURSSELL) et paramédicale (Nathalie et Isabelle, les infirmières ainsi que toute l'équipe de la chambre mortuaire) pour votre accueil chaleureux, votre sympathie et votre apprentissage ! Je garderai un très bon souvenir de ce semestre passé avec vous.

A toute l'équipe du service de Dermatologie du CHU de Dijon,

Aux Dr DALAC et COLLET, au Pr BEDANE, à Bertille, Géraldine, Maud et Camille, merci pour votre accueil et vos conseils dispensés au cours de vos consultations me permettant de mieux appréhender la pathologie inflammatoire et tumorale en dermatopathologie. A Camille (ou plutôt au Dr Landais !), co-interne puis chef, merci pour ta bonne humeur, ton sourire et tes conseils pendant nos consultations.

A mes co-internes,

D'anapath (Lisa, Anne, Ossama, Pauline, Mathilde, Romain, Alexia, Ségolène, Amélie, Charles...) et d'ailleurs (Marie, Mélo et Camille), merci pour ces années passées ensembles. A nos longues journées de macro et à toutes nos pauses café ! Mélo et Camille, mes deux copines de dermato, merci pour ces après-midis d'avis à parcourir tout l'hôpital et pour votre confiance lors des consultations ! Vous avez été un rayon de soleil dans notre petit cagibi !

A Carlito,

Évidemment, tu méritais d'avoir ton petit paragraphe spécial. Dès le premier jour et durant tous ceux qui ont suivi, tu as été mon acolyte dans cette aventure. Bientôt ton tour, on arrive à la fin ! On a partagé nos semaines de galère, nos épisodes de doutes et surtout beaucoup de rires ! Merci d'avoir toujours été là pour m'accompagner, égayer nos journées et partager nos avis cinéma !

A mes amies :

Mélodine, ma meilleure amie de toujours malgré la distance. Je ne me rappelle même plus depuis combien de temps on se connaît tellement tu as toujours été là. On sait toutes les deux ce que l'on a dû traverser. Tu me manques énormément.

Michella et Anne-Laure, on ne compte plus les années ! Ces derniers temps ont été compliqués pour se voir mais on fête bientôt ça ensemble !

A ma famille, mes parents et ma sœur, sans qui rien n'aurait été possible. Vous avez toujours été là pour moi. Merci pour tous vos sacrifices, votre soutien et votre patience. Vous avez toute ma reconnaissance. Claire, tu sais à quel point je tiens à toi. Tu m'as toujours soutenue. On fêtera de nouveau ça comme il se doit chez toi, de l'autre côté de l'Atlantique.

A Basile, mon pilier, à me supporter jour après jour. Du premier jusqu'au dernier, tu es et tu resteras mon meilleur soutien. Tu connais mon attachement.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION GENERALE.....	19
ARTICLE.....	50
ABSTRACT	52
INTRODUCTION	53
METHODS	55
Immunohistochemistry (IHC).....	57
HER2 Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (FISH)	58
Molecular analysis	58
Statistical analysis	60
RESULTS	60
Clinico-pathological characteristics	60
Genomic profiles.....	64
Transcriptomic profiles	66
Analysis of global gene expression and phenotypic profiles within the different pathways	70
Impact of activating mutations on the whole transcriptome and the specific signaling pathways ..	72
DISCUSSION	73
CONCLUSIONS	81
DECLARATIONS	82
CONCLUSIONS SIGNEES	83
REFERENCES.....	87
SUPPLEMENTARY DATA	93

TABLE DES TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX ET FIGURES DE L'INTRODUCTION GENERALE

Figure 1. Nombre estimé de cas incidents de cancer dans le monde chez la femme en 2020 selon l'OMS.....	20
Figure 2. Grands principes de prise en charge thérapeutique du cancer du sein selon l'HAS (Guide ALD 30 Janvier 2010).....	21
Figure 3. Exemples d'infiltrat pauvre en TILs (A) et riche en TILs (B)	24
Figure 4. Exemples de marquages immunohistochimiques issus du recueil de patients (CGFL).....	26
Figure 5. Algorithme d'évaluation de l'expression protéique de HER2 par immunohistochimie selon Wolff.	26
Figure 6. Exemples d'images de FISH HER2 issus du recueil de patients (CGFL), sans amplification (A) et avec amplification (B)	27
Figure 7. Algorithme d'évaluation de l'expression protéique de HER2 par hybridation <i>in situ</i> selon Wolff.	27
Figure 8. Activation des trois principales voies moléculaires en aval de HER2 et thérapies ciblées anti-HER2 selon Marchio.....	28
Figure 9. Ciblage de la voie de signalisation PI3K avec des traitements inhibiteurs selon Lorusso.	33
Figure 10. Évolution des définitions et dénominations du statut HER2 depuis 2014 selon le GEPFICS 2021.	36
Figure 11. Évolution de paradigme dans la définition du statut HER2 dans le cancer du sein selon Marchio.	36
Figure 12. Courbes de Kaplan-Meier sur la survie globale (Overall Survival OS) par statut hormonal (hormone receptor HR) et statut HER2 par IHC.	38
Figure 13. Distribution des sous-types intrinsèques PAM50 dans l'ensemble de la cohorte et parmi chaque sous-type de cancer du sein dont les HER2-low RH+ et RH- selon Agostinetti.....	40
Figure 14. Nouveaux agents et mécanismes permettant de cibler le cancer du sein à faible expression de HER2 (HER2-low) selon Tarantino.....	41

TABLEAUX ET FIGURES DE L'ARTICLE

TABLES

Table 1. Clinical and pathological characteristics of HER2-low carcinoma compared to two control groups.	61
Table 2. Clinical and pathological characteristics of HER2 2+ double-equivocal carcinoma compared to 5 control groups.	62
Table 3. Mutation rates in genes, compared between HER2-low carcinomas and two control groups	66
Table 4. Mutation rates in genes, compared between HER2 double-equivocal and five control groups	66

FIGURES

Figure 1. Flowchart of samples enrolled in the study and reasons for exclusion	56
Figure 2. <i>ERBB2</i> mRNA expression level between HER2 double-equivocal compared to 4 control groups (A), HER2-low compared to two control groups (B) and according with presence of activating mutation on AKT pathway (C).....	67
Figure 3. Principal component analysis of whole transcriptome between HER2-double equivocal and 4 control groups (A), HER2-low and two control groups (B) and according with presence of activating mutation on AKT pathway (C). Distance matrix of whole transcriptome between all the groups (D).	67
Figure 4. Principal component analysis of PI3K-AKT pathway between HER2-double equivocal and 4 control groups (A), HER2-low and two control groups (B) and according with presence of activating mutation on AKT pathway (C). Heatmap of PI3K-AKT pathway between all the groups (D).....	68
Figure 5. Principal component analysis of JAK-STAT pathway between HER2-double equivocal and 4 control groups (A) and HER2-low and two control groups (B). Heatmap of JAK-STAT pathway between all the groups (C).	69
Figure 6. Principal component analysis of MAPK pathway between HER2-double equivocal and 4 control groups (A), HER2-low and two control groups (B) and according with presence of activating mutation on AKT pathway (C). Heatmap of MAPK pathway between all the groups (D).....	70
Figure 7. Single-sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA) between all the groups and according with presence of activating mutation on AKT pathway in the three pathways (A) and Heatmap (B).	71

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Antibodies and details of immunohistochemistry analyses performed in the present study	94
Table S2. Details of FISH (Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization) analyses performed in the present study	95
Table S3. Pathogenic variants of genes identified in the three groups by DNA-sequencing...	96

LISTE DES ABREVIATIONS

ACR : American College of Radiology

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ALD : Affection Longue Durée

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé

ARN : Acide Ribonucléique

ASCO : American Society of Clinical Oncology

BI-RADS : Breast Imaging-Reporting And Data System

BRCA1 : BReast CAncer 1

BRCA2 : BReast CAncer 2

CAP : College of American Pathologists

CEP 17 : Chromosome Enumeration Probe 17

CGFL: Georges-François Leclerc Cancer Center

DNA : Deoxyribonucleic Acid

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ER: Estrogen Receptors

ERR α : Estrogen-Related Receptor Alpha

ER α/β : Estrogen Receptor α/β

FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridization

GEFPICS : Groupe d'Étude des Facteurs Pronostiques Immunohistochimiques dans le Cancer du Sein

H&E : Hemalun and Eosin

HAS : Haute Autorité de Santé

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HR: Hormone Receptor

IHC : Immunohistochemistry

INCA : Institut National Du Cancer

ISH : *In Situ* Hybridization

JAK-STAT : Janus kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin

NGS : Next Generation Sequencing

NOS : Not Otherwise Specified / NST : Non Specific Type

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PALB2 : Partner And Localizer of BRCA2

pCR : pathological Complete Response

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase

PIK3CA : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha

PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate

PR: Progesterone Receptors

PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog

RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

RE / RO : Récepteur à l'Œstrogène

RH : Récepteurs Hormonaux

RP : Récepteur à la Progestérone

RNA : Ribonucleic Acid

SBR : Scarff Bloom Richardson

TILs: Tumor-Infiltrating Lymphocytes

TNM: Tumor Node Metastasis

UICC : Union for International Cancer Control

WHO : World Health Organization

INTRODUCTION GENERALE

I. Généralités

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme dans le monde. L'incidence mondiale rapportée par l'Organisation Mondiale de la Santé est de plus de 2 millions de nouveaux cas en 2018. D'après les dernières données publiées par l'INCA en 2018, elle a presque doublé en France durant les 30 dernières années (+ 0,6% par an entre 2010 et 2018) (Figure 1).

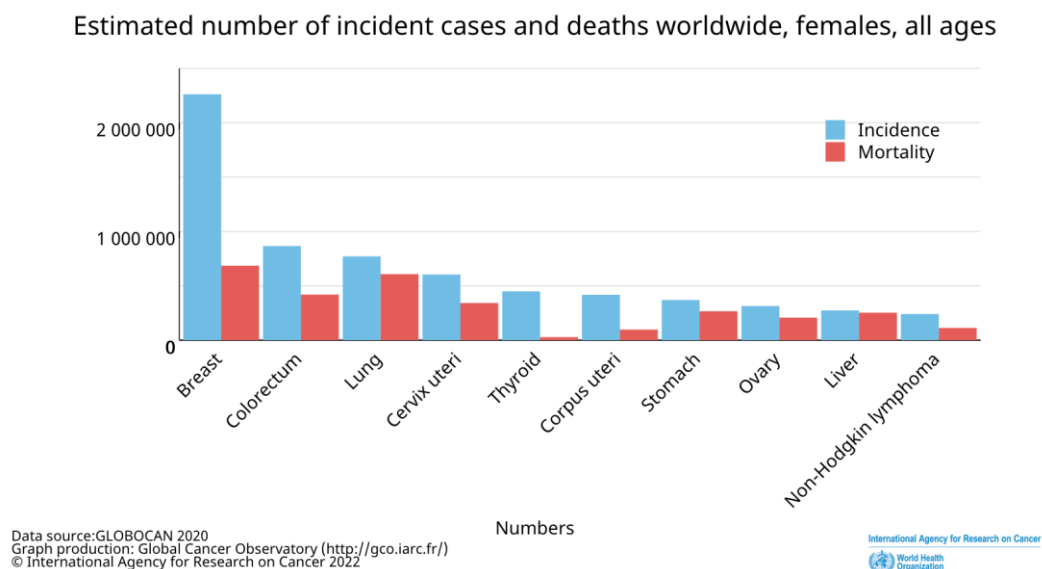


Figure 1. Nombre estimé de cas incidents de cancer dans le monde chez la femme en 2020 selon l'OMS.

C'est un cancer classiquement décrit comme de bon pronostic avec une survie globale stable de l'ordre de 87% à 5 ans et de 76% à 10 ans. Cela s'explique par la généralisation du dépistage organisé, qui associe examen clinique (palpation mammaire et des aires ganglionnaires) et imagerie tous les deux ans dès l'âge de 50 ans en France. La mammographie permet la réalisation de la classification BI-RADS validée par l'American College of Radiology (ACR) en six catégories (ACR 0 à ACR 5) adaptée par l'ANAES en 2002. Les principaux facteurs de risque connus sont le facteur génétique (présence de mutations constitutionnelles des gènes de prédisposition BRCA1, BRCA2 et/ou PALB2) et le facteur hormonal (exposition œstrogénique prolongée : absence de grossesse, grossesse tardive, absence d'allaitement, premières règles précoces, ménopause tardive, traitement hormonal substitutif...).

L'arsenal thérapeutique du cancer du sein est en constante évolution et se base sur le stade de la maladie (précoce ou tardif) et les caractéristiques histo-pronostiques de la tumeur.

Le schéma thérapeutique est discuté en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) (Figure 2).

En cas de diagnostic à la phase précoce, le traitement repose sur une chirurgie première (conservatrice ou non) avec technique du ganglion sentinelle (exérèse du premier relais ganglionnaire sur l'aire de drainage lymphatique) suivi d'un traitement adjuvant selon l'analyse anatomopathologique (radiothérapie, chimiothérapie à base d'anthracyclines et de taxanes, hormonothérapie en cas de cancer RH -récepteurs hormonaux- positifs et thérapie ciblée anti-HER2 en cas de cancer HER2 -Human Epidermal Growth Factor Receptor 2- amplifié). Un curage axillaire peut compléter le geste en cas de ganglion sentinelle positif. Un traitement systémique néo-adjuvant (chimiothérapie et/ou hormonothérapie) peut précéder la chirurgie en cas de tumeur très volumineuse et/ou de cancer inflammatoire afin de réduire le volume tumoral.

En cas de diagnostic à la phase métastatique, un traitement médical sera effectué en première intention, se basant sur les mêmes caractéristiques clinico-biologiques de la tumeur (statuts RH et HER2), possiblement associé à des traitements loco-régionaux des métastases selon leur site (radiothérapie, notamment cérébrale et osseuse).

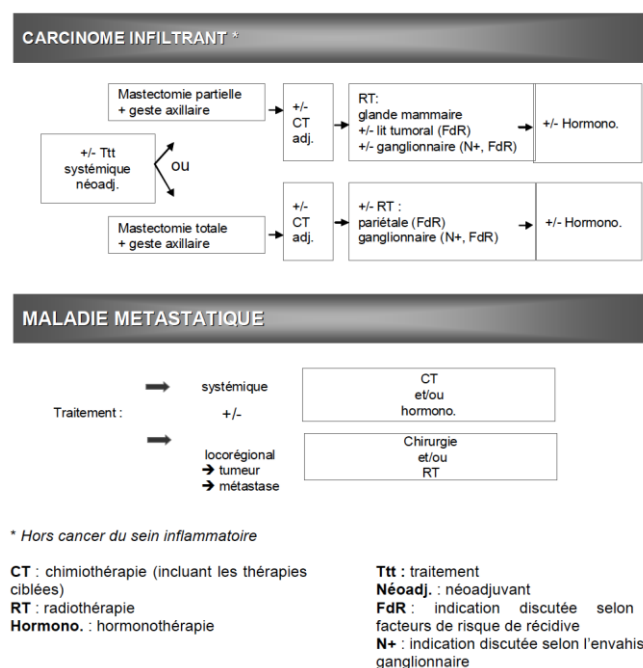


Figure 2. Grands principes de prise en charge thérapeutique du cancer du sein selon l'HAS (Guide ALD 30 Janvier 2010)

Thérapies ciblées anti-HER2

Les carcinomes mammaires surexprimant la protéine HER2 peuvent bénéficier d'une thérapie ciblée anti-HER2, ce qui a significativement amélioré leur pronostic et leur survie. Ce traitement dure 1 an pour les stades localisés et jusqu'à progression pour les stades métastatiques. Le chef de file est le Trastuzumab et correspond à un anticorps monoclonal humanisé ciblant le domaine extracellulaire de HER2. Son utilité en situation adjuvante et néo-adjuvante a été prouvée lors de nombreux essais cliniques et permet une diminution du risque de récurrence et de décès (augmentation du taux de réponse pathologique complète (pCR – pathological complete response) en situation néo-adjuvante ; amélioration significative des taux de survie sans récurrence et diminution du risque de décès en situation adjuvante).

Des mécanismes de résistance ou d'échappement au traitement peuvent également survenir, ayant accéléré le développement d'autres molécules, notamment le Lapatinib (inhibiteur réversible de tyrosine kinase), le Pertuzumab (anticorps monoclonal humanisé utilisé en situation adjuvante puis néo-adjuvante), le TDM-1 (anticorps conjugué Trastuzumab-Emtansine)...

II. Diagnostic

Dès lors qu'une suspicion de malignité est établie (lésion classée ACR4 ou 5), l'examen anatomopathologique par microbiopsie sous échographie est obligatoire afin d'obtenir une preuve histologique. En cas de cancer du sein, il convient d'apprécier les premiers éléments histo-pronostiques permettant de définir la prise en charge thérapeutique et théranostique, en tenant compte de données morphologiques, phénotypiques (immunohistochimiques) et moléculaires.

Critères morphologiques :

- Grade SBR - Scarff Bloom Richardson - modifié par Elston et Ellis

Le grade est un élément histopronostique important et comprend trois items : différenciation glandulaire, pléomorphisme nucléaire et compte mitotique sur 10 champs à fort grossissement (x400). Le score final permet de définir trois grades (I, II et III). L'index mitotique (nombre de mitoses /mm²) constitue à lui seul un facteur de mauvais pronostic en cas de chiffre élevé et un facteur prédictif de bonne réponse au traitement adjuvant et néo-adjuvant (notamment par chimiothérapie).

- Statut TNM

Il est défini par l'AJCC (American Joint Commission of Cancer)/UICC (Union for International Cancer Control) dont la dernière version date de 2017 (8ème édition). Il comprend la taille tumorale T (corrélée à l'envahissement ganglionnaire et la survie globale), le statut ganglionnaire N (ganglion sentinelle ou curage) et la présence de métastase à distance M. La présence d'un envahissement ganglionnaire représente un facteur pronostique pur étudié par de nombreuses équipes et est associée à une diminution importante de la survie globale à 10 ans. Toutefois, le caractère péjoratif de cellules tumorales isolées classées pN0i+ (définies par la présence de cellules tumorales isolées ou de clusters < 0.2 mm de grand axe) et de micro-métastases classées pN1mi (définie par la présence d'une métastase > 0.2 mm et < 2.0 mm) n'est cependant pas encore clairement établi (1).

- Sous-type histologique

Il existe plusieurs sous-types de carcinomes mammaires infiltrants décrits dans la 5ème édition de la classification OMS. Cette diversité conditionne en partie le pronostic par la présence de types histologiques classiquement de très bon pronostic (Exemple : carcinome tubuleux ; carcinome métaplasique adéno-squameux de bas grade...) ou de mauvais pronostic (Exemple : carcinome métaplasique à cellules fusiformes de haut grade ; carcinome métaplasique avec différenciation mésenchymateuse hétérologue...). Le sous-type histologique le plus fréquent est le carcinome de type non spécifique (*invasive carcinoma of no special type*, anciennement canalaire ou NST), représentant 80% des carcinomes mammaires.

D'autres critères sont pris en compte comme la présence d'une composante intracanaulaire extensive (= présence de plus de 25% de carcinome *in situ* constituant un facteur de mauvais pronostic) ; la présence d'embole vasculaire néoplasique (facteur de récurrence locale et de rechute métastatique associé à une baisse de la survie globale) ; une atteinte des berges d'exérèse chirurgicale ; la quantification des TILs (= pourcentage de lymphocytes intra-tumoraux (2), reflet de la réponse immune de l'hôte qui serait un facteur de meilleur pronostic en cas de pourcentage élevé, notamment dans les carcinomes triple-négatifs et HER2 positifs mais dont la valeur pronostique reste encore à déterminer (Figure 3).

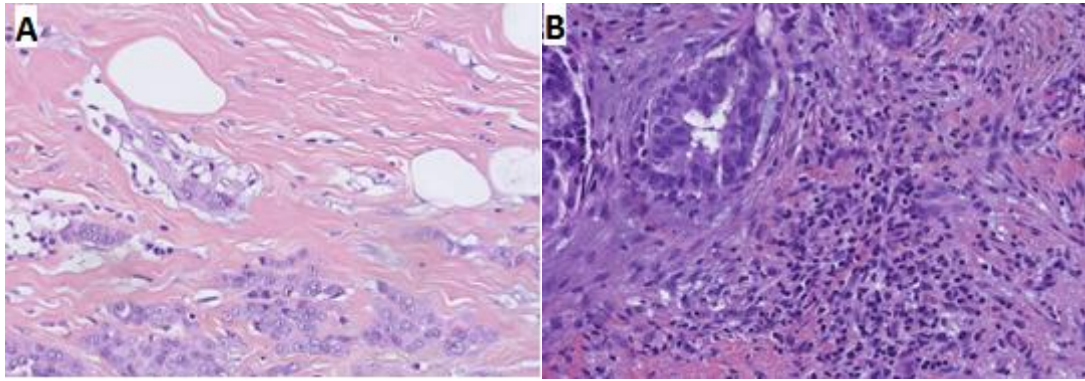


Figure 3. Exemples d'infiltrat pauvre en TILs (A) et riche en TILs (B)

Critères immunohistochimiques :

- Statut des récepteurs hormonaux RH (à l'œstrogène RE / RO et à la progestérone RP)

Il permet de prédire la sensibilité de la tumeur à l'hormonothérapie, en particulier pour les RO et induit une diminution du risque de rechute métastatique et de décès. Il doit être réalisé en routine sur la composante carcinomateuse infiltrante et selon une appréciation semi-quantitative. L'analyse correspond au nombre de cellules carcinomateuses positives sur le nombre de cellules carcinomateuses total s'exprimant en % et intensité de marquage. Est considéré comme positif en France tout marquage nucléaire $\geq 10\%$ quelle que soit son intensité.

- Index de prolifération par le Ki67 (ou Mib1)

Il correspond à un marquage nucléaire des cellules entrées dans le cycle cellulaire (phases G1-S-G2-M) et est décrit comme valeur pronostique dans les carcinomes mammaires. La détermination de cet index s'effectue par le décompte du % de cellules tumorales marquées (appréciation globale), quelque soit l'intensité du marquage.

- Statut d'amplification de HER2

La détermination du statut HER2 permet de prédire la sensibilité à une thérapie ciblée anti-HER2 et sera développée ci-dessous.

III. HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)

HER2/neu, également nommé c-erbB2/neu, est un proto-oncogène localisé sur le bras long du chromosome 17 (17q12), codant une glycoprotéine transmembranaire à activité tyrosine-kinase de la famille des EGF (récepteur du facteur de croissance épidermique humain), nommée HER2 elle aussi. Elle est formée d'un domaine N-terminal extracellulaire permettant la fixation de ligand et d'un domaine C-terminal intracellulaire portant l'activité

tyrosine-kinase. A l'état basal, le récepteur HER2 est monomérique et est exprimé à la surface cellulaire.

Au sein de la famille HER (HER1 à 4), la fixation d'un ligand sur le domaine extracellulaire entraîne une hétérodimérisation du récepteur stimulant son activité tyrosine-kinase intracellulaire. Il s'en suit une auto-phosphorylation des résidus tyrosines permettant la transduction du signal aux voies de signalisation intracellulaires sous-jacentes (voies MAPK -Mitogen activated protein- et PI3K -Phosphatidylinositol 3 kinase-). Selon le ligand fixé, certaines protéines seront recrutées préférentiellement à d'autres et activeront l'une ou l'autre des deux voies.

HER2 ne possède pas de ligand spécifique. Son activation constitutionnelle se fait grâce aux autres récepteurs de la famille des EGF, par hétérodimérisation avec une affinité préférentielle pour HER3 (ne possédant pas de domaine tyrosine kinase) ou par homodimérisation permettant une auto-phosphorylation du domaine kinase intracellulaire au niveau du résidu tyrosine. Dans les carcinomes mammaires, HER2 peut être surexprimé à la surface cellulaire. Cette surexpression est le plus souvent due à une amplification génique (95% des cas) induisant une augmentation du nombre de copies et donc une surexpression détectable de la protéine HER2 par des techniques immunohistochimiques.

La détermination du statut d'amplification génique de HER2 est obligatoire pour tous carcinomes mammaires invasifs et constitue un prérequis essentiel à la décision thérapeutique (facteur prédictif de réponse aux thérapies ciblées anti-HER2). Elle représente 15 à 20% des cancers du sein invasifs. La présence d'une amplification du proto-oncogène HER2 est également un facteur prédictif de moins bonne réponse à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie du fait d'une chimiorésistance relative qui reste controversée à l'heure actuelle. Sa recherche suit les recommandations américaines élaborées par l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) et le CAP (College of American Pathologists) de 2013 actualisées en 2018 (référence ASCO/CAP). Elle est réalisée par techniques immunohistochimiques et/ou par hybridation *in situ*.

L'immunohistochimie (IHC) permet la détection de la surexpression protéique de HER2 sur coupes tissulaires fixées FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded), facilement réalisable en routine. La quantification se fait par la présence, au sein de la composante infiltrante, d'un marquage membranaire complet (en % de cellules tumorales marquées par rapport au

nombre de cellules carcinomateuses total) et par intensité de marquage (0+ à 3+) (Figures 4 et 5).

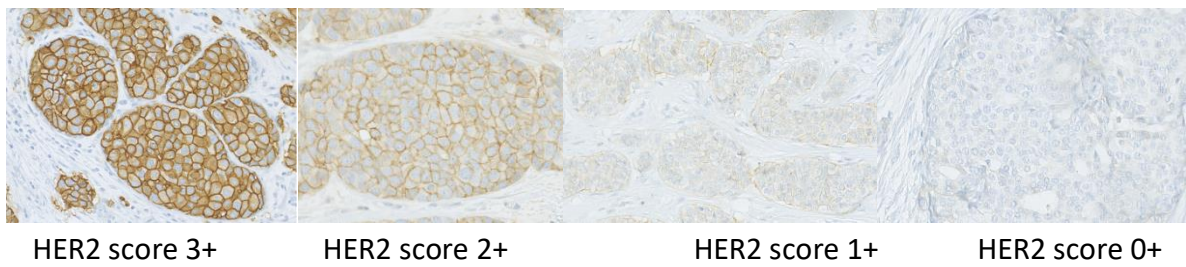


Figure 4. Exemples de marquages immunohistochimiques issus du recueil de patients (CGFL)

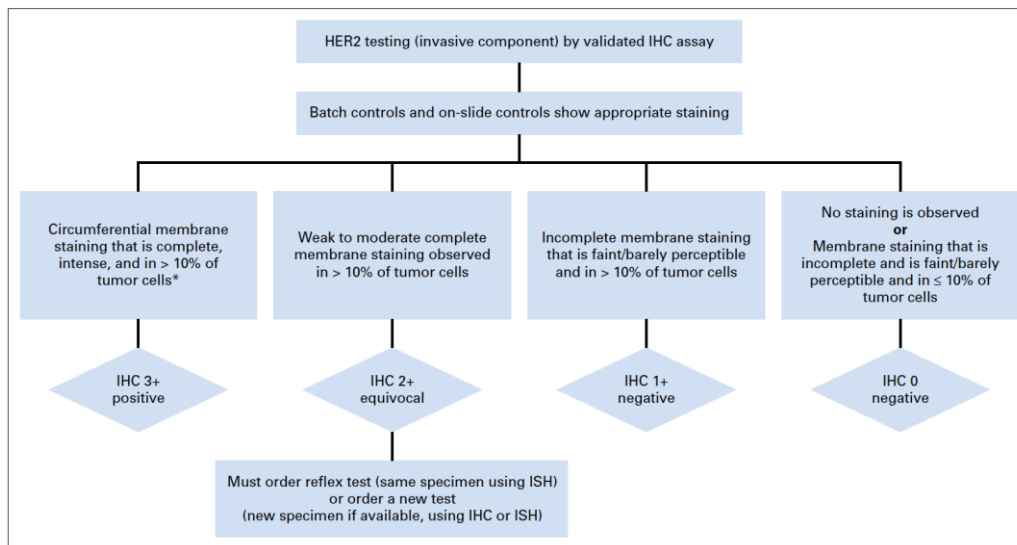


Figure 5. Algorithme d'évaluation de l'expression protéique de HER2 par immunohistochimie selon Wolff.

Figure issue de l'article de Wolff et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 testing in breast cancer. ASCO/CAP clinical practice guideline focused update. J Clin Oncol. 2018 Jul 10;36(20):2105-2122

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) permet la détection d'une amplification génique de HER2 via la localisation d'aberrations chromosomiques dans le noyau cellulaire. Elle peut s'effectuer sur coupes tissulaires ou congelées et nécessite une bonne maîtrise des phases pré-analytique et analytique (notamment de digestion tissulaire permettant de rendre accessible à la sonde le noyau et les acides nucléiques des cellules tumorales). Elle permet de quantifier, sur au minimum 40 noyaux tumoraux en métaphase ou en interphase (3), le nombre de copies du gène HER2 par rapport au nombre de copies du centromère du chromosome 17 (CEP17) grâce à l'aide de deux sondes fluorescentes spécifiques distinctes (Figures 6 et 7). Cette technique permet, dans la majorité des cas, de différencier les vraies amplifications des polysomies du chromosome 17, les seules exceptions étant la présence de gains ou amplifications de la région centromérique du chromosome 17. Malgré l'utilisation de l'IHC en 1ère intention, la FISH est considérée comme le Gold Standard.

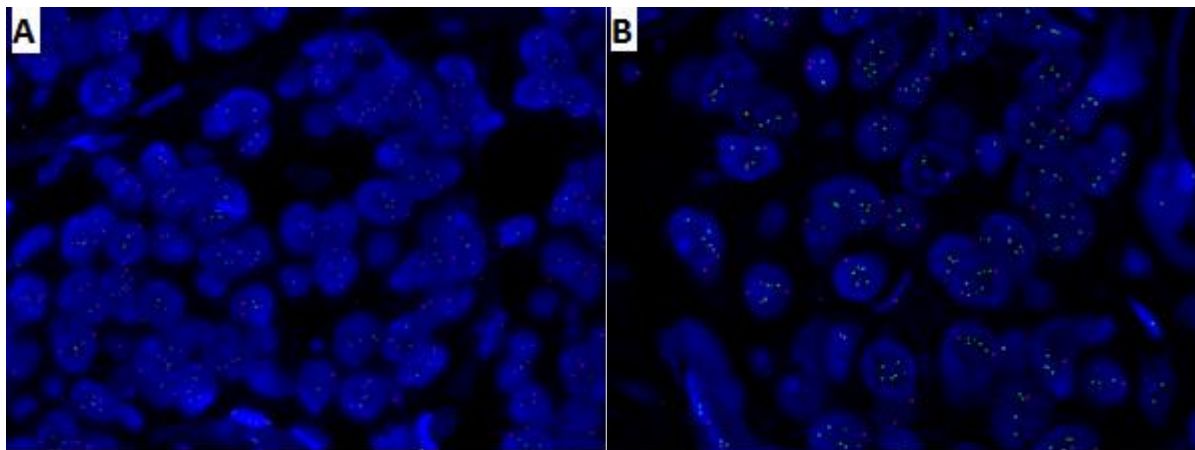


Figure 6. Exemples d'images de FISH HER2 issus du recueil de patients (CGFL), sans amplification (A) et avec amplification (B)

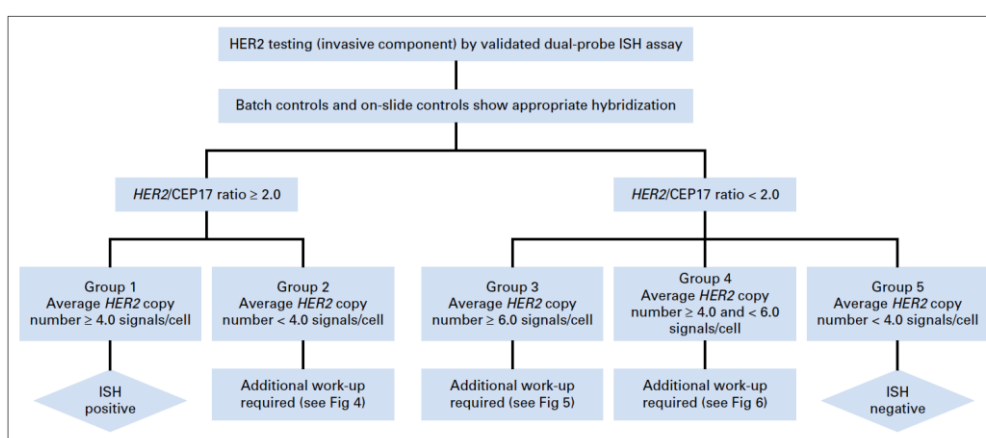


Figure 7. Algorithme d'évaluation de l'expression protéique de HER2 par hybridation *in situ* selon Wolff.

Figure issue de l'article de Wolff et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 testing in breast cancer. ASCO/CAP clinical practice guideline focused update. J Clin Oncol. 2018 Jul 10;36(20):2105-2122

Au total, l'amplification d'HER2 est définie en cas de marquage IHC 3+ ou 2+ avec amplification en hybridation *in situ*. Ces seuls carcinomes peuvent actuellement bénéficier de thérapies ciblées anti-HER2 en routine.

IV. Principales voies moléculaires de signalisation intracellulaire dans le cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie hétérogène d'un point de vue moléculaire, comportant des expressions géniques variées qui influencent son comportement et son pronostic. Une classification intrinsèque des principales signatures moléculaires sur un panel de 50 gènes (PAM50) est actuellement utilisée et comprend 5 groupes :

- Luminal A : RH+, HER2- et Ki67 faible
- Luminal B : RH+, HER2+/- et Ki67 variable

- HER2 enrichi : RH-, HER2+
- « Basal-like » : RH-, HER2-
- « Normal breast-like »

HER2 conditionne trois voies de signalisation moléculaires principales : PI3K-AKT, MAPK et JAK-STAT (Figure 8).

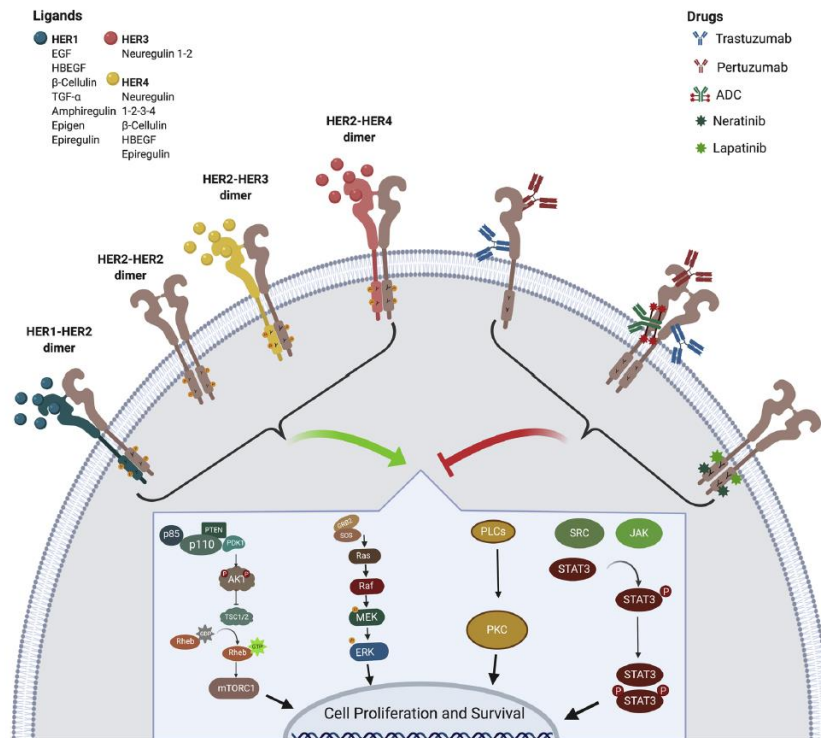


Figure 8. Activation des trois principales voies moléculaires en aval de HER2 et thérapies ciblées anti-HER2 selon Marchio.

Figure issue de l'article de Marchio et al. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Seminars in Cancer Biology*. 2021 Jul;72:123–35

Voie moléculaire PI3K-AKT

La voie de signalisation PI3K-AKT est une des principales voies activées dans la carcinogénèse mammaire (70% des cancers du sein) et permet la régulation du cycle cellulaire en interagissant sur de multiples fonctions cellulaires (métabolisme cellulaire, stimulation de la prolifération tumorale, inhibition de l'apoptose). Elle est composée de deux protéines clés : PI3K et AKT. Elle peut être altérée via différents mécanismes dont les altérations génétiques suivantes sont les plus fréquemment rapportées : mutations activatrices de PIK3CA et/ou de AKT1, mutations perte de fonction de PTEN et amplification de HER2.

PI3K est une protéine lipide-kinase hétérodimérique formant une famille divisée en trois grandes classes (I à III) selon leur structure, leur mécanisme d'action et leur fonction. La

classe IA est la plus étudiée et est constituée d'une sous-unité régulatrice p85 (p85 α , p85 β , p55 α , p50 α et p55 γ) et d'une sous-unité catalytique p110 (p110 α , p110 β et p110 δ). La dimérisation d'HER2 en surface de la cellule entraîne le recrutement d'une PI3K de classe IA à la membrane plasmique et active la sous-unité régulatrice p85 α (via une liaison directe à ses résidus tyrosines) qui modifie alors sa conformation tridimensionnelle pour phosphoryler PIP2 (phosphatidylinositol 4,5 diphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate). PIP3 fournit alors un site de fixation à la protéine AKT qui est à son tour phosphorylée et activée. Le gène PIK3CA code la sous-unité catalytique p110 α de PI3K et présente une mutation survenant tôt dans la carcinogénèse dans 20 à 40% des cancers du sein invasifs (4,5). Ces mutations somatiques surviennent classiquement au sein de trois « hotspots », situés dans les exons 9 (codant le domaine hélicoïdal avec E542K et E545K) et 20 (codant le domaine catalytique avec H1047R).

Une revue de la littérature a permis de mettre en avant les caractéristiques pronostiques de ces mutations qui présentent une tendance des carcinomes PIK3CA mutés à être majoritairement :

- De phénotype RH positif (6–16) et HER2 négatif (9,13,14,16,17),
- De grade histopronostique SBR modifié par Elston et Ellis faible (9,18–20),
- De survenue à un âge avancé (9),
- De petite taille (14,20),
- D'index de prolifération Ki67 bas (17,20),
- De meilleure survie (9,21) associée à un délai entre la tumeur primitive et l'apparition de métastase allongé, majorée en cas de mutations sur l'exon 9 (22).

L'ensemble de ces données contribue à la notion de facteur protecteur des mutations du gène PIK3CA, apparaissant comme un facteur pronostique favorable, confirmé par de nombreuses méta-analyses (20,23–25).

Toutefois, d'autres études montrent des résultats contradictoires et lient les mutations PIK3CA à un mauvais pronostic (8,26–29). On retrouve dans ces séries des associations significatives avec des facteurs d'agressivité tels qu'un grade SBR modifié par Elston et Ellis élevé (28), un index Ki67 fort (28), un statut N+ (6,28), la présence d'embolies vasculaires néoplasiques (28) et une taille tumorale augmentée (8,19,28), présentant la mutation PIK3CA cette fois-ci comme un facteur de progression. D'autres études mettent en évidence une relation entre les mutations PIK3CA et la surexpression de HER2 (6,10,28,30) ou l'absence d'association significative (4,7,8,22). Les données concernant la survie sont également

variables entre les équipes avec des résultats montrant des survies sans récurrence significativement moins longues en cas de mutation (8,28).

D'autres auteurs ne retrouvent pas de lien significatif entre la présence d'une mutation PIK3CA et le pronostic (4,7,10,12,22), notamment avec la taille tumorale (6), le statut ganglionnaire (8), le grade histologique, l'âge (8) ou encore la survie sans récurrence et globale (6) et ne considère pas la présence de la mutation comme un facteur pronostique indépendant valable.

AKT est une protéine sérine/thréonine kinase qui, activée par PIP3, va permettre le déclenchement d'une cascade protéique impliquée dans le recrutement membranaire et la progression tumorale (activation de la sérine/thréonine kinase mTOR, de la protéine pro-apoptotique Bad, de la protéine kinase GSK3 β ...). AKT va être transloqué en intra-nucléaire pour phosphoryler les substrats en aval. Il existe trois isoformes de la protéine AKT (AKT1, 2 et 3) intervenant souvent de façon collégiale. L'isoforme principale est AKT1, connue pour être plus spécifiquement impliquée dans la prolifération cellulaire (via le recrutement de protéines du cycle cellulaires telles que p21, p27 et cyclineD1), la diminution de l'apoptose (via p53) et pour son rôle anti-métastatique par régulation des mécanismes de migration cellulaire (via TSC2, palladin, EMT-protein...) (31). Elle intervient majoritairement dans le cancer du sein et possède deux sites de phosphorylation nécessaires à son activation : la sérine 473 (Ser473) et la thréonine 308 (Thr308). Cette activation peut se faire par recrutement via la phosphorylation PIP3, par mutation E17K du gène AKT (événement rare : 1 à 4% des cancers du sein) ou par mutation perte de fonction du gène suppresseur de tumeur PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome ten).

Les mutations AKT1 étant rare et souvent associée aux mutations PIK3CA et PTEN (facteurs de confusion), cela affecte la significativité pronostique de la plupart des résultats des études s'y étant intéressé. Malgré tout, d'après les données existantes, les mutations AKT1 seraient associées à un moins bon pronostic (26,31) avec une survie globale et sans récurrence plus courte que les carcinomes non mutés AKT1 (32) ; résultat non retrouvé par d'autres études (33,34). Cette valeur pronostique péjorative serait en partie justifiée par des index de prolifération Ki67 élevés et par une résistance à l'hormonothérapie, aux thérapies ciblées et à la chimiothérapie (26,33,34). Toutefois, elles semblent de façon contradictoire être associées à un statut hormonal positif (9,10,34), facteur habituellement de bon pronostic.

Il n'a pas été mis en évidence de lien statistique significatif pour l'âge, la taille tumorale et le statut ganglionnaire.

L'activation de la voie PI3K-AKT est inhibée par la protéine PTEN qui présente une activité lipide-phosphatase capable d'hydrolyser PIP3 en PIP2 et donc d'agir comme rétrocontrôle négatif. Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur situé sur le bras long du chromosome 10 (10q23.3), codant la protéine PTEN dont le rôle dans la stabilité du génome a largement été démontré. Les pertes de fonction par mutations somatiques, délétions ou hyperméthylations de son promoteur induisent son inactivation (inhibition de son rôle suppresseur de tumeur) conduisant à une accumulation du substrat PIP3 et une activation des composants en aval de la voie PI3K-AKT. Les données de la littérature concernant leur prévalence sont très variables, allant de 4 à 63% des carcinomes infiltrants. Elles induisent une stimulation du développement tumoral ainsi qu'un comportement plus agressif avec un envahissement ganglionnaire fréquent (35–37). Le rôle de la perte de PTEN sur la survie reste controversé avec des survies sans récurrence et globale diminuées (36) ou non significatives (35). Toutefois, peu d'études ont étudié cette voie de signalisation et les altérations de PTEN en fonction du taux d'amplification HER2.

Analyse transcriptomique de la voie PI3K-AKT

La présence de mutations sur la voie PI3K-AKT (mutations PIK3CA, mutations AKT1, mutations PTEN) est décrite dans la littérature comme activatrice au niveau transcriptomique (observée par séquençage de l'ARN) (10,19). Plus un carcinome présenterait de mutations au sein de cette voie moléculaire, plus il l'activerait. L'activation de la voie PI3K-AKT secondairement à une mutation PIK3CA serait liée à une moins bonne survie globale du fait de l'apparition d'une résistance aux thérapies ciblées anti-HER2 (38). De plus, ces mutations sont également retrouvées dans les carcinomes RH- et HER2 non amplifiés ce qui signifie qu'elles activent la voie PI3K-AKT de façon indépendante des statuts hormonaux et d'amplification de HER2 (4). Cependant, d'autres études ne retrouvent pas de corrélation entre la présence d'une mutation PIK3CA et l'expression ARNm de la voie PI3K-AKT (39).

Le séquençage de l'ARN permet de quantifier l'expression protéique afin de voir si la présence d'une mutation est réellement exprimée dans le transcriptome de la cellule par la suite. En effet, l'expression d'un gène au niveau transcriptomique ne sous-entend pas obligatoirement la présence d'une mutation associée et inversement, une mutation n'est pas

obligatoirement exprimée au niveau protéique et donc sans impact au niveau cellulaire, ce qui représente une complexité biologique supplémentaire. Par exemple, les niveaux d'expression d'ARN liés à PTEN, AKT1 et mTOR ne sont pas corrélés à la présence des mutations correspondantes dans la série de Kolodziej et al. (40) mais dépendent principalement du statut d'amplification HER2 et du grade histo-pronostique SBR modifié par Elston et Ellis. De plus, un même phénotype peut résulter de la présence de mutations différentes activant la même voie biologique ce qui permettrait de classer différentes tumeurs et mutations au sein d'une même catégorie du fait d'une expression génique similaire et sensible aux mêmes thérapeutiques (41).

Enjeu thérapeutique

L'activation de la voie de signalisation PI3K-AKT a été décrite comme conduisant à une résistance secondaire à la chimiothérapie, à l'hormonothérapie (26,34,42) et aux thérapies ciblées anti-HER2 (43–45). Cette voie constitue une cible attractive pour le développement de traitements inhibiteurs spécifiques à chaque étape, seuls ou en association : anti-PI3K ou PI3K inhibiteurs, mTOR inhibiteurs, AKT inhibiteurs, inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinases... (46) qui devraient participer à rétablir la sensibilité des cellules tumorales à ces traitements et ainsi améliorer le pronostic de ces carcinomes (27). Cela fait actuellement l'objet de nombreux essais cliniques en cours (Figure 9). En effet, l'étude BELLE-2 montre une amélioration de l'efficacité du traitement associant un inhibiteur pan-PI3K (Buparlisib) et le Fulvestrant (anti-oestrogénique) par rapport au Fulvestrant seul. Par ailleurs, les inhibiteurs sélectifs anti-p110 α de PI3K semblent montrer une certaine efficacité en cas de mutation H1047R (étude SOLAR-1 : qui a étudié deux groupes de patients Fulvestrant + placebo et Fulvestrant + alpelisib et a montré que la survie était plus élevée en cas de mutations PIK3CA traitée par Fulvestrant + alpelisib, validant ainsi la mutation PIK3CA comme biomarqueur de thérapies ciblées) et l'association d'un inhibiteur sélectif de mTOR (Everolimus) avec l'Exémestane (inhibiteur non stéroïdien de l'aromatase) chez des patients métastatiques RE+ HER2- semble améliorer de façon significative la survie sans progression (essai BOLERO-2). Plus récemment, l'utilisation d'un pan-PI3K (inhibiteurs des 4 isoformes de la classe I des PI3K (α à δ)) augmenterait la survie sans récurrence (47,48) et la prescription d'anti- α PI3K, spécifiques de l'isoforme α (alpelisib, tasisib) (49) ou d'inhibiteurs AKT (pan ou anti-AKT1) pourrait également être intéressante dans le but de restaurer la sensibilité à l'hormonothérapie. Dans la revue de la littérature menée par Mollon et al. (48), il est mis en évidence une amélioration du pronostic des

carcinomes mutés PIK3CA en termes de survie sans progression en cas d'association thérapeutique comportant une hormonothérapie et un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant PI3K. D'ailleurs, la survie sans progression, initialement meilleure chez les patientes non mutés PIK3CA, devient de nouveau supérieure chez les patientes PIK3CA mutées qui ont ce double traitement par rapport aux patientes sans mutation. Les études vont dans le même sens pour les carcinomes HER2+ qui présentent des mutations sur cette voie en cas d'association d'une thérapie ciblée anti-HER2 à un traitement inhibiteur de la voie.

De ce fait, la détection de mutations actionnables de PIK3CA et/ou AKT1 (traitements existants ou éligibilité à des essais cliniques) par séquençage de l'ADN prend de plus en plus d'importance chez des patients en échappement avec évolution métastatique malgré un traitement de première ligne bien mené. Cela permet à la fois d'expliquer les évolutions et progressions métastatiques sur le plan moléculaire et de rechercher des pistes en seconde ou troisième ligne thérapeutique chez ces patients au stade avancé afin de personnaliser le monitoring thérapeutique (16,41).

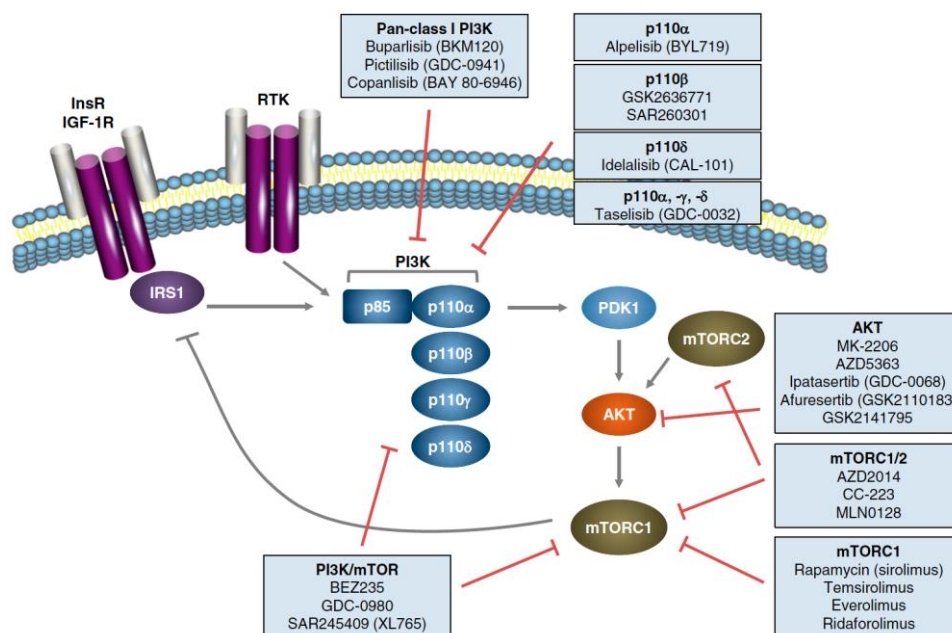


Figure 9. Ciblage de la voie de signalisation PI3K avec des traitements inhibiteurs selon Lorusso.

Figure issue de l'article de Lorusso et al. Inhibition of the PI3K AKT mTOR Pathway in Solid Tumors JCO. 2016 Nov 1;34(31):3803–15

Voie moléculaire MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases)

La voie de signalisation intracellulaire des MAPK est fréquemment altérée dans la carcinogénèse mammaire et est impliquée dans la transduction du signal de la prolifération

cellulaire et l'apoptose. La séquence de transduction du signal est activée par la fixation d'un ligand et utilise une cascade de kinases. La cascade amplifie le signal à chaque nouvelle kinase activée et est constituée de trois protéines analogues : MAPKKK, MAPKK et MAPK (MAP kinase kinase, MAP kinase kinase et MAP kinase). L'activation de la voie se fait obligatoirement par double phosphorylation sur des sites proches du site catalytique : MAPKKK phosphoryle MAPKK sur deux résidus sérines et MAPKK phosphoryle MAPK sur un résidu thréonine et un résidu tyrosine. L'effet biologique fonctionne comme un interrupteur on/off. Un signal insuffisant pour phosphoryler les deux sites n'est pas transduit, ayant pour conséquence l'arrêt complet du mécanisme intracellulaire. Il existe trois cascades moléculaires principales au sein de cette voie :

- La première implique Raf-1 puis MEK-1 et 2 et ERK-1 et 2 et constitue la voie la plus fréquente dans le cancer du sein. Le récepteur de surface peut s'autophosphoryler et changer de conformation tridimensionnelle ce qui active les kinases d'aval : SH2, SH3, PTB... L'ensemble aboutit à l'activation de Raf et de son isoforme Raf-1, qui phosphoryle MEK-1 et 2 ce qui stimule leur activité kinase à leur tour. MEK ainsi activé peut phosphoryler ERK-1 et 2 sur des résidus thréonine et tyrosine. Cependant, AKT est capable d'inhiber Raf-1 par phosphorylation, agissant comme rétrocontrôle négatif.
- La seconde concerne la voie JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase).
- La troisième intéresse la voie des p38 MAP kinase.

Ces deux dernières voies sont marginales dans le cancer du sein et ne seront pas développées. L'ensemble peut être activé par les œstrogènes notamment dans les carcinomes RH+ qui stimulent la prolifération cellulaire via des facteurs de croissance ($TGF\alpha$, IGF-1) qui augmentent le taux de MAP kinases par voie génomique ou via d'autres facteurs et processus cellulaires qui activent de façon indirecte les MAP kinases (voie non génomique). Cette voie peut également être activée par l'hyperexpression de HER2 qui induit une augmentation d'expression de Ras et MAPK (50).

Dans le cancer du sein, l'activation de cette voie est impliquée dans les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie (51). De la même manière que pour la voie PI3K-AKT, des traitements sont actuellement en cours d'investigations afin d'inhiber la voie en visant une restauration de l'efficacité des traitements. La modulation de l'activité de MKP-1 (régulateur négatif naturel des MAPK) semble être une option (52).

Voie moléculaire JAK-STAT (Janus kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription)

La voie JAK-STAT est une voie de signalisation intracellulaire dont les principaux rôles sont la survie cellulaire, la prolifération et la migration. C'est une voie indépendante de la voie PI3K-AKT, sans influence des mutations PIK3CA et AKT1. Les anti-tyrosine kinases sont également à l'étude pour viser cette voie (53).

V. Carcinomes mammaires HER2-low (incluant les HER2 2+ en IHC avec FISH : ratio HER2/CEP17 < 2 et nombre de copies HER2 entre 4 et 6 ; groupe 4 selon l'ASCO/CAP 2018)

Les carcinomes mammaires classés HER2 2+ en IHC avec une FISH négative après double lecture, groupe 4 selon l'ASCO/CAP et anciennement appelées « HER2 borderline », posent un véritable problème de prise en charge clinique et thérapeutique. Ils sont appelés double-équivoques et représentent une entité rare pour laquelle peu de données cliniques, histo-pathologiques et pronostiques sont disponibles. Cette catégorie n'a pas fait l'objet de preuves cliniques assez robustes quant au bénéfice à recevoir un traitement anti-HER2 (54,55), entraînant la fin du traitement systématique par Trastuzumab.

De plus, ces tumeurs font désormais parti de la catégorie émergente HER2-low, incluant les carcinomes HER2 1+ et 2+ non amplifiés, s'opposant ainsi aux tumeurs HER2-positives (2+ amplifiées et 3+) et HER2-négatives (0+) (Figures 10 et 11). Ce groupe constitue une nouvelle cible d'intérêt dans les essais cliniques et représente 45 à 55% de l'ensemble des carcinomes mammaires. Il est défini par une expression faible supra-physiologique de HER2, notamment par le biais d'autres voies pharmacologiques que l'amplification génique (56), et pourrait bénéficier de nouveaux traitements combinés contenant une thérapie ciblée anti-HER2 en cours d'investigations cliniques.

Immunohistochimie	Hybridation <i>in situ</i>		GEFPICS 2014	ASCO/CAP 2018	GEFPICS 2021
	Nombre moyen de copies de HER2 par noyaux	Ratio HER2 / CEP17			
Score 0			Statut HER2 négatif	Statut HER2 négatif	Statut HER2 négatif (score 0)
Score 1+			Statut HER2 négatif	Statut HER2 négatif	Statut HER2 négatif [†] (score 1+)
Score 2+	< 4	< 2	Statut HER2 négatif	Statut HER2 négatif	Statut HER2 négatif [†] (score 2+ non amplifié)
	≥ 4 et < 6	≥ 2	Statut HER2 positif	Statut HER2 positif	Statut HER2 positif (score 2+ amplifié)
	≥ 6		Statut HER2 positif	Statut HER2 positif	Statut HER2 positif (score 2+ amplifié)
Score 3+			Statut HER2 positif	Statut HER2 positif	Statut HER2 positif (score 3+)

[†] La dénomination « Statut HER2 faible » dans cette situation est optionnelle et n'est pas formellement recommandée en l'absence d'AMM dans cette indication à l'heure actuelle.

Figure 10. Évolution des définitions et dénominations du statut HER2 depuis 2014 selon le GEFPICS 2021.

Figure issue de l'article du groupe d'étude des facteurs pronostiques immunohistochimiques dans le cancer du sein (GEFPICS) Mise à jour 2021 des recommandations du GEFPICS pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers infiltrants du sein en France. Annales de Pathologie. 2021 Nov;41(6):507–20

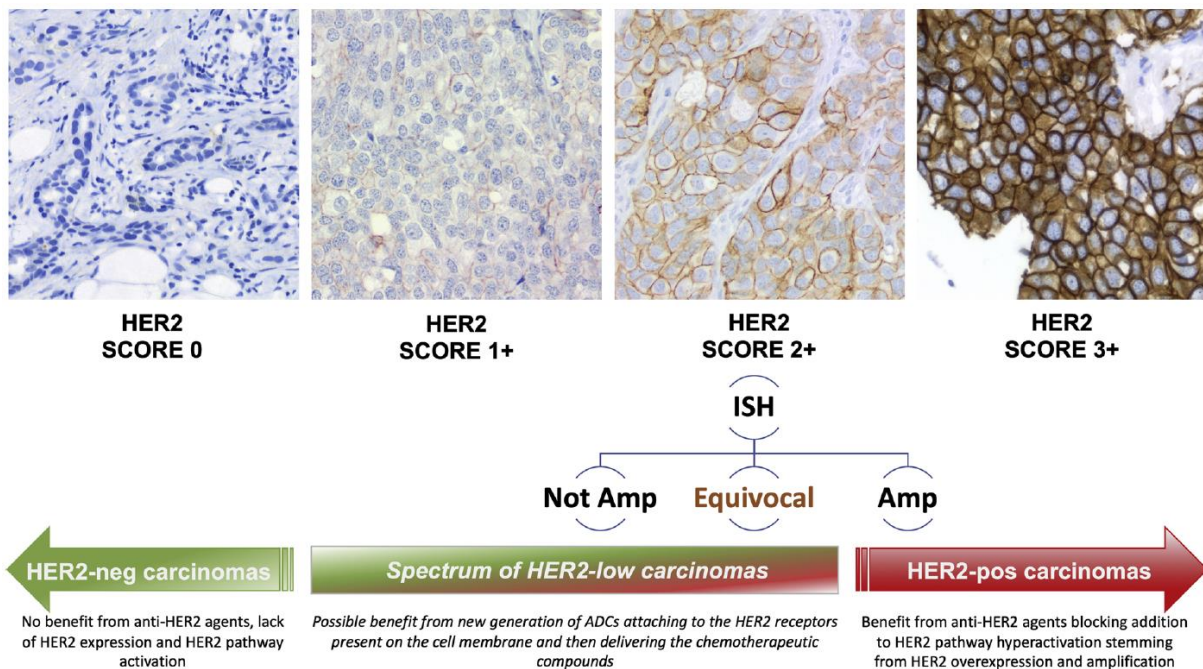


Figure 11. Évolution de paradigme dans la définition du statut HER2 dans le cancer du sein selon Marchio.

Figure issue de l'article de Marchio et al. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. Seminars in Cancer Biology. 2021 Jul;72:123–35

Caractéristiques clinico-biologiques, histo-pronostiques et moléculaires des HER2-low

Un nombre croissant d'études s'intéresse désormais aux cancers HER2-low et des tendances semblent se dessiner.

Agostinnetto et al. (57) a réalisé une étude observationnelle et rétrospective sur une cohorte de 410 carcinomes HER2-low, représentant 51% des tumeurs recensées dans le TCGA (The Cancer Genome Atlas), au sein desquels il a été retrouvé 336 statuts RH+ (soit 82%). Les

cancers HER2-low semblent donc être majoritairement RH+ (56,58–62) et présentent donc des chiffres de survie en accord avec ce statut (survie sans progression à 5 ans d'environ 82,6%). En effet, il existe une différence significative entre les HER2-low RH+ et RH- en termes de survie sans progression ($p=0.0066$) et sans récurrence ($p=0.01$), meilleures en cas de statut RH+ ce qui est en faveur d'une hétérogénéité tumorale au sein de la catégorie HER2-low (57). Plus récemment, Li et al. (63), qui a retrouvé une proportion majoritaire de RH+ au sein de ces tumeurs HER2-low par rapport aux HER2 0+ (77.8% vs 69.2%, $p<0.001$), a décrit une différence de survie globale entre les HER2-low et HER2 0+ ($p=0.0004$), y compris en cas de statut RH+ (54.9 mois vs 48.1 mois, $p=0.011$) (Figure 12). Denkert et al. (64) retrouve un résultat similaire en combinant quatre études cliniques néoadjuvantes prospectives mettant en évidence de meilleures survie globale et survie sans rechute à 3 ans chez les cancers HER2-low que chez les tumeurs HER2 0+ (respectivement, $p=0.00016$ et $p=0.0084$). Schettini et al. et Tarantino et al. (58,59) n'ont pas retrouvé de différence de survie entre les cancers HER2-low RH+ et RH-. Toutefois, Eiger et al. et Marchio et al. (60,62) sont en faveur d'une moins bonne survie des carcinomes HER2-low par rapport aux cancers HER2 0+. Rossi et al. (61) retrouve également un pronostic initialement meilleur des carcinomes HER2 2+ non amplifiés par rapport aux carcinomes HER2 amplifiés qui diminue et devient plus mauvais après 4 à 5 ans du fait de l'efficacité du Trastuzumab pour les carcinomes HER2 amplifiés.

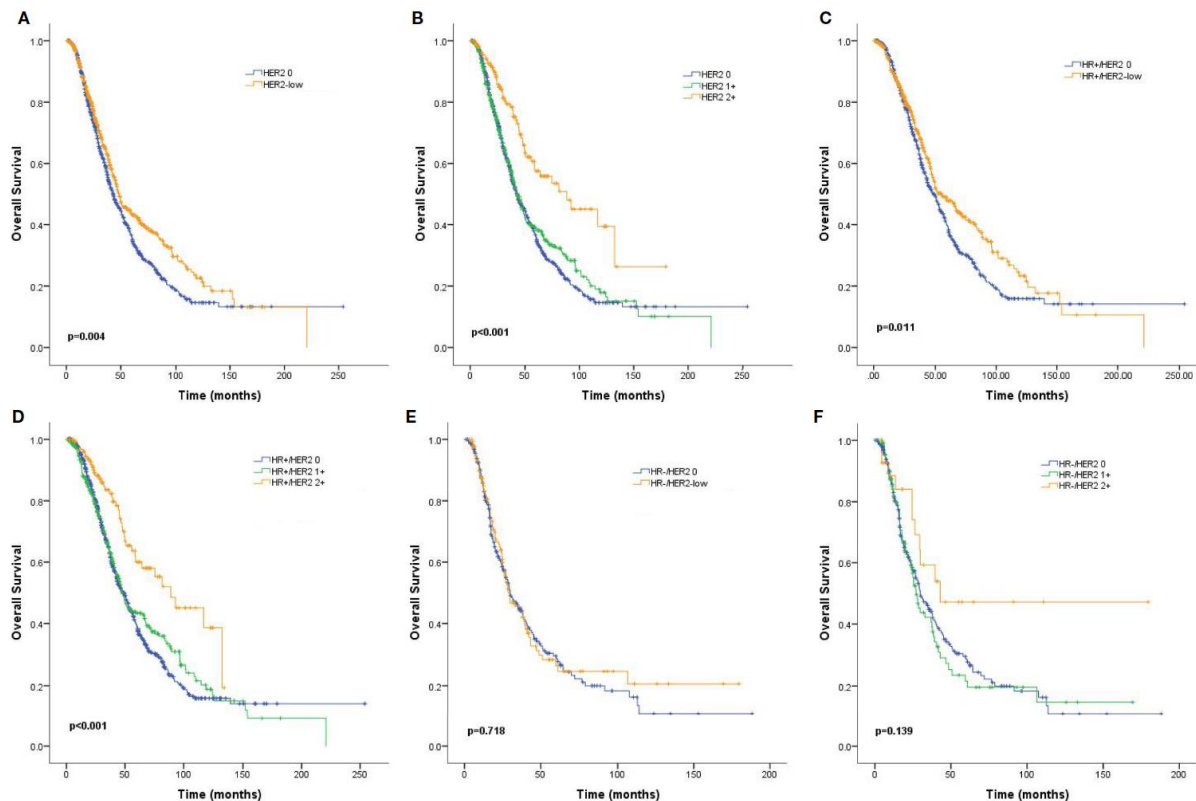


Figure 12. Courbes de Kaplan-Meier sur la survie globale (Overall Survival OS) par statut hormonal (hormone receptor HR) et statut HER2 par IHC.

OS entre HER2-low et HER2-négatifs dans l'ensemble de la cohorte (A), dans la population RH+ (C) et dans la population RH- (E).

OS entre HER2 2+, HER2 1+ et HER2 0+ dans l'ensemble de la cohorte (B), dans la population RH+ (D) et dans la population RH- (F) selon Li.

Figure issue de l'article de Li et al. In Real Life, Low-Level HER2 Expression May Be Associated With Better Outcome in HER2-Negative Breast Cancer: A Study of the National Cancer Center, China *Front Oncol.* 2022 Jan 17;11:774577

Eiger et al. (60) a effectué une revue de la littérature permettant de mettre en lumière l'hétérogénéité du groupe HER2-low. Par rapport aux carcinomes HER2 0+, les carcinomes HER2-low présenteraient une taille tumorale plus grande, un grade histo-pronostique SBR modifié par Elston et Ellis plus élevé ainsi qu'un index de prolifération par le Ki67 plus haut. De même, la survenue de métastase ganglionnaire serait plus fréquente au sein des cancers HER2-low. Schettini et al. (59) est en accord avec certaines de ces données, notamment la taille plus importante ($p=0.007$) et le statut ganglionnaire positif ($p=0.010$) mais n'a pas mis en évidence de lien statistique significatif avec le grade histo-pronostique, l'index de prolifération Ki67, le taux de TILs ou encore le statut ménopausal. De la même manière, d'autres études rétrospectives n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les tumeurs HER2 0+ et HER2-low en ce qui concerne l'index Ki67 (58,63) et les TILs (64). Rossi et al. (61) retrouve, dans une étude comparant les carcinomes non amplifiés HER2 0+ et 1+ d'un

côté et 2+ avec FISH négative de l'autre, une taille plus grande, un grade SBR plus élevé, un Ki67 plus élevé et un statut ganglionnaire positif plus fréquent au sein des cancers HER2 2+ non amplifiés. Au contraire, Denkert et al. (64) a retrouvé un index Ki67 plus fort dans les tumeurs HER2 0+ qu'HER2-low.

De façon générale, l'ensemble de ces résultats est en faveur d'un comportement intermédiaire des carcinomes HER2-low, moins agressifs que les HER2-positifs mais qui semble intrinsèquement lié au statut hormonal.

Ces études se sont également intéressées à l'analyse des profils moléculaires de cette catégorie. Le niveau d'expression en ARNm de *ERBB2* apparaît significativement plus élevé dans les tumeurs HER2-low que dans les HER2 0+, avec des taux croissants entre les 1+ et les 2+ (59,62). Cela peut faire évoquer une meilleure réponse aux nouveaux traitements des HER2-low 2+ du fait de la nécessité d'avoir un certain degré d'expression de HER2 pour l'ancrage du traitement à la surface cellulaire. De plus, le taux d'expression *ERBB2* des HER2-low est également plus élevé en cas de statut RH positif (59). L'étude de la signature moléculaire PAM50 a été réalisée sur les cancers HER2-low et a retrouvé un profil variable selon le statut RH : plutôt luminal A (représentant 50-60% des HER2-low) ou B (25-30%) en cas de RH+ et plutôt basal-like (13-18%) en cas de RH- (57,59) (Figure 13). Plus précisément, Schettini et al. (59) a mis en évidence une distribution différentielle de certains gènes entre les HER2-low et les HER2-négatifs avec une sur-régulation significative des gènes luminaux associée à une sous-régulation des gènes de prolifération basal-like des tumeurs HER2-low comparativement aux tumeurs HER2-négatives. Cette différence se maintenait dans les tumeurs RH+. Au contraire, Agostinetto et al. (57) a retrouvé une différence significative entre les cancers HER2-low et HER2-négatifs RH- alors que le résultat était non significatif dans le sous-groupe RH+, en faveur d'une biologie similaire entre les tumeurs HER2-low RH+ et HER2-négatifs RH+. Plus récemment, Zhang et al. (65) a utilisé deux tests moléculaires différents : MammaPrint (comprenant 70 gènes marqueurs de risque de récidence) et BluePrint (comprenant 80 gènes de profilage moléculaire) et a retrouvé un profil moléculaire similaire avec une majorité de tumeurs HER2-low luminales A (65.5%), puis luminales B (28.8%), basal-like (4.6%) et HER2-enrichi (1.1%), sans résultat significatif après ajustement sur le statut hormonal.

L'hétérogénéité de résultats entre les carcinomes HER2-low RH + et RH – au niveau de l'expression en ARNm *ERBB2* et des signatures PAM50 souligne le probable rôle clé et

l'importance de préciser le statut RH au sein de cette nouvelle catégorie, et peut faire penser que ces nouveaux traitements seraient plus efficaces sur les carcinomes HER2-low RH+. Certaines études parlent de définir le statut HER2 de façon plus reproductible par séquençage de l'ARN (56,66) ou par PCR, afin de mieux corréliser l'expression ARNm de HER2 à l'amplification du gène. Cela ne semble toutefois pas encore d'actualité.

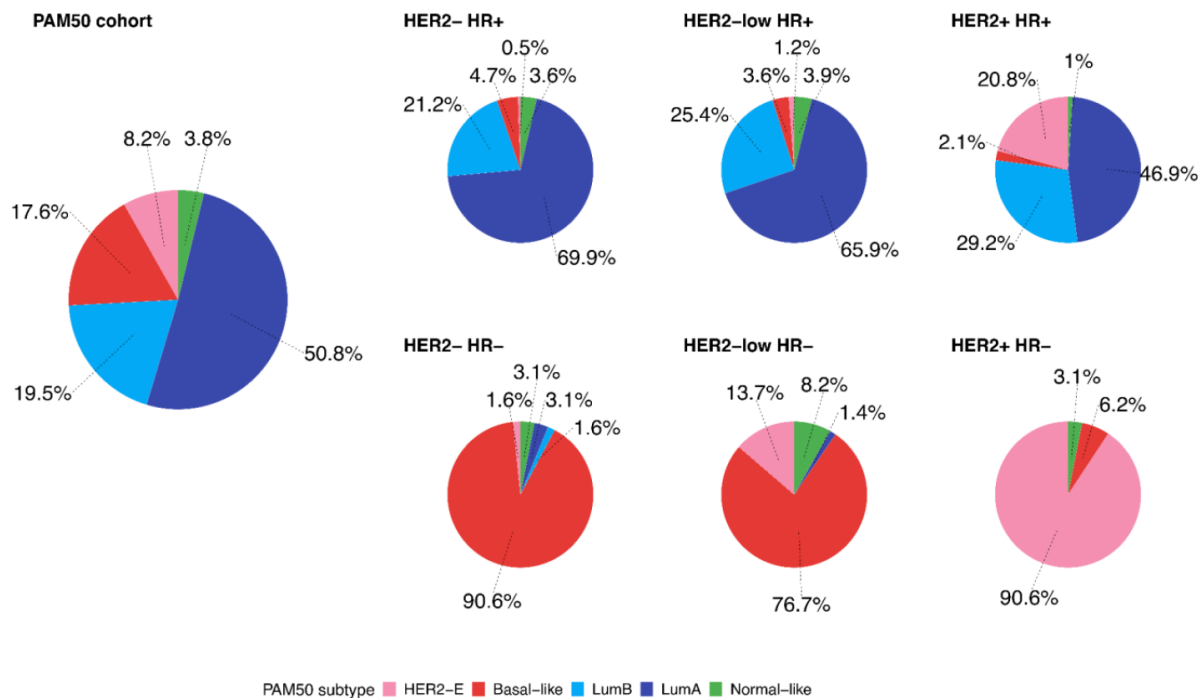


Figure 13. Distribution des sous-types intrinsèques PAM50 dans l'ensemble de la cohorte et parmi chaque sous-type de cancer du sein dont les HER2-low RH+ et RH- selon Agostinnetto. Figure issue de l'article de Agostinnetto et al. HER2-Low Breast Cancer: Molecular Characteristics and Prognosis Cancers. 2021 Jun 5;13(11):2824

Par conséquent, à la lumière de cette catégorie émergente et du démembrement constant des profils moléculaires du cancer du sein, la détermination du statut HER2 par IHC (évaluation du taux d'expression protéique de HER) et FISH (détermination du statut du gène HER2) de façon binaire amplifié/non amplifié recommandée par les référentiels internationaux semble insuffisante pour guider le choix thérapeutique. Les études princeps sur le Trastuzumab (notamment NSABP B-47) (67) ont échoué à mettre en évidence un bénéfice clinique à le recevoir dans les cancers HER2-low (à noter que cette étude n'a pas inclus de carcinomes double-équivoques dans sa cohorte). De ce fait, malgré une expression faible de HER2, ces carcinomes sont actuellement traités comme des carcinomes HER2 négatifs malgré leur grande hétérogénéité moléculaire. Depuis quelques années, de nouvelles thérapeutiques ont émergés et semblent être prometteuses dans les cancers HER2-low au

stade avancé, progressant après une première ligne thérapeutique bien menée (Figure 14). Il s'agit notamment des anticorps conjugués (ADCs – Antibody-Drug Conjugated) :

- Le Trastuzumab-Deruxtecan (T-DXd ; DS-8201) a déjà fait ses preuves sur les carcinomes HER2 amplifiés au stade métastatique. Il s'agit d'un anticorps conjugué anti-HER2 associé à un inhibiteur de topoisomérase I. Il a été décrit dans l'étude princeps de Modi et al. (68) sur 54 HER2-low métastatiques (dont 87% de RH+) une efficacité de 37% du traitement avec une durée moyenne de réponse de 10.4 mois, que ce soit dans des carcinomes HER2 1+ ou 2+, ayant déjà ou non reçu un agent anti-HER2. Ce résultat semble majoré en cas de statut RH+ (taux de réponse de 40.4% vs 14.3%). Devant ces résultats prometteurs, deux essais cliniques randomisés de phase III sont en cours afin de vérifier la sécurité et l'efficacité dans cette nouvelle indication.
- Le Trastuzumab-Duocarmazine (SYD-985) est un anticorps monoclonal où le Trastuzumab est lié de façon covalente à une drogue contenant de la duocarmycine, avec un rapport drogue/anticorps de 2.8/1. On observe une réponse partielle de 28% et 40% chez les HER2-low RH+ et RH- respectivement (69).
- D'autres, comme les PF-06804103, MEDI4276, et XMT-1522 ont également montré des résultats encourageants.

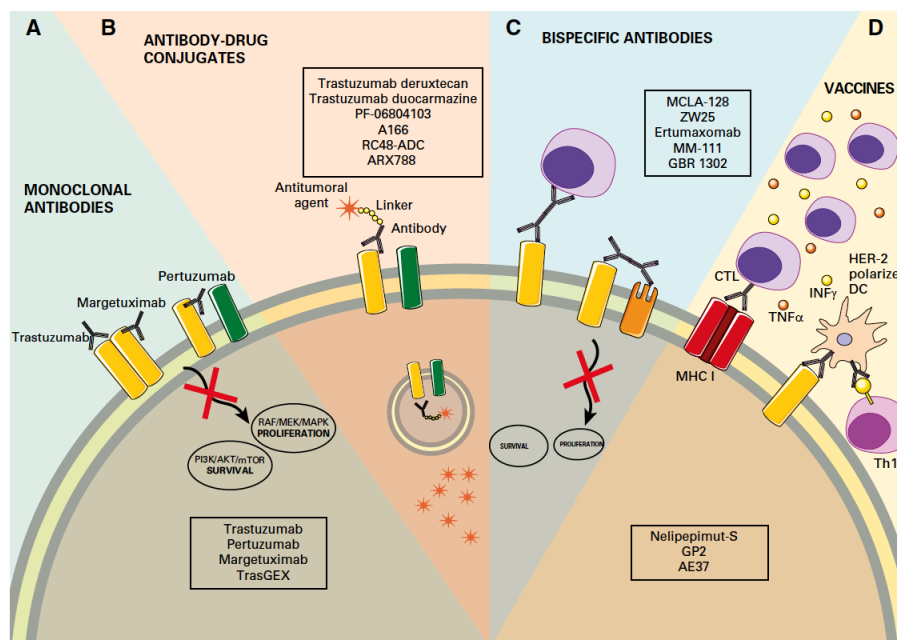


Figure 14. Nouveaux agents et mécanismes permettant de cibler le cancer du sein à faible expression de HER2 (HER2-low) selon Tarantino.

Figure issue de l'article de Tarantino HER2-Low Breast Cancer Pathological and Clinical Landscape JCO. 2020 Jun 10;38(17):1951–62

Caractéristiques clinico-biologiques, histo-pronostiques et moléculaires du groupe 4 double-équivoque selon l'ASCO/CAP

Une revue de la littérature a permis de mettre en évidence certaines caractéristiques des carcinomes double équivoque (groupe 4) :

- Statut RH+ majoritaire (55,70–73),
- Taille tumorale augmentée par rapport aux classes non amplifiées (30,74),
- Sous-type histologique non spécifique NST (NOS, anciennement canalaire) majoritaire suivi par le sous-type micro-papillaire (55,73),
- Grade histo-pronostique SBR modifié par Elston et Ellis plus élevé que pour les carcinomes non amplifiés (30,55), non significatif (73) ou plus faible que pour les carcinomes amplifiés (55,75),
- Index de prolifération Ki67 intermédiaire entre les carcinomes non amplifiés et amplifiés (71,74),
- Présence de nécrose tumorale moins fréquente que dans les carcinomes amplifiés (55),
- Statut ganglionnaire N+ discordants : plus fréquent que dans les carcinomes non amplifiés (30,55,73), moins fréquent que dans les carcinomes amplifiés (75), non significatif (74) ou plus fréquent que dans les carcinomes amplifiés (55),
- Présence d'embolies vasculaires néoplasiques intermédiaire entre les carcinomes non amplifiés et amplifiés (30,75),
- Survie discordante : absence de différence significative (71,73,74,76), survie globale diminuée par rapport aux carcinomes non amplifiés (30) ou survie sans récurrence et survie globale diminuées par rapport aux carcinomes amplifiés ($p=0.019$ et $p=0.031$ respectivement (55)).

La plupart des articles mettent donc en évidence un profil intermédiaire des carcinomes du groupe 4, semblant tendre vers un profil similaire aux tumeurs non amplifiées d'un point de vue clinico-biologique et pronostique.

D'un point de vue moléculaire, il n'existe pas d'étude ayant fait l'objet d'un focus particulier sur ce groupe. La seule étude ayant approché le sujet est celle menée par Tong et al en 2018 où il est mis en évidence un taux d'expression mRNA HER2 proche entre le groupe 4 et les carcinomes non amplifiés alors qu'il est plus élevé au sein des tumeurs amplifiées.

VI. Objectifs du travail de thèse

Objectif principal

A la lumière des thérapeutiques émergentes intéressant les carcinomes HER2-low (1+ 2+ non amplifiés dont le groupe 4), l'objectif principal de cette étude a été d'analyser cette catégorie par rapport aux carcinomes HER2-négatifs (0+ non amplifiés) et HER2-positifs (2+ amplifiés et 3+), d'un point de vue clinico-biologique, histo-pronostique, moléculaire et transcriptomique. Les profils mutationnels seront analysés par séquençage haut débit de l'ADN et l'activation des principales voies de signalisation PI3K-AKT, MAPK et JAK-STAT par séquençage de l'ARN.

Objectif secondaire

L'objectif secondaire de ce travail de thèse a été de comparer les carcinomes mammaires du groupe 4 (double-équivoque) aux carcinomes non amplifiés d'une part (HER2 0+ 1+ et 2+ en IHC non amplifié en FISH) et amplifiés d'autre part (HER2 2+ en IHC amplifié en FISH et 3+) sur les mêmes données que ci-dessus.

REFERENCES DE L'INTRODUCTION GENERALE

1. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic Factors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:13.
2. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015 Feb;26(2):259–71.
3. Franchet C, Djerroudi L, Maran-Gonzalez A, Abramovici O, Antoine M, Becette V, et al. Mise à jour 2021 des recommandations du GEFPICS pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers infiltrants du sein en France. *Ann Pathol.* 2021 Nov;41(6):507–20.
4. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 2004 Aug;3(8):772–5.
5. Samuels Y. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science.* 2004 Apr 23;304(5670):554–554.
6. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 2005 Apr 1;65(7):2554–9.
7. Boyault S, Drouet Y, Navarro C, Bachelot T, Lasset C, Treilleux I, et al. Mutational characterization of individual breast tumors: TP53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Feb;132(1):29–39.
8. Li SY, Rong M, Grieu F, Iacopetta B. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Mar;96(1):91–5.
9. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009 Aug 15;15(16):5049–59.
10. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo W-L, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 2008 Aug 1;68(15):6084–91.
11. Bosch A, Li Z, Bergamaschi A, Ellis H, Toska E, Prat A, et al. PI3K inhibition results in enhanced estrogen receptor function and dependence in hormone receptor-positive breast cancer. *Sci Transl Med.* 2015 Apr 15;7(283):283ra51-283ra51.
12. Zardavas D, te Marvelde L, Milne RL, Fumagalli D, Fountzilas G, Kotoula V, et al. Tumor PIK3CA Genotype and Prognosis in Early-Stage Breast Cancer: A Pooled Analysis of Individual Patient Data. *J Clin Oncol.* 2018 Apr 1;36(10):981–90.
13. Martínez-Sáez O, Chic N, Pascual T, Adamo B, Vidal M, González-Farré B, et al. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2020 Dec;22(1):45.

14. Pérez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjöld B, Rutqvist LE, et al. PIK3CA Mutations and PTEN Loss Correlate with Similar Prognostic Factors and Are Not Mutually Exclusive in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Jun 15;13(12):3577–84.
15. Pang B, Cheng S, Sun S-P, An C, Liu Z-Y, Feng X, et al. Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2015 May;4(1):6255.
16. Muller KE, Marotti JD, de Abreu FB, Peterson JD, Miller TW, Chamberlin MD, et al. Targeted next-generation sequencing detects a high frequency of potentially actionable mutations in metastatic breast cancers. *Exp Mol Pathol*. 2016 Jun;100(3):421–5.
17. Cuorvo LV, Verderio P, Ciniselli CM, Girlando S, Decarli N, Leonardi E, et al. PI3KCA mutation status is of limited prognostic relevance in ER-positive breast cancer patients treated with hormone therapy. *Virchows Arch*. 2014 Jan;464(1):85–93.
18. Roy-Chowdhuri S, de Melo Gagliato D, Routbort MJ, Patel KP, Singh RR, Broaddus R, et al. Multigene Clinical Mutational Profiling of Breast Carcinoma Using Next-Generation Sequencing. *Am J Clin Pathol*. 2015 Nov 1;144(5):713–21.
19. Tserga A, Chatziandreou I, Michalopoulos NV, Patsouris E, Saetta AA. Mutation of genes of the PI3K/AKT pathway in breast cancer supports their potential importance as biomarker for breast cancer aggressiveness. *Virchows Arch*. 2016 Jul;469(1):35–43.
20. Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer Targets Ther*. 2015 May;111.
21. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, Cotrupi S, Barassi F, Del Grammastro M, et al. Different Prognostic Roles of Mutations in the Helical and Kinase Domains of the *PIK3CA* Gene in Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2007 Oct 15;13(20):6064–9.
22. Dupont Jensen J, Laenkholm A-V, Knoop A, Ewertz M, Bandaru R, Liu W, et al. *PIK3CA* Mutations May Be Discordant between Primary and Corresponding Metastatic Disease in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Feb 15;17(4):667–77.
23. Anderson EJ, Mollon LE, Dean JL, Warholak TL, Aizer A, Platt EA, et al. A Systematic Review of the Prevalence and Diagnostic Workup of PIK3CA Mutations in HR+/HER2– Metastatic Breast Cancer. *Int J Breast Cancer*. 2020 Jun 20;2020:1–16.
24. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu I-I, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 26;22(1):173.
25. Yang SX, Polley E, Lipkowitz S. New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2016 Apr;45:87–96.
26. Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, Oki E, Kataoka A, Ohno S, et al. Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer Tokyo Jpn*. 2006;13(2):137–44.

27. Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, Tran Dien A, Garberis I, Droin N, et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2020 Mar;31(3):377–86.
28. Aleskandarany MA, Rakha EA, Ahmed MAH, Powe DG, Paish EC, Macmillan RD, et al. PIK3CA expression in invasive breast cancer: a biomarker of poor prognosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jul;122(1):45–53.
29. Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, et al. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2005 Oct;7(5):R609.
30. Woo JW, Lee K, Chung YR, Jang MH, Ahn S, Park SY. The updated 2018 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline on human epidermal growth factor receptor 2 interpretation in breast cancer: comparison with previous guidelines and clinical significance of the proposed in situ hybridization groups. *Hum Pathol*. 2020 Apr;98:10–21.
31. Hinz N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal*. 2019 Dec;17(1):154.
32. Spears M, Cunningham CA, Taylor KJ, Mallon EA, Thomas JSJ, Kerr GR, et al. Proximity ligation assays for isoform-specific Akt activation in breast cancer identify activated Akt1 as a driver of progression. *J Pathol*. 2012;227(4):481–9.
33. Andre F, Nahta R, Conforti R, Boulet T, Aziz M, Yuan LXH, et al. Expression patterns and predictive value of phosphorylated AKT in early-stage breast cancer. *Ann Oncol*. 2008 Feb;19(2):315–20.
34. Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, et al. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol*. 2005;207(2):139–46.
35. Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2001 Jul;14(7):672–6.
36. Li S, Shen Y, Wang M, Yang J, Lv M, Li P, et al. Loss of PTEN expression in breast cancer: association with clinicopathological characteristics and prognosis. *Oncotarget*. 2017 May 9;8(19):32043–54.
37. Bose S, Crane A, Hibshoosh H, Mansukhani M, Sandweis L, Parsons R. Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. *Hum Pathol*. 2002 Apr;33(4):405–9.
38. Jensen JD, Knoop A, Laenkholm AV, Grauslund M, Jensen MB, Santoni-Rugiu E, et al. PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol*. 2012 Aug;23(8):2034–42.
39. Palimaru I, Brüggmann A, Wium-Andersen MK, Nexø E, Sørensen BS. Expression of PIK3CA, PTEN mRNA and PIK3CA mutations in primary breast cancer: association with lymph node metastases. *SpringerPlus*. 2013;2(1):464.

40. Kołodziej P, Nicoś M, Krawczyk PA, Bogucki J, Karczmarczyk A, Zalewski D, et al. The Correlation of Mutations and Expressions of Genes within the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Breast Cancer—A Preliminary Study. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 19;22(4):2061.
41. Desmedt C, Voet T, Sotiriou C, Campbell PJ. Next-generation sequencing in breast cancer: first take home messages. *Curr Opin Oncol*. 2012 Nov;24(6):597–604.
42. Araki K, Miyoshi Y. Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2018 Jul;25(4):392–401.
43. McAuliffe PF, Meric-Bernstam F, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Deciphering the Role of PI3K/Akt/mTOR Pathway in Breast Cancer Biology and Pathogenesis. *Clin Breast Cancer*. 2010 Nov;10:S59–65.
44. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A Functional Genetic Approach Identifies the PI3K Pathway as a Major Determinant of Trastuzumab Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2007 Oct;12(4):395–402.
45. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K Status. *Am J Pathol*. 2010 Oct;177(4):1647–56.
46. Gonzalez-Angulo AM, Blumenschein GR. Defining biomarkers to predict sensitivity to PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2013 Jun;39(4):313–20.
47. Ellis H, Ma CX. PI3K Inhibitors in Breast Cancer Therapy. *Curr Oncol Rep*. 2019 Dec 11;21(12):110.
48. Mollon LE, Anderson EJ, Dean JL, Warholak TL, Aizer A, Platt EA, et al. A Systematic Literature Review of the Prognostic and Predictive Value of PIK3CA Mutations in HR+/HER2– Metastatic Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2020 Jun;20(3):e232–43.
49. Litton JK, Burstein HJ, Turner NC. Molecular Testing in Breast Cancer. :7.
50. Santen RJ, Song RX, McPherson R, Kumar R, Adam L, Jeng M-H, et al. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002 Feb;80(2):239–56.
51. Richard V, Davey MG, Annuk H, Miller N, Dwyer RM, Lowery A, et al. MicroRNAs in Molecular Classification and Pathogenesis of Breast Tumors. *Cancers*. 2021 Oct 23;13(21):5332.
52. Haagenson KK, Wu GS. The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*. 2010 Mar;29(1):143–9.
53. Butti R, Das S, Gunasekaran VP, Yadav AS, Kumar D, Kundu GC. Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: signaling, therapeutic implications and challenges. *Mol Cancer*. 2018 Dec;17(1):34.

54. Arnould L, Arveux P, Couturier J, Gelly-Marty M, Loustalot C, Ettore F, et al. Pathologic Complete Response to Trastuzumab-Based Neoadjuvant Therapy Is Related to the Level of HER-2 Amplification. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 1;13(21):6404–9.
55. Wang C, Tsang JY, Poon IK, Shao Y, Li JJ, Shea K-H, et al. An Evaluation of Clinicopathological Correlation and Outcome of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Subgroups Reclassified According to the Latest ASCO/CAP Guideline. *Clin Breast Cancer*. 2021 May 17;S1526-8209(21)00133-6.
56. Tarantino P, Hamilton E, Tolaney SM, Cortes J, Morganti S, Ferraro E, et al. HER2-Low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. *J Clin Oncol*. 2020 Jun 10;38(17):1951–62.
57. Agostinetti E, Rediti M, Fimereli D, Debien V, Piccart M, Aftimos P, et al. HER2-Low Breast Cancer: Molecular Characteristics and Prognosis. *Cancers*. 2021 Jun 5;13(11):2824.
58. Tarantino P, Gandini S, Nicolò E, Trillo P, Giugliano F, Zagami P, et al. Evolution of low HER2 expression between early and advanced-stage breast cancer. *Eur J Cancer*. 2022 Mar;163:35–43.
59. Schettini F, Chic N, Brasó-Maristany F, Paré L, Pascual T, Conte B, et al. Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low breast cancer. *Npj Breast Cancer*. 2021 Dec;7(1):1.
60. Eiger D, Agostinetti E, Saúde-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-Low Breast Cancer Treatment. *Cancers*. 2021 Mar 1;13(5):1015.
61. Rossi V, Sarotto I, Maggiorotto F, Berchiolla P, Kubatzki F, Tomasi N, et al. Moderate Immunohistochemical Expression of HER-2 (2 ϵ) Without HER-2 Gene Amplification Is a Negative Prognostic Factor in Early Breast Cancer. :8.
62. Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Semin Cancer Biol*. 2021 Jul;72:123–35.
63. Li Y, Abudureheiyimu N, Mo H, Guan X, Lin S, Wang Z, et al. In Real Life, Low-Level HER2 Expression May Be Associated With Better Outcome in HER2-Negative Breast Cancer: A Study of the National Cancer Center, China. *Front Oncol*. 2022 Jan 17;11:774577.
64. Denkert C, Seither F, Schneeweiss A, Link T, Blohmer J-U, Just M, et al. Clinical and molecular characteristics of HER2-low-positive breast cancer: pooled analysis of individual patient data from four prospective, neoadjuvant clinical trials. *Lancet Oncol*. 2021 Aug;22(8):1151–61.
65. Zhang H, Katerji H, Turner BM, Audeh W, Hicks DG. HER2-low breast cancers: incidence, HER2 staining patterns, clinicopathologic features, MammaPrint and BluePrint genomic profiles. *Mod Pathol [Internet]*. 2022 Feb 19 [cited 2022 Mar 5]; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41379-022-01019-5>
66. Dekker TJA. HER2-Targeted Therapies in HER2-Low-Expressing Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2020 Oct 1;38(28):3350–1.

67. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong J-H, Sledge G, Geyer CE, et al. Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer: Planned Joint Analysis of Overall Survival From NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol*. 2014 Nov 20;32(33):3744–52.
68. Modi S, Park H, Murthy RK, Iwata H, Tamura K, Tsurutani J, et al. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Low–Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study. *J Clin Oncol*. 2020 Jun 10;38(17):1887–96.
69. Banerji U, van Herpen CML, Saura C, Thistlethwaite F, Lord S, Moreno V, et al. Trastuzumab duocarmazine in locally advanced and metastatic solid tumours and HER2-expressing breast cancer: a phase 1 dose-escalation and dose-expansion study. *Lancet Oncol*. 2019 Aug;20(8):1124–35.
70. Sneige N, Hess KR, Multani AS, Gong Y, Ibrahim NK. Prognostic significance of equivocal human epidermal growth factor receptor 2 results and clinical utility of alternative chromosome 17 genes in patients with invasive breast cancer: A cohort study: Equivocal HER2 Results in Breast Cancer. *Cancer*. 2017 Apr 1;123(7):1115–23.
71. Tong Y, Chen X, Fei X, Lin L, Wu J, Huang O, et al. Can breast cancer patients with HER2 dual-equivocal tumours be managed as HER2-negative disease? *Eur J Cancer*. 2018 Jan;89:9–18.
72. Marchiò C, Dell’Orto P, Annaratone L, Geyer FC, Venesio T, Berrino E, et al. The Dilemma of HER2 Double-equivocal Breast Carcinomas: Genomic Profiling and Implications for Treatment. *Am J Surg Pathol*. 2018 Sep;42(9):1190–200.
73. Hoda RS, Brogi E, Xu J, Ventura K, Ross DS, Dang C, et al. Impact of the 2018 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Updates on HER2 Assessment in Breast Cancer With Equivocal HER2 Immunohistochemistry Results With Focus on Cases With HER2/CEP17 Ratio ≤ 2.0 and Average HER2 Copy Number ≥ 4.0 and ≥ 6.0 . *Arch Pathol Lab Med*. 2020 May 1;144(5):597–601.
74. Xu B, Shen J, Guo W, Zhao W, Zhuang Y, Wang L. Impact of the 2018 ASCO/CAP HER2 guidelines update for HER2 testing by FISH in breast cancer. *Pathol - Res Pract*. 2019 Feb;215(2):251–5.
75. Bethune GC, Zanten DV van, MacIntosh RF, Rayson D, Younis T, Thompson K, et al. Impact of the 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) testing of invasive breast carcinoma: a focus on tumours assessed as ‘equivocal’ for HER2 gene amplification by fluorescence in-situ hybridization. *Histopathology*. 2015;67(6):880–7.
76. Gupta S, Neumeister V, McGuire J, Song YS, Acs B, Ho K, et al. Quantitative assessments and clinical outcomes in HER2 equivocal 2018 ASCO/CAP ISH group 4 breast cancer. *Npj Breast Cancer*. 2019 Dec;5(1):28.

ARTICLE

HER2-low breast cancers: comparative clinico-pathological and molecular analysis of this new entity

Céline André (1), Aurélie Bertaut (2), Sylvain Ladoire (3,4,5), Isabelle Desmoulins (3), Clémentine Jankowski (6), Françoise Beltjens (1), Céline Charon-Barra (1), Anthony Bergeron (1), Corentin Richard (7), Romain Boidot (7) and Laurent Arnould (1,4).

(1) Unit of Pathology, Department of Biology and Pathology of the Tumors, Centre Georges-François Leclerc, 1 rue du Professeur Marion, 21000 Dijon, France

(2) Unit of Methodology and Biostatistics, Centre Georges-François Leclerc, 1 rue du Professeur Marion, 21000 Dijon, France

(3) Department of Medical Oncology, Centre Georges-François Leclerc, 1 rue du Professeur Marion, 21000 Dijon, France

(4) INSERM U1231, 21000 Dijon, France

(5) University of Burgundy-Franche Comté, 21000 Dijon, France

(6) Department of Surgery, Centre Georges-François Leclerc, 1 rue du Professeur Marion, 21000 Dijon, France

(7) Unit of Molecular Pathology, Department of Biology and Pathology of the Tumors, Centre Georges-François Leclerc, 1 rue du Professeur Marion, 21000 Dijon, France.

Address for correspondence: Céline André, Unit of Pathology, Department of Biology and Pathology of the Tumors, Centre Georges-François Leclerc, 1 rue du Professeur Marion, 21000 Dijon, France, Email: candre@cgfl.fr

ABSTRACT

Introduction: The dichotomous classification of HER2 status in breast cancer is changing with the discovery of new antibody-drug conjugates ADCs (Trastuzumab-Deruxtecan; Trastuzumab-Duocarmazine) and the introduction of the new HER2-low category. In this present study, our objective was to compare this category with HER2-negative and HER2-positive tumors on clinico-pathological, genomic and transcriptomic grounds.

Methods: We identified 62 HER2-low carcinomas, matched on hormonal receptor positive status to 20 HER2-negative carcinomas (0+) and 43 HER2-positive carcinomas (20 2+ weakly-amplified and 23 3+). Clinicopathological features were compared. DNA (including PIK3CA and AKT1 mutations) and RNA (PI3K-AKT, MAPK and JAK-STAT intracellular signaling pathways activation) sequencing was performed. The relationship between HER2 overexpression/amplification level and mutational and transcriptomic status was analyzed.

Results: Compared to HER2-positive carcinomas, HER2-low carcinomas have a lower histoprognostic grade ($p=0.0034$) with lower mitotic score ($p=0.0179$), mitotic index ($p=0.048$) and Ki67 proliferation index ($p=0.0001$). No difference between HER2-low and HER2-negative cancers is found. They present a PIK3CA mutation rate close to HER2-negative carcinomas and significantly higher than for HER2-positive patients ($p=0.0079$). The result was the opposite for TP53 mutations ($p=0.0006$). On the transcriptomic level, the analysis of the complete transcriptome and the three main intracellular signaling pathways could not be performed for HER2 2+ unamplified cancers. An intermediate profile of HER2-low carcinomas was found, but related to the presence of two different contingents. On one hand, the double-equivocal tumors those present a transcriptomic profile similar to that of weakly-amplified HER2 2+ tumors with a common gene expression. On the other hand, HER2 1+ tumors present a heterogeneous profile. HER2-positive tumors show a specific gene expression profile. Overall, HER2-low carcinomas appear heterogeneous, in favor of a different biology of the groups constituting them. These differences in global expression between the pathways seem to be related to the presence of mutations, in particular PIK3CA, having a significant influence on the activation of the biological pathways, despite the absence of HER2 amplification. Indeed, HER2-negative and HER2-low tumors have a high rate of PIK3CA mutations leading to a higher activation of the involved signaling pathway, than HER2-positive tumors.

Conclusions: We found that HER2-low carcinomas have more clinicopathological, molecular and transcriptomic similarities with HER2-negative carcinomas. Furthermore, PIK3CA mutations are more prevalent in non-amplified carcinomas and show strong activation of the underlying PI3K-AKT signaling pathway, implying that the presence of a mutation allows for influence of transcriptomic expression in the absence of HER2 overexpression/ amplification. This may help explain a part of the differences in efficacy of conventional and emerging anti-HER2 therapies such as Trastuzumab-Deruxtecan and Trastuzumab-Duocarmazine.

INTRODUCTION

In 2022, breast cancer is still the most common malignancy in women with an incidence of about 2 million new cases, making it the 4th leading cause of cancer-related death worldwide for women. Therapeutic approaches have undergone a significant revolution during the last decades leading to new therapies that improved the outcome of patients, including Trastuzumab, an targeted anti-HER2 therapy, which was first described for metastatic settings (1), then in adjuvant (2,3) and in neo-adjuvant settings (4). Approximately 15-20% of primary invasive breast cancers show HER2 (Human Epithelial Growth Factor Receptor-2) overexpression and/or amplification, which is a transmembrane glycoprotein with tyrosine-kinase activity encoded by *ERBB2* gene located on the long arm of chromosome 17 (17q12), and are eligible for this drug. The therapeutic arsenal was then intensified with the arrival of new treatments: Lapatinib (tyrosine kinase inhibitor), Pertuzumab (humanized monoclonal antibody), TDM1 (antibody-drug conjugates ADCs) ... Today, parts of these new treatments are based on predictive biomarkers of response to targeted therapies, and it is therefore essential to research the molecular alterations and oncogenic mechanisms of breast cancers in order to personalize the choice of targeted cancer therapy.

Determination of HER2 status is central to therapeutic management and requires a standardized interpretation. It is performed by immunohistochemistry (IHC, protein expression level) in 1st intention, completed by *in situ* hybridization (ISH, gene status assessment) in second intention in case of 2+ staining on IHC, according to the ASCO (American Society of Clinical Oncology)/CAP (College of American Pathologists) 2013 guidelines updated in 2018 (5–7). These new recommendations introduce 5 ISH groups that emphasize concomitant interpretation of both techniques: group 1 (HER2/chromosome enumeration probe 17 CEP17 ratio ≥ 2 + HER2 signal per cell ≥ 4 = amplified), group 2 (HER2/CEP17 ratio ≥ 2 + HER2 signal per cell < 4), group 3 (HER2/CEP17 ratio < 2 + HER2 signal per cell ≥ 6 = amplified), group 4 (HER2/CEP17 ratio < 2 + HER2 signal per cell ≥ 4 and < 6), and group 5 (HER2/CEP17 < 2 + HER2 signal per cell < 4 = nonamplified). Groups 2 and 4 are "non-classical" and require a second blinded reading by another confirmed pathologist with confirmation of the HER2 2+ staining on the IHC slide. If the same result persists, group 4 (formerly double-equivocal) is concluded as "negative with concomitant IHC data" without being eligible for anti-HER2 therapy, which has not demonstrated sufficient clinical benefit since the 2018 update. Of note, the amplification level of HER2 may be related to pathologic complete

response (pCR) in the neoadjuvant setting (including HER2/CEP17 ratio, in case of Trastuzumab treatment or double blocking with Trastuzumab-Pertuzumab (8,9)) with a low rate of pCR in weakly-amplified cancers.

Recently, HER2-low category has emerged, defined by a tumor with an IHC assay score of 1+ or 2+ but with negative ISH assay (including ASCO/CAP group 4), and represents 45-55% of breast carcinomas. In clinical practice, these tumors are defined as HER2-negative, although the majority of them express some degree of HER2 on the cell membrane surface as detected by IHC without benefit of a traditional HER2-targeted agent. New antibody-drug conjugates (ADCs) are currently emerging that may be effective in these cancers but are not yet routinely prescribed. Trastuzumab-Deruxtecan (T-DXd, DS8201a) (10) is an anti-HER2 conjugated antibody linked to a topoisomerase I inhibitor and showed promising results in the Modi's study with an objective response rate (ORR) of 37% and a mean duration of response of 10.4 months in a cohort of 54 HER2-low metastatic patients including 87% hormonal receptors + (HR+). Similarly, Trastuzumab-Duocarmazine (SYD-985; anti-HER2 conjugated antibody combined with duocarmycine) (11) has interesting therapeutic response rates in HER2-low. Two large randomized phase III trials are underway to confirm these encouraging results. So, there is growing interest in characterizing this new entity and all breast tumors according to different levels of HER2 expression.

In this study, we aim to detail clinicopathological, molecular and transcriptomic profile of HER2-low invasive primary breast cancers by comparing them to HER2-negative (i.e., 0+) and HER2-positive (i.e., 3+ and 2+ amplified) breast cancers. We want to see if differences exist between these different levels of HER2 expression/amplification that could explain differences in treatment efficacy, for an adapted therapeutic management. Similarly, we will analyze, as a secondary objective, the same data for ASCO/CAP group 4, formerly double-equivocal, because of the scarcity of available data, especially molecular.

METHODS

Study design and samples

Do to their low frequency, we started by including all primary breast invasive carcinomas who met ASCO/CAP Group 4 criteria (IHC 2+ and ISH HER2/CEP17 ratio < 2 + HER2 signal per cell ≥ 4 and < 6), i.e. $n=22$, diagnosed between January 2018 and December 2020, at the Georges-François Leclerc Cancer Center (CGFL, Dijon, France), on surgical specimen. All were HR+ (estrogen receptor ER and progesterone receptor PR), received hormonal therapy and have not received anti-HER2 targeted therapy. These tumors will be named HER2 2+ DE (= double-equivocal) in this paper. We then drew 20 carcinomas 1+ in IHC and 20 carcinomas 2+ in IHC with no FISH amplification (called HER2 2+ NA = non-amplified), for a total of 62 HER2-low carcinomas. Exclusion criteria included lobular histologic subtype, absence of invasive contingent (exclusive presence of *in situ* carcinoma), post-treatment recurrence and patients who underwent neoadjuvant therapy without prior available biopsy.

Study controls were chosen in 2 groups according to HER2 amplification status: HER2 IHC negative (0+) and HER2-positive (HER2 2+ in IHC with weakly-amplified FISH: copy number between 6 and 10 whatever the ratio; HER2 3+ in IHC and ISH: HER2 copy number > 10). They were secondarily randomized in the same CGFL database for comparison, between January 2007 and December 2020, matched on HR+ status to avoid any bias, having received hormonal therapy, invasive, on surgical specimen ($n=54$) or biopsy ($n=9$, all HER2 3+ neoadjuvant specimens). All amplified controls received anti-HER2 targeted therapy. The exclusion criteria were the same including HR- status. A total of 20 HER2 0+ and 2+ carcinomas with weakly-amplified FISH (called HER2 2+ WA = weakly-amplified) and 23 HER2 3+ carcinomas were included, representing 63 controls. The flowchart of this selection is summarized in Figure 1.

For the 125 carcinomas included (cases and controls), demographic and clinical data were collected retrospectively from the computerized medical records, including ultrasound scan reports with tumor size (T, multifocality) and lymph node status (N) according to the latest TNM stage defined by the American Joint Committee on Cancer Staging classification (AJCC, 8th edition) (12).

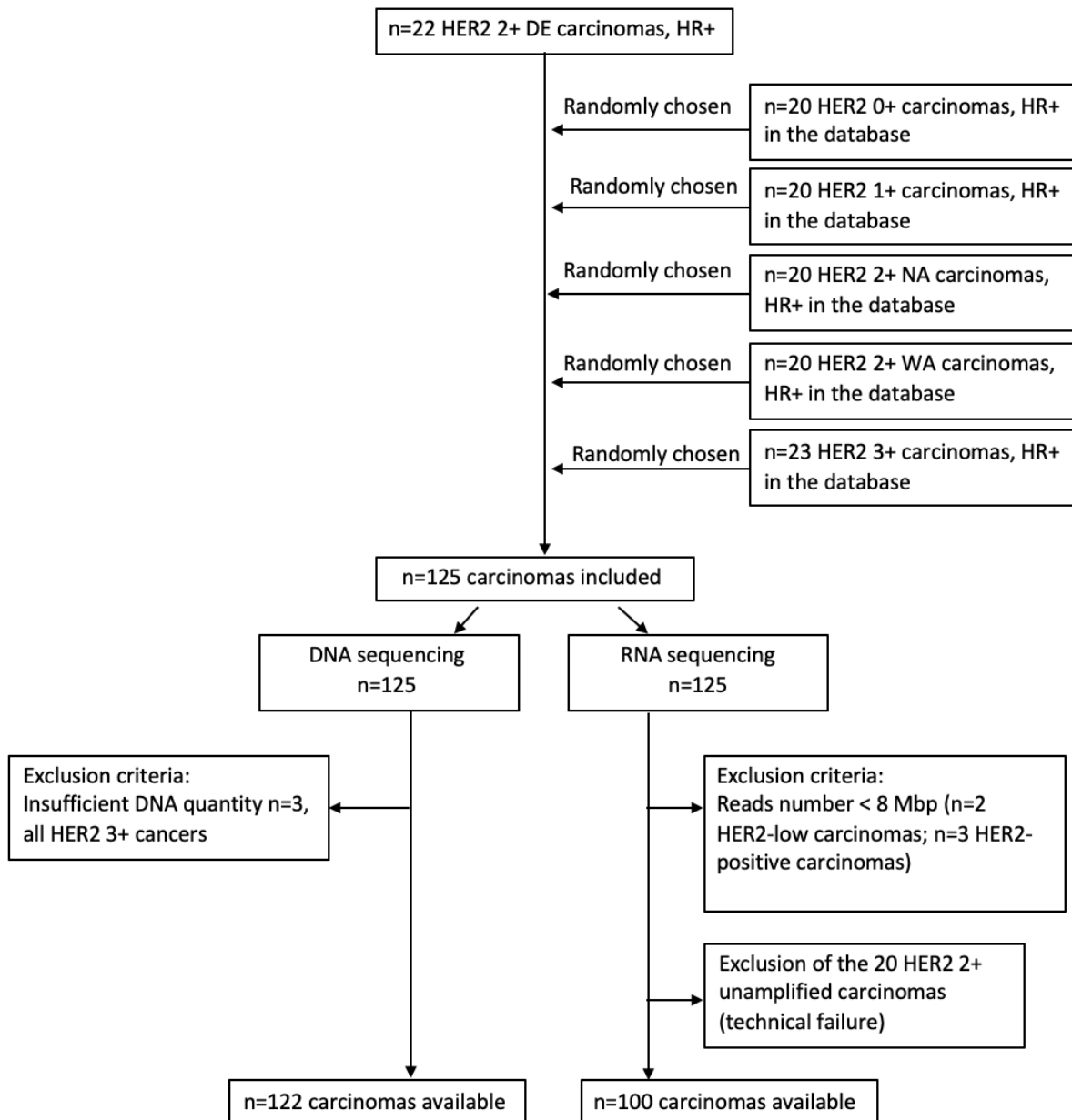


Figure 1. Flowchart of samples enrolled in the study and reasons for exclusion

Histopathological data were directly extracted from histological reports. For patients who underwent neo-adjuvant treatment (n=9, all HER2 3+), only data concerning the initial biopsy before treatment were analyzed. The histological subtypes included (NOS, micropapillary, papillary and mucinous) were defined according to the Fifth Edition of the World Health Organization’s Classification of Breast Tumors (13)). The modified SBR histoprognostic grade according to Elston & Ellis (differentiation - nuclear pleomorphism - mitoses) was used to characterize the tumor (14) and the TNM AJCC classification for tumor size and lymph node status on sentinel node or axillary curage when data were known (pT and pN). A double retrospective analyse, blinded to HER2 category, for data confirmation was performed by two pathologists on hematoxylin and eosine-stained H&E slides from cases and

controls (confirmation of histological subtype and infiltrative character), on Ki67 slides, on HER2 IHC results and HER2 FISH if HER2 2+ case. According to the 2014 international recommendations (15), an evaluation of semi-quantitative tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), blinded of HER2 category, was also performed by the same two pathologists. The result was given as percentage of lymphocytes within tumor bed.

Immunohistochemistry (IHC)

For all immunohistochemical analyses, antibodies references used and preparation details are available in the Supplementary Table S1. The analyses were performed on 5 µm-FFPE tissue sections (formalin-fixed paraffin-embedded), on the Ventana Benchmark XT system®, Roche™ automated system. Results were systematically reviewed by two independent pathologists. In case of disagreement, the slides were reviewed to determine a consensus result.

ER and PR

Determination of ER (Clone SP1, Ventana Benchmark XT system®, Roche™) and PR (Clone 1E2, Ventana Benchmark XT system®, Roche™) hormonal status was performed for cases and controls (n=125) and followed standard recommendations. Staining was considered negative if less than 1% of tumor cells were stained. Was considered positive, any score ≥ 10% intensity 1 to 3, in the infiltrative component only in presence of positive internal and external controls (13). Tumors comprising a score between 1 and 9% were not included in the study. The choice of this cut-off is supported by the fact that there is too little evidence of the efficacy of hormonal therapy for these tumors and that these very weakly positive tumors present a biological and transcriptomic profile very close to ER- tumors (16).

Ki67

Expression of the proliferation index by Ki67 (MiB-1, Dako system®, Agilent™) was also review when available. Result was given as percentage (%) of stained tumor cells.

HER2

HER2 overexpression and/or amplification (Clone 4B5, Ventana Benchmark XT system®, Roche™) status was scored according to the latest ASCO/CAP 2018 guidelines (6) and was considered negative in case of 0+ and 1+ staining and positive in case of 3+ staining. Staining 2+ required further investigation by *in situ* hybridization to place these tumors between group 5 (HER2 2+ NA), group 4 (HER2 2+ DE) and HER2 2+ WA.

HER2 Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

FISH analysis was performed on Hybridizer system[®] with Zytovision kit (ZytoLight[®] SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe, Clinisciences[™]), on 4 µm-FFPE tissue sections and for all carcinomas with 2+ IHC staining (n=62) and reviewed by two independent pathologists on at least 40 nuclei. Preparation details are available in the Supplementary Table S2. It was performed using a dual-probe HER2 (colored in green)/CEP17 (colored in red) FISH assay. Average HER2 copy number and HER2/CEP17 ratio were recorded for each tumor. Interpretation followed ASCO/CAP 2018 guidelines incorporating 5 groups. Group 4 (HER2 2+ DE), was retained in case of 2+ immunohistochemical staining with FISH showing HER2 copy number between 4 and 6 and HER2/CEP17 ratio < 2.0. In our study, HER2 2+ WA status was considered if immunohistochemical staining was 2+ with FISH showing a HER2 copy number between 6 and 10, regardless of the ratio.

Molecular analysis

DNA and RNA extraction

Based on evaluation of the percentage of infiltrating tumor cells on H&E slides, a macrodissection of the samples was performed in order to extract nucleic acids from FFPE specimens. All specimens had at least 80% tumor cells, except for 7 specimens, all category 3+ and on biopsies, which had between 40% and 80% tumor cells. DNA was extracted from four 5-µm tumor slides using Maxwell-16 FFPE Plus LEV DNA purification kit (Promega Corporation) according to the manufacturer's protocol. RNA was extracted from the same specimens using Maxwell-16 LEV RNA FFPE Purification kit (Promega Corporation) according to manufacturer's protocol. Spectrophotometry with absorbances of 230, 260 and 280 nm was used to assess quality of DNA and RNA. DNA was quantified using Qubit device 4 fluorometric assay (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Inc.).

DNA sequencing

For library preparation, 400 ng of DNA from solid tumors were fragmented with a Covaris LE220-plus device (Covaris, Inc.) to obtain fragments ~300 bp-long. Then, libraries were prepared with a SureSelect^{XT} custom panel (containing PIK3CA, AKT1, PTEN, TP53, BRCA1, BRCA2, PALB2, ARID1A, KRAS, NRAS and BRAF genes) (Agilent Technologies, Inc.) following the manufacturer's instructions. Paired-end (2x111 bases) sequencing was performed on a NextSeq500 device (Illumina, Inc.).

Bioinformatic analysis. Reads in FASTQ format were aligned using the Burrows-Wheeler aligner (BWA v.0.7.15) to the reference human genome GRCh37 (17). Local realignment was performed using the Genome Analysis Toolkit (GATK v.3.6) (18–20). Duplicate reads were removed using Picard v.2.5 (21). Outlyzer (v1.0) (22) was used to identify variants. Annovar (Annovar2016Feb01) (23) and SnpEff (v4.3i) (24) were used to annotate these variants. Quality controls were performed using fastQC (v0.11.8) (25), Samtools (v1.9) (26), and Qualimap (v2.2.1) (27) information through multiQC (v1.7) software (28). Variants with a frequency superior to 1% in the general population were filtered and did not appear in results tables analyzed by the biologists.

RNA sequencing

rRNA-depleted RNA was used for the library preparation with the NEBNext Ultra II Directional RNA library prep kit for Illumina (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. Libraries were paired-end sequenced (2*76 base pairs) on a NextSeq500 device (Illumina), with a read depth of 20 million.

Kallisto software (29) was used for quantifying transcript abundance from RNA-seq data against GRCh38 cDNA reference transcriptome from the Ensembl database, v96. Downstream analysis included only protein-coding transcripts and genes. Differential expression analysis was performed using the DESeq2 R package (30). Single-sample Gene Set Enrichment Analysis was performed using the GSEA R package v1.40.1 (31).

The study focused on activation of PI3K-AKT, MAPK and JAK-STAT intracellular signaling pathways. Only genes downstream of intracellular signaling pathways were retained in the analyses. All upstream genes coding for receptors not involved in the pathology concerned were eliminated.

Transcriptomic profiles were available for 40 of 62 HER2-low (21 of 22 DE cases and 19 of 20 1+ controls), for all HER2-negative (n=20), and for 40 of 43 HER2-positive (18 of 20 WA controls and 22 of 23 3+ carcinomas). RNA sequencing of HER2 2+ NA carcinomas in HER2-low group was performed and found a very different profile from the other carcinomas. Sequencing of new cases is underway to verify these data. A total of 100 carcinomas in the study have currently undergone RNA analysis (reads > 8Mbp), representing 80% of our

population. The remaining samples did not have enough RNA for sequencing and were excluded from the analysis (Figure 1). The distribution was homogeneous between the groups.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as numbers of observations, means (with standard deviation) and medians (with min-max), and compared using Student, Wilcoxon, Anova and Kruskal-Wallis tests as appropriate. Categorical variables, expressed as frequencies and percentages, were compared using the Chi² or Fisher test. When a difference was found between groups, post-hoc tests were performed with Bonferroni corrections to identify between which groups there is a difference. Tests were two-sided. The significance threshold was set at 5%. All statistical analyses were performed using the SAS software, version 9.4.

The CGFL was authorized to conduct this scientific study by relevant French authorities (authorization number AC-2019-3531). The study was approved by CGFL Ethical and Scientific Committee.

RESULTS

We compared 62 HER2-low carcinomas with 20 HER2-negative and 43 HER2-positive carcinomas; then 22 DE breast carcinomas with each control subgroup (20 0+, 1+, 2+ NA and 2+ WA carcinomas and 23 3+ carcinomas).

Clinico-pathological characteristics

Baseline characteristics (clinical and histological) are summarized in Table 1 for the 3 main groups and in Table 2 for the 6 additional groups.

HER2-low carcinomas had a lower Elston and Ellis modified SBR histopronostic grade compared to HER2-positive tumors ($p=0.0034$) with lower mitotic scores and lower Ki67 ($p=0.0179$ and $p=0.0001$ respectively). These data were also found between HER2-low and WA cancers, with lower mitotic score ($p=0.0156$, *data not shown*) and lower Ki67 proliferation index ($p=0.0131$, *data not shown*). All tumors were HR+, however quick-score was higher in HER2-low and HER2-negative carcinomas. There was no characteristic that could differentiate HER2-negative and HER2-low groups. No significant differences were found for other clinico-

pathological data, including tumor size, N+ status, presence of lymphatic vascular emboli, and quantification of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs).

For DE carcinomas, we found a significant difference in mitotic score and index with HER2 0+ carcinomas ($p=0.0156$ and $p=0.0065$ respectively) and a significantly higher Ki67 proliferation index compared to 0+ and 1+ carcinomas ($p=0.0175$ and $p=0.0011$). ER had a non-significant but higher quick-score than HER2 3+ tumors. Furthermore, no significant difference was found between DE cancers and WA cancers.

Table 1. Clinical and pathological characteristics of HER2-low carcinoma compared to two control groups.

	HER2-low (n=62)	Controls		Overall	P-values		
		HER2-negative (n=20)	HER2-positive (n=43)		0+ vs. HER2-positive	0+ vs. HER2-low	HER2-positive vs. HER2-low
	n (%)	n (%)	n (%)				
Age				0,7618			
Mean ± std	65.8 ± 10.8	65.3 ± 12.8	64.0 ± 13.5				
Median [min - max]	67.0 [42.0 - 85.0]	68.5 [36.0 - 91.0]	64.0 [37.0 - 89.0]				
Menopausal status				0,1259			
Peri/premenopausal	7 (11.3)	5 (25.0)	11 (25.6)				
Postmenopausal	55 (88.7)	15 (75.0)	32 (74.4)				
Tumor size (US, mm)				0,1188			
Mean ± std	18.0 ± 12.1	14.9 ± 12.3	18.7 ± 11.4				
Median [min - max]	14.5 [5.0 - 70.0]	11.3 [3.5 - 50.0]	15.0 [4.0 - 58.0]				
N (US)				0,8269			
N0	56 (90.3)	18 (90.0)	38 (88.4)				
N1	6 (9.7)	2 (10.0)	4 (9.3)				
N3	0 (0)	0 (0)	1 (2.3)				
Multifocality				0,79			
Unifocal	52 (83.9)	18 (90.0)	37 (86.0)				
Bifocal	10 (16.1)	2 (10.0)	6 (14.0)				
Tumor size (mm)				0,8847			
Mean ± std	18.4 ± 9.5	18.1 ± 11.7	18.9 ± 11.6				
Median [min - max]	15.5 [4.5 - 65.0]	15.5 [6.0 - 55.0]	15.0 [5.8 - 58.0]				
N				0,0096	0,0497	0,0627	0,3688
pN0	39 (62.9)	9 (45.0)	34 (79.1)				
pN1	21 (33.9)	6 (30.0)	7 (16.3)				
pN2	2 (3.2)	4 (20.0)	2 (4.7)				
pN3	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)				
Grade				0,0007	0,0005	0,7688	0,0034
I	24 (38.7)	10 (50.0)	3 (7.0)				
II	31 (50.0)	10 (50.0)	31 (72.1)				
III	7 (11.3)	0 (0)	9 (20.9)				
Glandular differentiation				0,269			
1	2 (3.2)	1 (5.0)	0 (0)				
2	29 (46.8)	9 (45.0)	14 (32.6)				
3	31 (50.0)	10 (50.0)	29 (67.4)				

Nuclear grade				0,1051				
1	1 (1.6)	0 (0)	0 (0)					
2	52 (83.9)	19 (95.0)	31 (72.1)					
3	9 (14.5)	1 (5.0)	12 (27.9)					
Mitosis score				0,0001	0,0001	0,1156	0,0179	
1	41 (66.1)	19 (95.0)	15 (34.9)					
2	15 (24.2)	1 (5.0)	18 (41.9)					
3	6 (9.7)	0 (0)	10 (23.3)					
Mitosis index (/mm²)				0,0003	0,0002	0,0625	0,0485	
Mean ± std	3.5 ± 3.4	1.8 ± 1.6	4.8 ± 3.2					
Median [min - max]	2.3 [0.4 - 18.8]	0.9 [0.4 - 6.6]	4.4 [0.4 - 15.1]					
Histologic subtype				0,5616				
Micropapillary	2 (3.2)	0 (0)	1 (2.3)					
Mucinous	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)					
NST	57 (91.9)	18 (90.0)	41 (95.3)					
NST + micropapillary	3 (4.8)	1 (5.0)	1 (2.3)					
Lymphovascular emboli				0,9027				
No	41 (66.1)	13 (65.0)	30 (69.8)					
Yes	21 (33.9)	7 (3.0)	13 (30.2)					
sTIL (%)				0,2438				
Mean ± std	8.5 ± 10.9	8.2 ± 9.3	10.6 ± 9.6					
Median [min - max]	5.0 [1.0 - 60.0]	4.0 [1.0 - 30.0]	5.0 [1.0 - 40.0]					
sTIL (≤ 10%)				0,1954				
No	11 (17.7)	4 (20.0)	14 (32.6)					
Yes	51 (82.3)	16 (80.0)	29 (67.4)					
sTIL (> 40%)				0,3107				
No	57 (91.9)	20 (100.0)	42 (97.7)					
Yes	5 (8.1)	0 (0)	1 (2.3)					
ER (I x %)				0,1134				
Mean ± std	292.3 ± 22.8	280.0 ± 41.9	277.3 ± 43.2					
Median [min - max]	300.0 [200.0 - 300.0]	300.0 [160.0 - 300.0]	300.0 [140.0 - 300.0]					
PR (I x %)				0,0544				
Mean ± std	182.7 ± 97.4	212.3 ± 100.2	151.0 ± 110.4					
Median [min - max]	170.0 [0.0 - 300.0]	247.5 [20.0 - 300.0]	140.0 [0.0 - 300.0]					
Ki67 (%)				<.0001	0,0002	0,3445	0,0001	
n	62	20	42*					
Mean ± std	15.7 ± 10.7	14.4 ± 13.5	23.8 ± 11.4					
Median [min - max]	13.0 [3.0 - 60.0]	11.0 [2.0 - 60.0]	21.5 [5.0 - 60.0]					

HER2 : human epidermal growth factor receptor 2 ; sTIL = stromal tumor infiltrating lymphocyte ; ER : estrogen receptor ;

PR : progesterone receptor ; ISH : *in situ* hybridization

* Missing data due to material lack

Table 2. Clinical and pathological characteristics of HER2 2+ double-equivocal carcinoma compared to 5 control groups.

	Controls						P-values		
	HER2 2+ DE (cases, n=22)	HER2 0+ (n=20)	HER2 1+ (n=20)	HER2 2+ NA (n=20)	HER2 2+ WA (n=20)	HER2 3+ (n=23)	Overall	DE VS 0+	DE VS 1+
Age	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	0,2615		
Mean ± std	69.5 ± 9.1	65.3 ± 12.8	66.7 ± 11.5	60.7 ± 10.3	63.3 ± 13.3	64.7 ± 13.9			

Median [min - max]	70.5 [50.0 - 85.0]	68.5 [36.0 - 91.0]	71.0 [42.0 - 83.0]	59.0 [43.0 - 79.0]	62.0 [37.0 - 84.0]	64.0 [38.0 - 89.0]			
Menopausal status									0,4498
Peri/premenopausal	2 (9.1%)	5 (25.0%)	3 (15.0%)	2 (10.0%)	6 (30.0%)	5 (21.7%)			
Postmenopausal	20 (90.9%)	15 (75.0%)	17 (85.0%)	18 (90.0%)	14 (70.0%)	18 (78.3%)			
Tumor size (US, mm)							0,0263	0.414	0.228
Mean ± std	20.2 ± 14.1	14.9 ± 12.3	13.4 ± 8.4	20.3 ± 12.0	16.6 ± 8.3	20.5 ± 13.4			
Median [min - max]	15.0 [6.0 - 70.0]	11.3 [3.5 - 50.0]	11.0 [5.0 - 38.0]	16.0 [10.0 - 63.0]	14.5 [4.0 - 30.0]	15.0 [7.0 - 58.0]			
N (US)									0,6563
N0	19 (86.4%)	18 (90.0%)	20 (100.0%)	17 (85.0%)	18 (90.0%)	20 (87.0%)			
N1	3 (13.6%)	2 (10.0%)	0 (0.0%)	3 (15.0%)	2 (10.0%)	2 (8.7%)			
N3	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)			
Multifocality							0,027	1	1
Unifocal	18 (81.8%)	18 (90.0%)	14 (70.0%)	20 (100.0%)	15 (75.0%)	22 (95.7%)			
Bifocal	4 (18.2%)	2 (10.0%)	6 (30.0%)	0 (0.0%)	5 (25.0%)	1 (4.3%)			
Tumor size (mm)									0,1151
Mean ± std	17.5 ± 6.7	18.1 ± 11.7	14.6 ± 7.3	23.1 ± 12.2	17.8 ± 8.7	19.9 ± 13.7			
Median [min - max]	16.0 [8.0 - 30.0]	15.5 [6.0 - 55.0]	12.3 [4.5 - 32.0]	20.5 [11.0 - 65.0]	14.8 [7.0 - 35.0]	15.0 [5.8 - 58.0]			
N									0,2082
pN0	12 (54.5%)	9 (45.0%)	14 (70.0%)	13 (65.0%)	15 (75.0%)	19 (82.6%)			
pN1	9 (40.9%)	6 (30.0%)	6 (30.0%)	6 (30.0%)	4 (20.0%)	3 (13.0%)			
pN2	1 (4.5%)	4 (20.0%)	0 (0.0%)	1 (5.0%)	1 (5.0%)	1 (4.3%)			
pN3	0 (0.0%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)			
Grade							<.0001	0.270	0.057
I	3 (13.6%)	10 (50.0%)	12 (60.0%)	9 (45.0%)	2 (10.0%)	1 (4.3%)			
II	17 (77.3%)	10 (50.0%)	7 (35.0%)	7 (35.0%)	14 (70.0%)	17 (73.9%)			
III	2 (9.1%)	0 (0.0%)	1 (5.0%)	4 (20.0%)	4 (20.0%)	5 (21.7%)			
Glandular differentiation									0,0778
1	1 (4.5%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)			
2	5 (22.7%)	9 (45.0%)	12 (60.0%)	12 (60.0%)	7 (35.0%)	7 (30.4%)			
3	16 (72.7%)	10 (50.0%)	8 (40.0%)	7 (35.0%)	13 (65.0%)	16 (69.6%)			
Nuclear grade							0,014	1	1
1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)			
2	20 (90.9%)	19 (95.0%)	18 (90.0%)	14 (70.0%)	17 (85.0%)	14 (60.9%)			
3	2 (9.1%)	1 (5.0%)	1 (5.0%)	6 (30.0%)	3 (15.0%)	9 (39.1%)			
Mitosis score							<.0001	0.015	0.242
1	10 (45.5%)	19 (95.0%)	17 (85.0%)	14 (70.0%)	6 (30.0%)	9 (39.1%)			
2	9 (40.9%)	1 (5.0%)	3 (15.0%)	3 (15.0%)	9 (45.0%)	9 (39.1%)			
3	3 (13.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (15.0%)	5 (25.0%)	5 (21.7%)			
Mitosis index (/mm²)							0,0004	0.006	0.107
Mean ± std	4.2 ± 2.6	1.8 ± 1.6	2.4 ± 2.7	3.9 ± 4.5	4.9 ± 3.3	4.6 ± 3.3			
Median [min - max]	4.1 [0.9 - 10.5]	0.9 [0.4 - 6.6]	1.3 [0.4 - 9.6]	2.3 [0.5 - 18.8]	5.0 [0.4 - 11.3]	4.0 [0.5 - 15.1]			
Histologic subtype									0,0988
Micropapillary	2 (9.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)			
Mucinous	0 (0.0%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)			
NST	17 (77.3%)	18 (90.0%)	20 (100.0%)	20 (100.0%)	19 (95.0%)	22 (95.7%)			
NST + micropapillary	3 (13.6%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)			

Lymphovascular emboli							0,1758		
No	11 (50.0%)	13 (65.0%)	17 (85.0%)	13 (65.0%)	12 (60.0%)	18 (78.3%)			
Yes	11 (50.0%)	7 (35.0%)	3 (15.0%)	7 (35.0%)	8 (40.0%)	5 (21.7%)			
sTIL (%)							0,1886		
Mean ± std	6.4 ± 5.8	8.2 ± 9.3	10.0 ± 10.6	9.5 ± 15.0	10.2 ± 11.2	11.0 ± 8.3			
Median [min - max]	5.0 [1.0 - 20.0]	4.0 [1.0 - 30.0]	6.5 [1.0 - 50.0]	5.0 [1.0 - 60.0]	5.0 [1.0 - 40.0]	10.0 [2.0 - 25.0]			
sTIL (≤ 10%)							0,4931		
No	3 (13.6%)	4 (20.0%)	4 (20.0%)	4 (20.0%)	5 (25.0%)	9 (39.1%)			
Yes	19 (86.4%)	16 (80.0%)	16 (80.0%)	16 (80.0%)	15 (75.0%)	14 (60.9%)			
sTIL (> 40%)							0,0183		1
No	22 (100.0%)	20 (100.0%)	19 (95.0%)	16 (80.0%)	19 (95.0%)	23 (100.0%)			
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (5.0%)	4 (20.0%)	1 (5.0%)	0 (0.0%)			
ER (I x %)							0,025	0.914	1
Mean ± std	292.7 ± 22.5	280.0 ± 41.9	292.0 ± 23.5	292.0 ± 23.5	290.0 ± 30.8	266.3 ± 49.8			
Median [min - max]	300.0 [200.0 - 300.0]	300.0 [160.0 - 300.0]	300.0 [200.0 - 300.0]	300.0 [200.0 - 300.0]	300.0 [200.0 - 300.0]	300.0 [140.0 - 300.0]			
PR (I x %)							0,2332		
Mean ± std	180.5 ± 102.5	212.3 ± 100.2	184.0 ± 95.5	184.0 ± 98.6	133.1 ± 119.6	166.5 ± 101.8			
Median [min - max]	170.0 [0.0 - 300.0]	247.5 [20.0 - 300.0]	160.0 [30.0 - 300.0]	180.0 [30.0 - 300.0]	130.0 [0.0 - 300.0]	160.0 [20.0 - 300.0]			
Ki67 (%)							<.0001	0.017	0.001
n	22	20	20	20	20	22*			
Mean ± std	20.8 ± 10.4	14.4 ± 13.5	10.6 ± 5.7	15.4 ± 12.6	20.0 ± 7.8	27.2 ± 13.1			
Median [min - max]	20.0 [8.0 - 60.0]	11.0 [2.0 - 60.0]	9.0 [5.0 - 25.0]	10.0 [3.0 - 60.0]	20.0 [5.0 - 40.0]	25.0 [8.0 - 60.0]			
Anti-HER2 therapy							<.0001		
No	22 (100.0%)	20 (100.0%)	20 (100.0%)	20 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)			
Yes	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	20 (100.0%)	23 (100.0%)			

HER2 : human epidermal growth factor receptor 2 ; sTIL = stromal tumor infiltrating lymphocyte ; ER : estrogen receptor ; PR : progesterone receptor ; ISH : *in situ* hybridization ; DE : double-equivocal ; NA : non amplified ; WA : weakly-amplified
* Missing data due to material lack

Genomic profiles

3 samples did not have sufficient DNA for sequencing and thus were excluded from this data set, all were 3+ carcinomas. 122 tumors were successfully sequenced and have somatic mutation profiles available (Figure 1). All molecular data are detailed in Table 3 for the 3 main groups and in Table 4 for the 6 additional groups. Complete list of pathogenic variants is provided in Supplementary Table S3.

Concerning PIK3CA mutations, a significant difference between HER2-low and HER2-positive groups was found with the presence of more PIK3CA mutations in HER2-low group ($p=0.0079$). Note that this difference was not significant between HER2-low and WA tumors. No significant difference was found between HER2-negative and HER2-low carcinomas. In

total, a higher mutational prevalence correlated with the absence of *ERBB2* gene amplification or hyperexpression ($p=0.0095$) was significantly found. Within HER2-low carcinomas, these mutations occurred mostly in tumors of histopronostic grade I ($n=15$, 55.55%), small size < 2 cm (pT1 $n=18$, 66.66%) and without axillary invasion (pN0 $n=22$, 81.5%). Mutated tumors have also a low mitotic count, with a majority of score 1 ($n=21$, 77.77%). Ki67 proliferation index was low with a median of 10%. Presence of lymphovascular emboli was reported for 5 cancers (18.5%), which is less than for all HER2-low carcinomas ($n= 21$, 33.9%). TILs were low with a median of 5%.

Among these mutations, 8 occurred in DE group (36.4%), i.e. almost as many as in 0+, 1+ and 2+ NA groups, in favor of a higher mutational prevalence linked to the absence of *ERBB2* gene amplification or hyperexpression ($p=0.0346$). There was no significant association between DE group and the other groups, including WA cancers.

Concerning TP53 gene, we highlighted an increase in the mutation rate in HER2 positive tumors ($p<0.0001$). 2 mutations were found in HER2-low carcinomas versus 12 in HER2-positive carcinomas ($p=0.0006$). These mutations occurred in tumors with high Elston and Ellis modified SBR histopronostic grades (class II and III) and high Ki67 proliferation index (25 to 30%). Both of these cancers were classified as HER2 2+ by immunohistochemistry (one NA and one DE). This significant difference is maintained when comparing HER2-low carcinomas with WA tumors ($p=0.029$, *data not shown*).

The presence of a single mutation in DE group does not distinguish it from the other groups, despite a tendency for the prevalence of TP53 mutations to increase with HER2 amplification and/or hyperexpression ($p=0.0002$).

No significant differences between the groups were found for the other mutations searched.

Table 3. Mutation rates in genes, compared between HER2-low carcinomas and two control groups

Gene	Mutation impact*	n mutant cases (%)			Overall	P-value
		HER2-low (n=62)	HER2-negative (n=20)	HER2-positive (n=40**)		
<i>PIK3CA</i>	Gain of function	27 (43.5)	8 (40.0)	6 (15.0)	0.0095	0.0079
<i>AKT1</i>	Gain of function	3 (4.8)	0	0	0.412	-
<i>PTEN</i>	Loss of function	0	0	1 (2.5)	0.4918	-
<i>TP53</i>	Loss of function	2 (3.2)	0	12 (30.0)	<.0001	0.0006
<i>BRCA1</i>	-	0	0	0	-	-
<i>BRCA2</i>	Loss of function	2 (3.2)	0	2 (5.0)	0.6555	-
<i>PALB2</i>	-	0	0	0	-	-
<i>ARID1A</i>	Loss of function	1 (1.6)	0	1 (2.5)	1	-
<i>KRAS</i>	-	0	0	0	-	-
<i>NRAS</i>	-	0	0	0	-	-
<i>BRAF</i>	-	0	0	0	-	-

HER2 : human epidermal growth factor receptor 2

* impacts defined based on the literature

**Missing data of three HER2 3+ carcinomas

Table 4. Mutation rates in genes, compared between HER2 double-equivocal and five control groups

Gene	Mutation impact*	n mutant cases (%)						P-value
		HER2 2+ DE (n=22)	HER2 0+ (n=20)	HER2 1+ (n=20)	HER2 2+ NA (n=20)	HER2 2+ WA (n=20)	HER2 3+ (n=20**)	
<i>PIK3CA</i>	Gain of function	8 (36.4)	8 (40.0)	10 (50.0)	9 (45.0)	5 (25.0)	1 (5.0)	0.0346
<i>AKT1</i>	Gain of function	0	0	2 (10.0)	1 (5.0)	0	0	0.2819
<i>PTEN</i>	Loss of function	0	0	0	0	1 (5.0)	0	0.8197
<i>TP53</i>	Loss of function	1 (4.5)	0	0	1 (5.0)	4 (20.0)	8 (40.0)	0.0002
<i>BRCA1</i>	-	0	0	0	0	0	0	-
<i>BRCA2</i>	Loss of function	2 (9.1)	0	0	0	1 (5.0)	1 (5.0)	0.7085
<i>PALB2</i>	-	0	0	0	0	0	0	-
<i>ARID1A</i>	Loss of function	0	0	0	1 (5.0)	0	1 (5.0)	0.7019
<i>KRAS</i>	-	0	0	0	0	0	0	-
<i>NRAS</i>	-	0	0	0	0	0	0	-
<i>BRAF</i>	-	0	0	0	0	0	0	-

HER2 : human epidermal growth factor receptor 2 ; DE : double-equivocal ; NA : non amplified ; WA : weakly-amplified

*impacts defined based on the literature

**Missing data of three HER2 3+ carcinomas

Transcriptomic profiles

ERBB2 mRNA expression

ERBB2 mRNA expression level of HER2-low tumors was intermediate between HER2-negative and HER2-positive cancers, with no significant difference with HER2-negative group. HER2-positive group had significantly higher expression compared to the other two groups ($p < 0.001$) (Figure 2).

Detailed analysis of the 5 immunohistochemical groups showed an increasing gradient of *ERBB2* expression from HER2 0+ group to HER2 3+ group. HER2 3+ group had significantly higher expression than all other groups ($p < 0.001$). *ERBB2* expression appeared similar between HER2 0+ and HER2 1+ tumors ($p = 0.65$), and between DE and WA tumors ($p = 0.85$).

A secondary analysis of *ERBB2* expression only based on the presence of an activating mutation in PI3K-AKT pathway independently of HER2 amplification status was performed. It showed that the presence of an activating mutation in this pathway was associated with a lower expression of *ERBB2* ($p=0.001$).

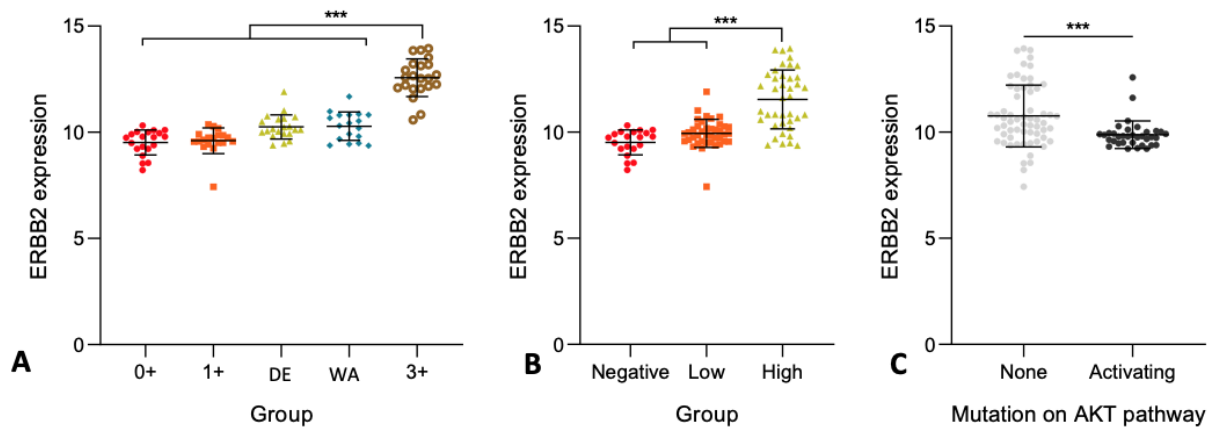


Figure 2. *ERBB2* mRNA expression level between HER2 double-equivocal compared to 4 control groups (A), HER2-low compared to two control groups (B) and according with presence of activating mutation on AKT pathway (C).

HER2-low: whole transcriptome and PI3K-AKT, JAK-STAT and MAPK pathways

On whole transcriptome, HER2-low and HER2-negative tumors showed a comparable profile (Figure 3) with the appearance of a gene expression cluster. HER2-positive carcinomas differed from the other two groups and showed a specific profile and gene expression unique to these tumors.

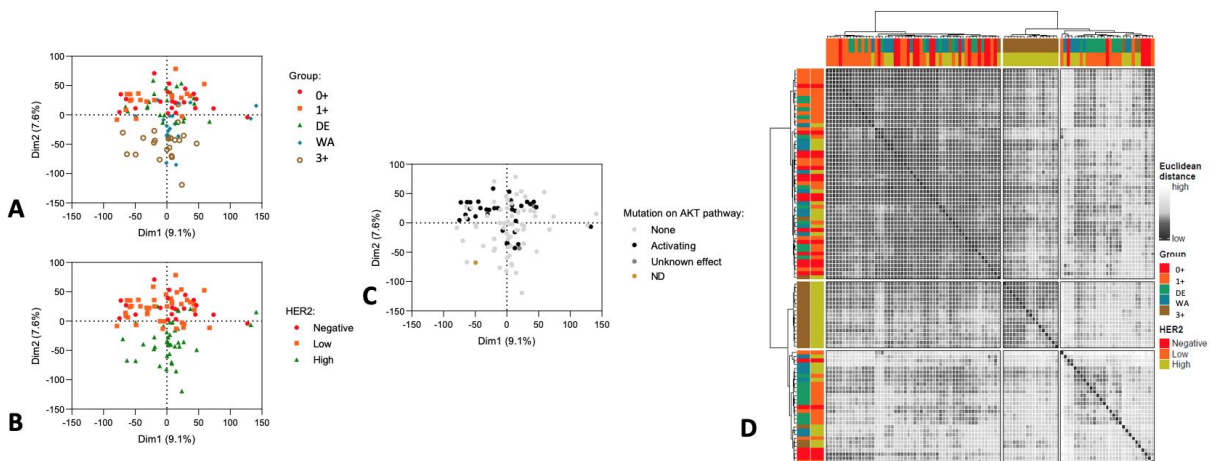


Figure 3. Principal component analysis of whole transcriptome between HER2-double equivocal and 4 control groups (A), HER2-low and two control groups (B) and according with presence of activating mutation on AKT pathway (C). Distance matrix of whole transcriptome between all the groups (D).

On PI3K-AKT pathway analysis involving 224 genes, HER2-low carcinomas were divided into two distinct clusters, with no homogeneous profile characterizing them (Figure 4). HER2-negative carcinomas were similar to one of the HER2-low carcinoma clusters. The HER2-positive cancers were also heterogeneous and formed two different populations, one of which was close to the other cluster of HER2-low cancers.

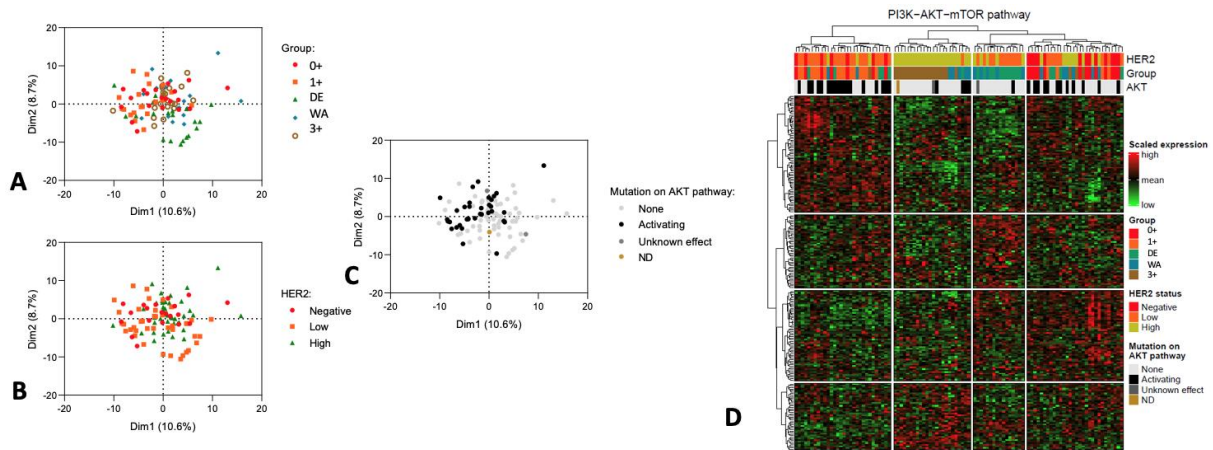


Figure 4. Principal component analysis of PI3K-AKT pathway between HER2-double equivocal and 4 control groups (A), HER2-low and two control groups (B) and according with presence of activating mutation on AKT pathway (C). Heatmap of PI3K-AKT pathway between all the groups (D)

JAK-STAT signaling pathway, including 46 genes, was heterogeneously expressed in HER2-low carcinomas (Figure 5). More of these tumors resembled HER2-positive tumors without showing a strictly identical profile. HER2-negative carcinomas showed heterogeneous profiles among them, without identified cluster formation.

Analysis of MAPK signaling pathway, interested 190 genes, found HER2-low carcinomas forming a heterogeneous category with the presence of two different tumor clusters (Figure 6). HER2-negative tumors showed more diverse transcriptomic profiles. HER2-positive cancers had a homogeneous transcriptomic profile of their own, with specific expression of certain genes distinguishing them from other cancers.

Overall, HER2-low cancers were characterized by the presence of two distinct transcriptomic clusters, related to the coexistence of HER2 1+ and DE tumors.

HER2-double equivocal: whole transcriptome and PI3K-AKT, JAK-STAT and MAPK pathways

In whole transcriptome analysis, DE carcinomas showed a comparable profile to WA carcinomas (Figure 3). HER2 0+ and HER2 1+ tumors were similarly positioned on this pathway and seemed to express genes in common inducing a similar behavior. HER2 3+ carcinomas were strongly distinguished from the other groups and had their own gene expression inducing a specific behavior of these tumors.

Analysis of the PI3K-AKT signaling pathway highlighted the presence of a gene expression cluster formed by DE and WA carcinomas, which had a similar but not identical behavior (Figure 4). WA cancers appeared to be quite similar to HER2 3+ tumors. HER2 3+ carcinomas showed a homogeneous profile among them with a specific gene expression, unique to these tumors. HER2 0+ and HER2 1+ tumors expressed genes in common.

On JAK-STAT pathway study, DE cancers appeared to have a similar profile to WA tumors (Figure 5). HER2 3+ cancers had a profile closer to the DE and WA groups than to the other pathways, forming a common spectrum. HER2 0+ and HER2 1+ tumors obtained more heterogeneous profiles, without a well-formed cluster, unlike on PI3K-AKT pathway.

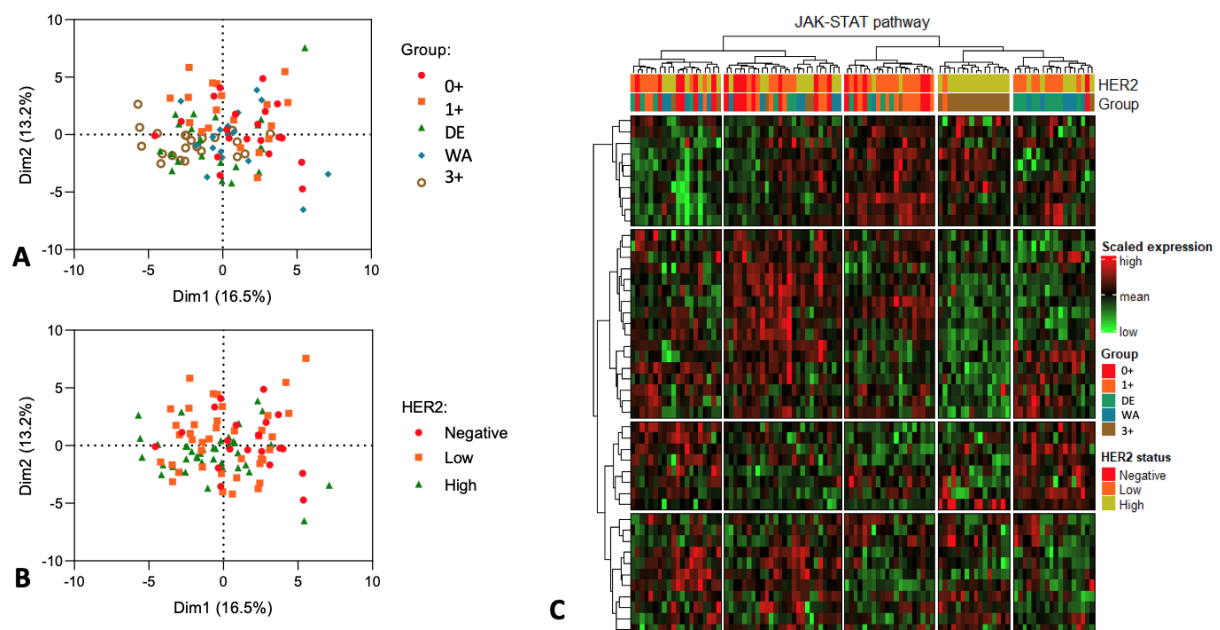


Figure 5. Principal component analysis of JAK-STAT pathway between HER2-double equivocal and 4 control groups (A) and HER2-low and two control groups (B). Heatmap of JAK-STAT pathway between all the groups (C).

On analysis of MAPK pathway, DE and WA cancers were similar to some HER2 3+ carcinomas, which overall showed a homogeneous transcriptomic profile apart from specific

expression of some genes (Figure 6). HER2 1+ and HER2 0+ tumors showed more diverse transcriptomic profiles, without cluster formation of gene expression.

In total, DE breast cancers showed a transcriptomic profile close to that of WA tumors.

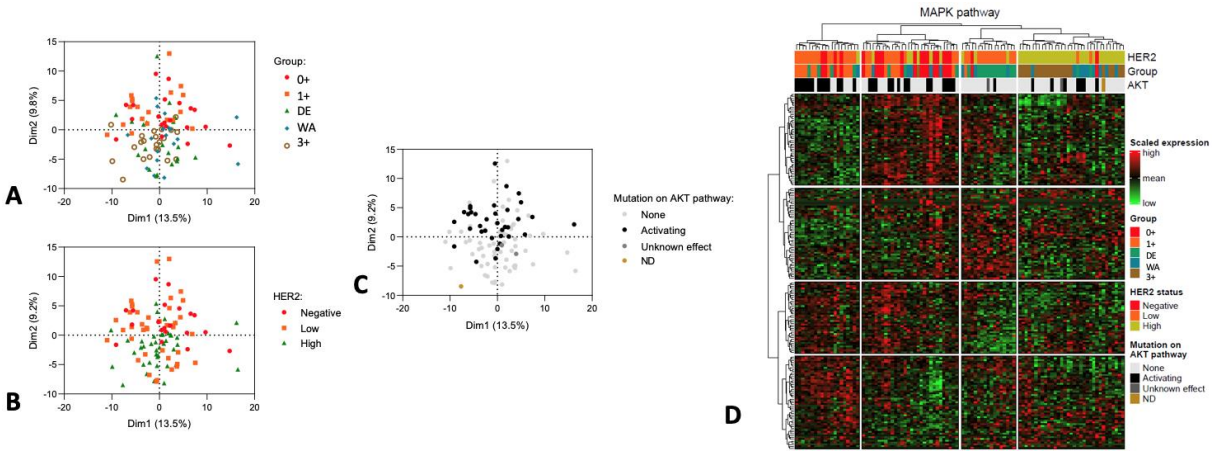


Figure 6. Principal component analysis of MAPK pathway between HER2-double equivocal and 4 control groups (A), HER2-low and two control groups (B) and according with presence of activating mutation on AKT pathway (C). Heatmap of MAPK pathway between all the groups (D).

Analysis of global gene expression and phenotypic profiles within the different pathways

A gene set enrichment analysis (ssGSEA) was performed to determine whether different groups of HER2 tumors have significantly different gene expression profiles. This analysis assesses several defined genes to detect small changes in their expression that may explain different expressions within biological pathways. The presence of each gene in a pathway was collected and assigned a score reflecting its importance in that pathway. Analysis of a group of genes allows to highlight different profiles, whereas a small variation in the expression of an individual gene does not allow it. Expression of all the genes composing a biological pathway was analyzed to know its influence on the activation of this pathway, for each HER2 expression group. Overall results are shown in Figure 7.

There was a significant difference in gene expression between HER2-negative and HER2-positive carcinomas within the three pathways. There was a stronger activation of all three pathways in HER2-negative tumors, with a decreasing gradient to HER2-positive carcinomas. HER2-low carcinomas were significantly different from HER2-positive tumors on PI3K-AKT and MAPK pathways ($p=0.001$ and $p<0.001$, respectively), activating these pathways more strongly by the presence of different gene expression. No significant difference was

demonstrated between HER2-negative and HER2-low tumors, in favor of a similar overall gene expression activating the different pathways in the same way.

Detailed analysis of the 5 groups showed similar profiles between HER2 0+ and HER2 1+ tumors (expression of the same genes on the same pathways). On PI3K-AKT pathway, HER2 3+ carcinomas had a lower activation than the other groups ($p=0.03$) related to a different gene expression activating this pathway less. Same result was found for MAPK and JAK-STAT pathways ($p<0.001$ and $p=0.005$ respectively). Within each of three pathways, DE tumors showed a gene enrichment score close to that of WA cancers (common gene expression), with activation of the different pathways of similar intensity.

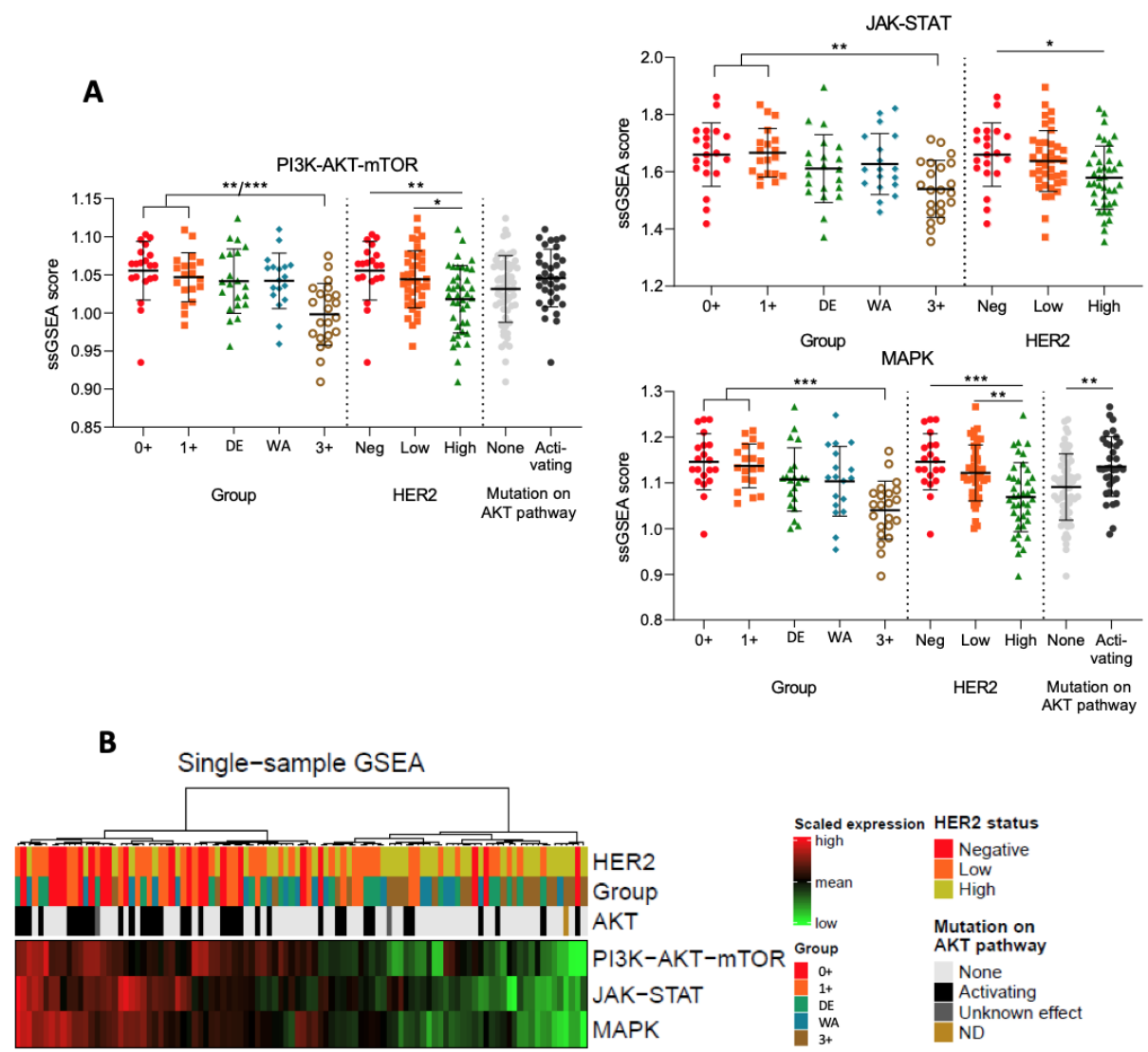


Figure 7. Single-sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA) between all the groups and according with presence of activating mutation on AKT pathway in the three pathways (A) and Heatmap (B).

Impact of activating mutations on the whole transcriptome and the specific signaling pathways

All previous analyses were performed by separating carcinomas with an activating mutation on PI3K-AKT pathway from non-mutated carcinomas.

Whole transcriptome showed a cluster of profiles altered by the presence of an activating mutation, behaving globally in the same way whatever their HER2 classification (Figure 3).

PI3K-AKT pathway found a cluster of mutated carcinomas mainly composed of HER2 0+, HER2 1+ and DE tumors (Figure 4). Among HER2-low and HER2-negative tumors, two expression profiles were found depending on the presence or absence of an activating mutation. Mutated HER2-low carcinomas had a similar profile to HER2-negative carcinomas. Non-mutated HER2-low and HER2-negative carcinomas tended to be similar to HER2-positive cancers. These data were not significant.

Analysis of MAPK pathway showed the same results (Figure 6). Cancers with mutations had a different expression profile than non-mutated cancers.

Analysis of global activation of the three pathways (ssGSEA) according to the presence of an activating mutation showed a strong activation of signaling pathways in case of mutation (Figure 7). Overall activation was significantly higher in case of mutation in MAPK pathway ($p=0.003$) but not significant for PI3K-AKT pathway. However, there was a tendency for carcinomas with activating mutations to have a higher expression of PI3K-AKT pathway regardless of their HER2 status.

DISCUSSION

Determination of HER2 amplification and/or expression status is central to the therapeutic management of breast carcinoma, for the prescription of conventional and emerging treatments. Therapeutic landscape now appears to be based on 3 broad categories: HER2-negative, HER2-low and HER2-positive. HER2-low tumors, especially DE tumors, cause therapeutic challenges because they do not seem to respond to conventional anti-HER2 therapies, but new treatments currently being widely studied (promising HER2-directed antibody-drug conjugates ADCs) seem to offer future perspectives in preclinical settings leading us to better characterize this new breast cancer subtype.

Most teams reported a young age of HER2-low cancers between 53 and 59 years (10,11,32), although Zhang and al (33) found a median age of 66.62 years, similar to ours (67 years) and Tarantino and al (34) a median of 46 years, younger than for HER2-negative (median 49 years, $p=0.044$). Size shows a tendency to increase with HER2 amplification status, significantly larger in HER2-low compared to HER2-negative carcinomas in Schettini and al ($p=0.007$) (32), confirmed by Eiger and al (35) in his review of the literature and by Rossi and al (36) in a study gathering HER2 0+ and 1+ carcinomas on one side and 2+ NA carcinomas on the other. We find this trend without significant result, as did the team of Zhang and al (33). It is the same for DE tumors that presented an intermediate place between 0+, 1+, 2+ NA and 2+ WA, 3+ groups (37,38). It has also been described that lymph node metastases are significantly more frequent in HER2-low carcinomas than in HER2-negative carcinomas (32,35,36). Lymph node status of DE tumors is more debated with studies, including ours, finding no significant difference with other groups (37) and others finding more node invasion in DE carcinomas compared to 0+ and 1+ carcinomas (38–40) and in amplified carcinomas compared to DE tumors (41). A modified Elston and Ellis SBR histopronostic grade intermediate between HER2-negative and HER2-positive cancers has been described (32,33,35,36,42), which is consistent with our results highlighting a significant difference between the grades of HER2-low and HER2-positive carcinomas. This seems to be partly explained by the presence of a significantly lower mitotic score and mitotic index than HER2-positive tumors in our cohort. Indeed, Ki67 proliferation index appears higher in HER2-low compared to HER2-negative (35), and we show in our study a lower Ki67 in HER2-low cancers than in HER2-positive ones. However, these data are discordant. Li and al, Tarantino and al and Schettini and al (32,34,43) do not find significant data while Denkert and al (44) find a

higher index in HER2-negative ($p<0.0001$), corroborated by Zhang and al (33). Rossi and al (36) showed a higher expression of the proliferation index in HER2 2+ NA carcinomas than in HER2 0+ and 1+ carcinomas. DE carcinomas show an increase in mitoses and Ki67 proliferation index with HER2 amplification status (37,38,45), significant in our cohort between DE and HER2 0+ and 1+ carcinomas. Therefore, histopronostic grade SBR modified by Elston and Ellis presented also an intermediate place between 0+, 1+, 2+ NA and 2+ WA, 3+ groups (38,41,46), which we also find. Finally, we found similar TILs rates between the different groups in HER2-low and DE groups, in agreement with the results of Schettini and al, Denkert and al and Wang and al (32,44,46).

Due to the exclusivity of our DE carcinomas to be HR+, we chose to select only HR+ carcinomas. However, this is consistent with the whole studies of HER2-low carcinomas that report a large majority HR+ status (32,33,35,36,42,47). Modi and al (10) conducted the princeps study on efficacy of Trastuzumab-Deruxtecan in metastatic HER2-low carcinoma and found 87% HR+. Agostinetto and al (48) performed a retrospective observational study of all HER2-low carcinomas identified in TCGA (The Cancer Genome Atlas), which represents 51% of tumors enrolled ($n=410$), and found 336 HR+ cancers, or 82% in total, in agreement with the data of Tarantino and al (34), which showed 85% of HR+ tumors compared with 71% in HER2-negative tumors ($p=0.005$). In Li's study (43), the proportion of HR+ tumors was significantly higher in HER2-low than in HER2-negative tumors (77.8% vs. 69.2%, $p<0.001$), even more so in tumors with IHC 2+ staining (82.9%). Regarding DE carcinomas, the majority profile described in the literature is in agreement with the one we found with a predominant HR+ status (40,45,46,49,50). Finally, no difference in clinico-pathological features was found between HER2-low and HER2-negative HR+ tumors in Zhang and al (33) on a cohort of 87 HER2-low breast cancers, which is consistent with our data.

Prognosis of HER2-low versus HER2-negative and HER2-positive tumors is debated in the literature with controversial results. Some studies highlight an intermediate prognosis of HER2-low between HER2-negative and HER2-positive (35,38,42,46). Others describe a better prognosis of HER2-low cancers compared to HER2-negative ones linked to longer survival (43,44). Some find no difference in survival between HER2-low and HER2-negative groups (32,34,37,40,45,51). Prognosis also varies according to HR status with a better prognosis in case of positive status (43,48). The same is true for treatment response as the efficacy of T-DXd seems to differ according to HR status: the objective response rate (ORR) of HER2-low

HR+ tumors is better than in case of HR- status and similar between HER2-low 1+ and 2+ tumors (10).

This would suggest heterogeneity within HER2-low tumors, notably related to hormonal status, although their profile tends towards a less aggressive behavior compared to HER2-positive tumors, with a clinico-pathological profile very similar to HER2-negative cancers.

The same trend seems to emerge for DE tumors which tend to be closer to non-amplified carcinomas than to amplified carcinomas from a clinico-biological and prognostic point of view, while maintaining an intermediate profile.

Today, in addition to classical histological analysis, molecular and transcriptomic data are becoming increasingly important in breast cancer treatment. Currently, the biology of HER2-low breast cancers remains poorly understood and the analysis of their genomic profile is still under investigation. It remains unclear whether HER2-low cancers have a distinct biological profile from HER2-negative cancers and are an independent prognostic factor.

Recently, study of prognostic molecular signatures by PAM50 has been performed by two teams, finding discordant results according to hormonal status. Schettini and al and Agostinetto and al (32,48) found heterogeneous signatures in HER2-low group with luminal A (representing 50-60% of HER2-low), luminal B (25-30% approximately), basal-like (13-18%) and finally HER2-enriched (3-4%) profiles. More precisely, Schettini and al (32) demonstrated a differential distribution of certain genes between HER2-low and HER2-negative tumors with a significant upregulation of luminal genes associated with a downregulation of basal-like proliferation genes in HER2-low tumors compared to HER2-negative tumors. This difference was maintained in HR+ tumors. In contrast, Agostinetto and al (48) found a significant difference between HER2-low and HER2-negative HR- cancers while the result was nonsignificant in the HR+ subgroup, supporting similar biology between HER2-low HR+ and HER2-negative HR+ tumors. More recently, Zhang and al (33) used two different molecular tests: MammaPrint (a 70-gene risk of recurrence assay) and BluePrint (a 80-gene molecular subtyping assay) and found a similar molecular profile with a majority of HER2-low luminal A tumors (65.5%), followed by luminal B (28.8%), basal-like (4.6%) and HER2-enriched (1.1%). No results were significant after adjustment for hormonal status, positive and negative.

PIK3CA mutations are present in approximately 25-45% of luminal A and B cancers, whereas they account for only 9% of carcinomas classified as basal-like (52). Our mutation

rate is significantly higher in HER2-low than in HER2-positive cancers (27 mutations 43.5% vs 5 mutations 11.6%), without significant difference between HER2-low and WA tumors. Concerning DE carcinomas, 8 PIK3CA mutations (36.4%) were observed against only one in the HER2 3+ group, most occurred in cancers with reassuring clinico-pathological data (small size pT1, absence of lymph node metastasis pN0, absence of vascular emboli and low histopronostic grades). Most meta-analyses note a strong tendency for PIK3CA-mutated carcinomas to have a HER2-negative HR+ phenotype (53–56). However, few studies specifically addressing PIK3CA mutations in HER2-low carcinomas have been found. These mutations are consistently described as a favorable prognostic factor: low histopronostic grade SBR modified by Elston and Ellis (55–59), occurrence at advanced age (56,58), absence of lymph node invasion (56,58), small tumor size (55,56,60), and low proliferation index (Ki67) (55,61). These parameters agreed with ours, in favor of a rather low-grade clinico-pathological profile of PIK3CA-mutated HER2-low carcinomas although these notions need to be confirmed on larger studies.

These good prognostic data were similar to those of HER2-negative carcinomas, which explains the lack of significant difference between the two groups with similar mutational rates in our study. However, other studies point to a more pejorative character with significant associations between PIK3CA mutations and aggressive factors such as high grade (62), strong Ki67 index (62), N+ status (62,63), presence of neoplastic vascular emboli (62) and increased tumor size (59,62,64). Survival data are also variable between teams with significantly shorter recurrence-free survivals in case of PIK3CA mutations (62,64) while other authors present a better overall survival (56,58,65,66) associated with a longer time from primary tumor to metastasis. Denkert and al (44) found a significant difference in the prevalence of PIK3CA mutations between the HER2-negative and HER2-low groups (16.3% and 24.8% respectively, $p=0.018$), with no significant result in the HR+ subgroup, a trend that we also found without significant link.

Regarding TP53 mutations, Denkert and al (44) unexpectedly found a reduced number of mutations in HER2-low cases compared to HER2-negative, including in HR+ subgroup. Our results show a similar rate of TP53 mutations between these two groups, significantly different from HER2-positive and WA. These mutations interested more aggressive profiles than the average HER2-low carcinomas (Elston and Ellis modified SBR histopronostic grades II and III and higher Ki67 proliferation indexes). These results require further studies to better characterize their mutational background which seems to differ. However, a low number of

TP53 mutations could partly explain the better survival of HER2-low tumors. This supports the hypothesis of a very similar molecular profile between HER2-low and HER2-negative tumors and more distant between HER2-low and HER2-positive cancers. For DE carcinomas, a single TP53 gene mutation appeared that did not allow a specific molecular profile to be drawn up.

We found no significant difference on AKT1 and PTEN mutations between groups, which can be explained by the low rate of mutations present. AKT1 mutation is described as having a poor prognosis (67–69) linked to resistance to different therapies, including hormonal therapy by activation of MAPK pathway (EGFR and KRAS mutations) (52). Similarly, PTEN mutation induces stimulation of tumor development with more aggressive behavior (70,71) and presence of BRCA1/2 mutations was described as more frequent in HER2-negative cancers compared to HER2-low cancers in GeparOcto trial (44). A larger cohort of HER2-low cancers would be needed to study the prognostic significance of these mutations.

Given that majority of HER2-low tumors are HR+, the development of hormone resistance via the previously described mutations could be increased. Moreover, PIK3CA mutations and underlying signaling pathway involving AKT1 and mTOR are linked to resistance to chemotherapy, hormonal therapy (60,68,72,73) and to anti-HER2 targeted therapies (74–76). It would be interesting to better characterize the proportion of PIK3CA activating mutations in HER2-low cancers as well as to study the efficacy of inhibitory treatments of this pathway (pan-PI3K inhibitor such as Buparlisib; α -PI3K isoform specific inhibitor such as alpelisib and taselisib (77); AKT inhibitor...). Indeed, the literature review conducted by Mollon and al (78) highlighted an improvement in prognosis of PIK3CA-mutated carcinomas in terms of progression-free survival in case of combination therapy involving hormonal therapy and a PI3K-targeted tyrosine kinase inhibitor. Similarly, other studies have focused on this therapeutic approach with development of pan-PI3K inhibitor (inhibitor of all 4 PI3K class I isoforms: α to δ), α -isoform specific inhibitor (anti- α PI3K: alpelisib, taselisib) or AKT inhibitor (79–81) which could be useful in this situation.

Because of genomic heterogeneity within HER2-low breast cancers, it is interesting to investigate transcriptomics to better understand this category.

First, we analyzed the *ERBB2* mRNA expression profile. Our results show an increasing expression between the 5 immunohistochemical groups of HER2 amplification/hyperexpression. This analysis therefore accurately reflects the results of our IHC technique and serves as an internal control to validate our classification into the different tumor groups. DE cancers have a level of *ERBB2* expression very close to WA tumors, thus correlating transcriptomic expression with IHC 2+ protein staining. In addition, quantitative measurement of *ERBB2* mRNA expression levels could allow for more accurate definition of HER2 status without inter-observer variability and thus have a place in the determination algorithm.

Furthermore, we found heterogeneous expression levels within HER2-low and HER2-positive carcinomas. This can be explained by analysis of the 5 separate groups which shows that WA and HER2 3+ tumors have very different expression levels and therefore not homogeneous within HER2-positive category. Same results are found between HER2 1+ and DE tumors for HER2-low category. These data do not allow to find a specific expression profile for new HER2 classification's groups. In addition, we could not demonstrate a significant difference between HER2-low and HER2-negative tumors. This can be explained by a lack of power of our study, related to a small number of patients. Indeed, Schettini and al (32) compared *ERBB2* mRNA expression level between HER2-low and HER2-negative HR+ tumors and reported a higher level in HER2-low, and notably higher in 2+ than 1+. Similarly, Marchio and al (42) found a significantly higher expression level in HER2-low tumors than in HER2-negative tumors, with increasing levels between 1+ and 2+. Agostinetto and al (48) described similar results with a significantly higher *ERBB2* mRNA expression level in HER2-low than in HER2-negative tumors, and higher in HR+ than in HR- tumors. These results may suggest a better response to new therapies in HER2-low 2+ (2+ NA and DE tumors) due to the need of some HER2 expression degree for treatment anchoring to cell surface.

Finally, analysis of *ERBB2* expression level according to the mutation status on PI3K-AKT pathway shows a decrease of *ERBB2* expression in case of activating mutation. This is explained by very high proportion of HER2-negative and HER2-low tumors in mutated carcinomas.

Next, we analyzed transcriptomic profiles on different intracellular signaling pathways according to HER2 status, by RNA-seq to quantify gene expression. It was found that HER2-low tumors were intermediate between HER2-negative and HER2-positive groups, but closer to HER2-negative cancers. However, this notion must be qualified because of the presence of two different populations that appeared on transcriptomic profiles of the three signaling pathways analyzed. Indeed, HER2-low cancers are composed of DE carcinomas which seem to be closer to WA tumors and HER2 1+ carcinomas which tend to be closer to HER2 0+ tumors. Thus, different biological profiles within HER2-low group are highlighted, without a transcriptomic cluster specific to this category. HER2-positive carcinomas are distinguished from HER2-low and HER2-negative cancers by the presence of HER2 3+ cancers, which show their own transcriptomic behavior, i.e. expressing genes different from the other groups, including WA cancers. Results were more straightforward for PI3K-AKT and MAPK pathways than for JAK-STAT pathway due to the lower number of genes involved. Analysis of global expression on pathway genes shows the same data. There is a decreasing gradient of activation of different intracellular signaling pathways, inversely correlated to HER2 amplification (lower activation in HER2-positive group). Indeed, HER2 0+ and 1+ tumors show similar activation of the three biological pathways related to the expression of the same genes. DE and WA carcinomas show comparable results.

In total, three groups of breast carcinomas appear to be emerging that are different from the new HER2 classification: a HER2 0+ and 1+ group; a DE and WA group; and a HER2 3+ group. The activation of signaling pathways does not seem to depend only on HER2 amplification status but also on other mechanisms, notably related to the presence of activating mutations involved downstream in these different pathways.

Indeed, our secondary analyses focused only on activating mutations of PI3K-AKT pathway find a stronger activation of biological pathways in case of mutations. This activation seems to be more intense and more efficient than the presence of HER2 amplification/hyperexpression alone. We found three transcriptomic groups (HER2 0+ and 1+; DE and WA; 3+) that have different mutational rates. HER2 0+ and 1+ tumors have a high rate in favor of a strong activation of PI3K-AKT signaling pathway, in absence of HER2 amplification. HER2 3+ tumors have a low mutational prevalence. They then present a phenotypic profile related to a different gene expression than the other groups, secondary to HER2 amplification alone, and activate the different biological pathways less strongly than mutated tumors. The phenotypic differences in tumor cells can therefore be explained in part by the number of

HER2 receptors on cell surface but also by their genomic status. HER2-low cancers showed a heterogeneous transcriptomic profile on PI3K-AKT pathway, secondary to the presence of an activating mutation: mutated HER2-low cancers behaving as HER2-negative tumors and non-mutated HER2-low cancers behaving rather as HER2-positive tumors.

This highlights diversity of HER2-low carcinomas and their mechanisms involved in intracellular signaling. Presence of an activating mutation in PI3K-AKT pathway seems to discriminate transcriptomic profile and thus tumor behavior of HER2-low and HER2-negative tumors. In majority of cases, the presence of a mutation in these two groups allows activation of the underlying signaling pathway and influences downstream gene expression through mechanisms independent of HER2 amplification at cell surface. However, no studies were found that looked at transcriptomic profiles of HER2-low carcinomas on these different biologicals signaling pathways to corroborate this.

These data have many therapeutic implications. Current anti-HER2 therapies target HER2 receptor at cell surface. Leading Trastuzumab has several mechanisms of action, including HER2 degradation, inhibition of MAPK signaling pathway and of cell cycle progression, suppression of PI3K-AKT pathway, and ADCC-related role. NK cells recognize tumor cells that are coated by Trastuzumab via HER2 receptor and induce cell death (8). These mechanisms of action have not been shown to be sufficiently effective on HER2-low carcinomas, especially PIK3CA mutated ones. This could be explained by the absence of HER2 amplification but also by the presence of more intense activation of HER2-dependent signaling pathways secondary to activating mutations within them. New treatments currently in randomized phase III trials include topoisomerase I inhibitors, which are intercalating agents that inhibit DNA synthesis by inserting themselves between two adjacent bases and thereby causing structural changes that prevent transcription and replication of DNA. These treatments require a low expression of HER2 on cell surface to allow it to bind and target tumor cell. After binding, the complex is internalized to induce cell death by apoptosis. Because of HER2 supra-physiological expression in HER2-low carcinomas, this type of treatment appears promising and that independently of PIK3CA mutation. In addition, presence of elevated PIK3CA mutation in HER2-low tumors may raise questions about efficacy of inhibitors of this pathway (PI3K inhibitors).

However, our study has some limitations. It is a retrospective monocentric design, with associated potential biases. However, to our knowledge, this is the first study focused on comparison of molecular and transcriptional profiles of HER2-low breast tumors, analyzing the main intracellular signaling pathways related to HER2. Further studies with larger cohorts would be needed to support transcriptomic data of HER2-low breast cancers.

CONCLUSIONS

In this study, we investigated HER2-low carcinomas, an emerging entity representing more than half of all breast cancers. This emergence is secondary to appearance of new therapeutic strategies that could be effective on this group but not on HER2-negative. Therefore, we wanted to characterize this group clinico-pathologically and molecularly and we took the opportunity to also look at DE tumors. We have seen that HER2-low tumors present histopathological and molecular characteristics close to HER2-negative tumors. Transcriptomic profiles of these two groups of cancers depend largely on the presence of an activating mutation in PI3K-AKT pathway. Majority of these carcinomas have a mutation causing strong activation of all three intracellular signaling pathways. Presence of an activating mutation at this level, downstream of HER2 receptor, appears to be more important in determining tumor behavior than HER2 amplification status. It is known that presence of a PIK3CA mutation implies resistance to hormonal therapy and to classical anti-HER2 therapies. These data could help to explain differences in efficacy of conventional and innovative treatments, including new antibody-drugs conjugates (T-DXd and Trastuzumab-Duocarmazine) in mutated tumors (HER2-negative and HER2-low). They also raise the question of the place of PI3K-AKT pathway inhibitors in these HER2-low tumors.

DECLARATIONS

Ethics approval: The study was approved by CGFL Research Ethics Committee. CGFL has been authorized to conduct scientific research by relevant French authorities (authorization number AC-2019-3531).

Availability of data and materials: All data analyzed in this study are included in this article or in the associated additional files.

Disclosures: The authors declare that they have no competing interests.

Funding: The authors do not declare any grant specific for this research from any funding agency from the public, private, or not-for-profit sector.

Authors' contributions: CA and LA designed the study. FB, CCB, AnB, SL, CJ and ID provided the patient data. CA, RB and LA performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. RB and CR were responsible for molecular experiments and analysis. AuB was responsible for statistical analysis and final interpretation. CA and LA supervised the research. All authors revised the final version of the manuscript.

CONCLUSIONS SIGNEES

THESE SOUTENUE PAR Mlle ANDRÉ Céline

CONCLUSIONS

Les carcinomes mammaires sont les cancers les plus fréquents chez la femme dans le monde. Ils possèdent au sein de leur arsenal thérapeutique des thérapies ciblées visant la glycoprotéine HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) dont ils peuvent bénéficier en fonction de leur statut d'amplification et/ou d'hyperexpression du proto-oncogène HER2. Ce statut est déterminé en première intention par technique immunohistochimique (IHC) afin de détecter une surexpression protéique, complétée par technique d'hybridation *in situ* (HIS) en cas de marquage 2+, permettant la détection d'une amplification génique. Ces deux méthodes ont permis jusqu'à maintenant de classer ces cancers en statut HER2 négatif (0+, 1+ et 2+ non amplifié) ou positif (2+ amplifié et 3+).

Toutefois, cette classification dichotomique a connu un changement de paradigme récent avec l'avènement de nouveaux traitements anti-HER2 correspondant à des anticorps drogues conjuguées (Trastuzumab-Deruxtecan, Trastuzumab-Duocarmazine) qui semblent être efficaces sur une partie des tumeurs HER2 négatives, nommées « *HER2-low* ». Ces cancers regroupent les classes HER2 1+ et 2+ non amplifiées en HIS (groupes 2, 4 et 5 selon les recommandations internationales de l'ASCO/CAP mises à jour en 2018). Ils s'opposent désormais aux cancers « *HER2-negative* » (marquage 0+ en IHC) et « *HER2-positive* » (marquage 3+ en IHC et 2+ amplifié en HIS : groupes 1 et 3 selon l'ASCO/CAP).

A la lumière de ces résultats thérapeutiques prometteurs, nous avons collecté 62 tumeurs « *HER2-low* » (20 tumeurs 1+ et 2+ non amplifiées et 22 tumeurs double-équivoques) au sein du centre de lutte contre le cancer CGFL à Dijon, entre 2007 et 2021, afin de les comparer à 20 tumeurs « *HER2-negative* » et 43 tumeurs « *HER2-positive* » (20 carcinomes HER2 2+ amplifiés et 23 carcinomes 3+). A noter que les tumeurs 2+ amplifiées en HIS comportaient un nombre de copies du gène HER2 entre 6 et 10 (faiblement amplifié). Cette étude comparative avait pour but de mieux caractériser cette catégorie émergente (« *HER2-low* »), d'un point de vue :

- Clinicopathologique avec recueil des caractéristiques cliniques, morphologiques et pronostiques, après appariement selon le statut immunohistochimique hormonal positif (RH+),
- Moléculaire avec recherche des profils génomiques de chaque groupe par séquençage de l'ADN nouvelle génération (NGS – Next Generation Sequencing) intéressant plus spécifiquement les gènes PIK3CA, AKT1, PTEN, TP53, BRCA1 et 2, PALB2, ARID1A, KRAS, NRAS et BRAF,
- Transcriptomique par séquençage de l'ARN avec description des voies de signalisation intracellulaire les plus spécifiques aux carcinomes mammaires : voie PI3K-AKT, voie MAPkinase et voie JAK-STAT.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence un profil clinico-pathologique moins agressif des carcinomes « *HER2-low* » par rapport aux carcinomes « *HER2-positive* » caractérisé par un grade histopronostique SBR modifié par Elston et Ellis plus bas, notamment lié à une prolifération tumorale plus faible (score de mitoses, index mitotique et index de prolifération par le Ki67). Ces données étaient également retrouvées entre les tumeurs « *HER2-low* » et les tumeurs faiblement amplifiées seules. Aucune différence significative entre les groupes « *HER2-low* » et « *HER2-negative* » n'a été retrouvée permettant de mettre en lumière un profil histopathologique similaire.

L'analyse moléculaire a pu révéler des profils génomiques différents entre les groupes « *HER2-low* » et « *HER2-positive* ».

En ce qui concerne le gène PIK3CA, les carcinomes « *HER2-low* » présentaient un taux mutationnel significativement plus élevé que les cancers « *HER2-positive* », sans différence entre les cancers « *HER2-low* » et faiblement amplifiés d'une part et les cancers « *HER2-low* » et « *HER2-negative* » d'autre part. Au total, il a été mis en évidence de façon significative une augmentation de la prévalence mutationnelle corrélée à l'absence d'amplification et/ou d'hyperexpression du gène ERBB2. Au sein des carcinomes « *HER2-low* », ces mutations surviennent majoritairement au sein de tumeurs présentant des caractéristiques histopronostiques favorables (grade histopronostique d'Elston et Ellis faible -grade I-, petite taille tumorale, absence d'envahissement ganglionnaire et/ou vasculaire et index de prolifération bas).

En ce qui concerne le gène TP53, nous avons mis en évidence une augmentation du taux mutationnel dans les tumeurs « *HER2-positive* », significativement plus élevé que dans les tumeurs « *HER2-low* ». Au sein des cancers « *HER2-low* », ces mutations ont intéressé des tumeurs aux caractéristiques clinicopathologiques associées à moins bon pronostic (grade histopronostique d'Elston et Ellis plus élevé -grades II et III- et index de prolifération haut). Cette différence significative se maintenait entre les carcinomes « *HER2-low* » et les carcinomes faiblement amplifiés seuls.

Aucune différence entre les groupes n'a été mise en évidence pour les autres gènes.

L'analyse transcriptomique n'a pas pu intéresser les cancers HER2 2+ non amplifiés pour lesquels un nouveau séquençage est en cours. Elle a toutefois mis en évidence une expression en ARNm ERBB2 croissante entre les groupes avec une expression significativement plus élevée au sein des carcinomes « *HER2-positive* » et notamment HER2 3+. Toutefois, cette expression est similaire entre les tumeurs « *HER2-low* » et HER2 2+ faiblement amplifiées, en faveur d'une bonne corrélation du marquage immunohistochimique 2+. L'analyse du transcriptome complet retrouve un gradient des tumeurs « *HER2-negative* » à « *HER2-positive* », où les carcinomes « *HER2-low* » présentent un profil transcriptomique intégral intermédiaire et transitionnel entre les tumeurs « *HER2-negative* » et « *HER2-positive* ». Les tumeurs « *HER2-positive* » présentent une expression génique propre avec un profil spécifique. Toutefois, l'analyse des trois principales voies de signalisation intracellulaire liées à HER2 (PI3K-AKT, JAK-STAT et MAPKinase) met en évidence un profil hétérogène des carcinomes « *HER2-low* » où les tumeurs HER2 double-équivoque et HER2 1+ se positionnent de manière différente. Les cancers HER2 double-équivoque et 2+ faiblement amplifiés

présentent un profil transcriptomique très proche et se positionnent de la même manière pour former un cluster d'expression génique alors que les tumeurs HER2 1+ et « *HER2-negative* » présentent des profils transcriptomiques multiples et hétérogènes, sans formation de cluster d'expression de gènes. Les carcinomes HER2 3+ présentent un profil transcriptomique à part, très différent des autres groupes avec une expression spécifique de certains gènes sur toutes les voies les distinguant des autres. Au total, les carcinomes « *HER2-low* » apparaissent hétérogènes, en faveur d'une biologie différente des groupes les constituant. De plus, il existe une différence d'expression globale entre les pathways liée à la présence de mutations, notamment PIK3CA, ayant une influence significative sur l'activation des voies biologiques, malgré l'absence d'amplification HER2. En effet, les tumeurs « *HER2-negative* » et « *HER2-low* » ont un taux élevé de mutations PIK3CA entraînant une activation de la voie de signalisation impliquée, plus élevée que celles des tumeurs « *HER2-positive* ».

Ainsi, l'ensemble de ces caractéristiques prône en faveur d'un profil proche entre les carcinomes « *HER2-low* » et « *HER2-negative* ». A l'opposée, les tumeurs « *HER2-positive* » semblent être un groupe à part avec des profils génomiques et transcriptomiques spécifiques, principalement secondaires aux caractéristiques des cancers HER2 3+. Les tumeurs « *HER2-low* » et « *HER2-negative* » présentent des taux mutationnels PIK3CA élevé, associés à une activation forte des voies de signalisation sous-jacentes, qui pourraient permettre d'expliquer les différences d'efficacité des traitements anti-HER2, conventionnels et émergents, tels que le Trastuzumab-Deruxtecan et le Trastuzumab-Duocarmazine. Des investigations supplémentaires seront nécessaires afin d'expliquer l'efficacité des nouvelles stratégies thérapeutiques.

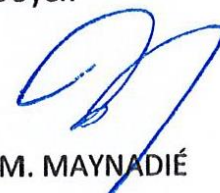
Le Président du jury,

Pr. L MARTIN



Vu et permis d'imprimer
Dijon, le 23 AVRIL 2022
Le Doyen

Pr. M. MAYNADIÉ



REFERENCES

1. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2011 Oct 6;365(14):1273–83.
2. Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, Procter M, Goldhirsch A, de Azambuja E, et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *The Lancet*. 2017 Mar;389(10075):1195–205.
3. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE, et al. Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer: Planned Joint Analysis of Overall Survival From NSABP B-31 and NCCTG N9831. *JCO*. 2014 Nov 20;32(33):3744–52.
4. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, Booser DJ, Thomas ES, Theriault RL, et al. Significantly Higher Pathologic Complete Remission Rate After Neoadjuvant Therapy With Trastuzumab, Paclitaxel, and Epirubicin Chemotherapy: Results of a Randomized Trial in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Operable Breast Cancer. *JCO*. 2005 Jun 1;23(16):3676–85.
5. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *JCO*. 2013 Nov 1;31(31):3997–4013.
6. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2018 May 30 [cited 2020 Dec 19]; Available from: <http://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/jco.2018.77.8738>
7. Franchet C, Djerroudi L, Maran-Gonzalez A, Abramovici O, Antoine M, Becette V, et al. Mise à jour 2021 des recommandations du GEFPICS pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers infiltrants du sein en France. *Annales de Pathologie*. 2021 Nov;41(6):507–20.
8. Arnould L, Arveux P, Couturier J, Gelly-Marty M, Loustalot C, Ettore F, et al. Pathologic Complete Response to Trastuzumab-Based Neoadjuvant Therapy Is Related to the Level of HER-2 Amplification. *Clinical Cancer Research*. 2007 Nov 1;13(21):6404–9.
9. Choi JH, Jeon CW, Kim YO, Jung S. Pathological complete response to neoadjuvant trastuzumab and pertuzumab therapy is related to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) amplification level in HER2-amplified breast cancer. *Medicine*. 2020 Nov 13;99(46):e23053.
10. Modi S, Park H, Murthy RK, Iwata H, Tamura K, Tsurutani J, et al. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Low–Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study. *JCO*. 2020 Jun 10;38(17):1887–96.
11. Banerji U, van Herpen CML, Saura C, Thistlethwaite F, Lord S, Moreno V, et al. Trastuzumab duocarmazine in locally advanced and metastatic solid tumours and HER2-

- expressing breast cancer: a phase 1 dose-escalation and dose-expansion study. *The Lancet Oncology*. 2019 Aug;20(8):1124–35.
12. AJCC Cancer Staging Manual [Internet]. [cited 2022 Apr 23]. Available from: <http://link.springer.com/book/9783319406176>
 13. Board WC of TE. Breast Tumours [Internet]. [cited 2022 Apr 23]. Available from: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Breast-Tumours-2019>
 14. 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 Nov;19(5):403–10.
 15. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of Oncology*. 2015 Feb;26(2):259–71.
 16. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *JCO*. 2020 Apr 20;38(12):1346–66.
 17. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:13033997 [q-bio] [Internet]. 2013 May 26 [cited 2022 Apr 23]; Available from: <http://arxiv.org/abs/1303.3997>
 18. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010 Sep;20(9):1297–303.
 19. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011 May;43(5):491–8.
 20. Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. *Current Protocols in Bioinformatics* [Internet]. 2013 Oct [cited 2022 Apr 23];43(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471250953.bi1110s43>
 21. Picard Tools - By Broad Institute [Internet]. [cited 2022 Apr 23]. Available from: <https://broadinstitute.github.io/picard/>
 22. Muller E, Goardon N, Brault B, Rousselin A, Paimparay G, Legros A, et al. OutLyzer: software for extracting low-allele-frequency tumor mutations from sequencing background noise in clinical practice. *Oncotarget*. 2016 Nov 29;7(48):79485–93.
 23. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 2010 Sep 1;38(16):e164–e164.
 24. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3. *Fly*. 2012 Apr;6(2):80–92.
 25. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. [cited 2022 Apr 23]. Available from:

<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

26. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078–9.
27. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015 Oct 1;btv566.
28. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016 Oct 1;32(19):3047–8.
29. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*. 2016 May;34(5):525–7.
30. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014 Dec;15(12):550.
31. Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*. 2013 Dec;14(1):7.
32. Schettini F, Chic N, Brasó-Maristany F, Paré L, Pascual T, Conte B, et al. Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low breast cancer. *npj Breast Cancer*. 2021 Dec;7(1):1.
33. Zhang H, Katerji H, Turner BM, Audeh W, Hicks DG. HER2-low breast cancers: incidence, HER2 staining patterns, clinicopathologic features, MammaPrint and Blueprint genomic profiles. *Mod Pathol [Internet]*. 2022 Feb 19 [cited 2022 Mar 5]; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41379-022-01019-5>
34. Tarantino P, Gandini S, Nicolò E, Trillo P, Giugliano F, Zagami P, et al. Evolution of low HER2 expression between early and advanced-stage breast cancer. *European Journal of Cancer*. 2022 Mar;163:35–43.
35. Eiger D, Agostinetti E, Saúde-Conde R, de Azambuja E. The Exciting New Field of HER2-Low Breast Cancer Treatment. *Cancers*. 2021 Mar 1;13(5):1015.
36. Rossi V, Sarotto I, Maggiorotto F, Berchiolla P, Kubatzki F, Tomasi N, et al. Moderate Immunohistochemical Expression of HER-2 (2 ϵ) Without HER-2 Gene Amplification Is a Negative Prognostic Factor in Early Breast Cancer. :8.
37. Xu B, Shen J, Guo W, Zhao W, Zhuang Y, Wang L. Impact of the 2018 ASCO/CAP HER2 guidelines update for HER2 testing by FISH in breast cancer. *Pathology - Research and Practice*. 2019 Feb;215(2):251–5.
38. Woo JW, Lee K, Chung YR, Jang MH, Ahn S, Park SY. The updated 2018 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline on human epidermal growth factor receptor 2 interpretation in breast cancer: comparison with previous guidelines and clinical significance of the proposed in situ hybridization groups. *Human Pathology*. 2020 Apr;98:10–21.
39. Bhattacharjee A, Rajendra J, Dikshit R, Dutt S. HER2 borderline is a negative prognostic factor for primary malignant breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2020 May;181(1):225–31.
40. Hoda RS, Brogi E, Xu J, Ventura K, Ross DS, Dang C, et al. Impact of the 2018 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Updates on

HER2 Assessment in Breast Cancer With Equivocal HER2 Immunohistochemistry Results With Focus on Cases With HER2/CEP17 Ratio ≤ 2.0 and Average HER2 Copy Number ≥ 4.0 and ≤ 6.0 . *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2020 May 1;144(5):597–601.

41. Bethune GC, Zanten DV van, MacIntosh RF, Rayson D, Younis T, Thompson K, et al. Impact of the 2013 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) testing of invasive breast carcinoma: a focus on tumours assessed as 'equivocal' for HER2 gene amplification by fluorescence in-situ hybridization. *Histopathology*. 2015;67(6):880–7.

42. Marchiò C, Annaratone L, Marques A, Casorzo L, Berrino E, Sapino A. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond. *Seminars in Cancer Biology*. 2021 Jul;72:123–35.

43. Li Y, Abudureheyimu N, Mo H, Guan X, Lin S, Wang Z, et al. In Real Life, Low-Level HER2 Expression May Be Associated With Better Outcome in HER2-Negative Breast Cancer: A Study of the National Cancer Center, China. *Front Oncol*. 2022 Jan 17;11:774577.

44. Denkert C, Seither F, Schneeweiss A, Link T, Blohmer JU, Just M, et al. Clinical and molecular characteristics of HER2-low-positive breast cancer: pooled analysis of individual patient data from four prospective, neoadjuvant clinical trials. *The Lancet Oncology*. 2021 Aug;22(8):1151–61.

45. Tong Y, Chen X, Fei X, Lin L, Wu J, Huang O, et al. Can breast cancer patients with HER2 dual-equivocal tumours be managed as HER2-negative disease? *European Journal of Cancer*. 2018 Jan;89:9–18.

46. Wang C, Tsang JY, Poon IK, Shao Y, Li JJ, Shea KH, et al. An Evaluation of Clinicopathological Correlation and Outcome of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Subgroups Reclassified According to the Latest ASCO/CAP Guideline. *Clin Breast Cancer*. 2021 May 17;S1526-8209(21)00133-6.

47. Tarantino P, Hamilton E, Tolaney SM, Cortes J, Morganti S, Ferraro E, et al. HER2-Low Breast Cancer: Pathological and Clinical Landscape. *JCO*. 2020 Jun 10;38(17):1951–62.

48. Agostinetti E, Rediti M, Fimereli D, Debien V, Piccart M, Aftimos P, et al. HER2-Low Breast Cancer: Molecular Characteristics and Prognosis. *Cancers*. 2021 Jun 5;13(11):2824.

49. Sneige N, Hess KR, Multani AS, Gong Y, Ibrahim NK. Prognostic significance of equivocal human epidermal growth factor receptor 2 results and clinical utility of alternative chromosome 17 genes in patients with invasive breast cancer: A cohort study: Equivocal HER2 Results in Breast Cancer. *Cancer*. 2017 Apr 1;123(7):1115–23.

50. Marchiò C, Dell'Orto P, Annaratone L, Geyer FC, Venesio T, Berrino E, et al. The Dilemma of HER2 Double-equivocal Breast Carcinomas: Genomic Profiling and Implications for Treatment. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2018 Sep;42(9):1190–200.

51. Gupta S, Neumeister V, McGuire J, Song YS, Acs B, Ho K, et al. Quantitative assessments and clinical outcomes in HER2 equivocal 2018 ASCO/CAP ISH group 4 breast cancer. *npj Breast Cancer*. 2019 Dec;5(1):28.

52. Crimini E, Repetto M, Aftimos P, Botticelli A, Marchetti P, Curigliano G. Precision medicine in breast cancer: From clinical trials to clinical practice. *Cancer Treatment Reviews*.

2021 Jul;98:102223.

53. Anderson EJ, Mollon LE, Dean JL, Warholak TL, Aizer A, Platt EA, et al. A Systematic Review of the Prevalence and Diagnostic Workup of PIK3CA Mutations in HR+/HER2–Metastatic Breast Cancer. *International Journal of Breast Cancer*. 2020 Jun 20;2020:1–16.
54. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *IJMS*. 2020 Dec 26;22(1):173.
55. Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *BCTT*. 2015 May;111.
56. Yang SX, Polley E, Lipkowitz S. New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2016 Apr;45:87–96.
57. Roy-Chowdhuri S, de Melo Gagliato D, Routbort MJ, Patel KP, Singh RR, Broaddus R, et al. Multigene Clinical Mutational Profiling of Breast Carcinoma Using Next-Generation Sequencing. *Am J Clin Pathol*. 2015 Nov 1;144(5):713–21.
58. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Aug 15;15(16):5049–59.
59. Tserga A, Chatziandreou I, Michalopoulos NV, Patsouris E, Saetta AA. Mutation of genes of the PI3K/AKT pathway in breast cancer supports their potential importance as biomarker for breast cancer aggressiveness. *Virchows Arch*. 2016 Jul;469(1):35–43.
60. and members of the Southeast Sweden Breast Cancer Group, Pérez-Tenorio G, Stål O. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer*. 2002 Feb;86(4):540–5.
61. Cuorvo LV, Verderio P, Ciniselli CM, Girlando S, Decarli N, Leonardi E, et al. PI3KCA mutation status is of limited prognostic relevance in ER-positive breast cancer patients treated with hormone therapy. *Virchows Arch*. 2014 Jan;464(1):85–93.
62. Aleskandarany MA, Rakha EA, Ahmed MAH, Powe DG, Paish EC, Macmillan RD, et al. PIK3CA expression in invasive breast cancer: a biomarker of poor prognosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jul;122(1):45–53.
63. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 2005 Apr 1;65(7):2554–9.
64. Li SY, Rong M, Grier F, Iacopetta B. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 Mar;96(1):91–5.
65. Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, Cotrupi S, Barassi F, Del Grammastro M, et al. Different Prognostic Roles of Mutations in the Helical and Kinase Domains of the *PIK3CA* Gene in Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2007 Oct 15;13(20):6064–9.
66. Pérez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjöld B, Rutqvist LE, et al. PIK3CA Mutations and PTEN Loss Correlate with Similar Prognostic Factors and Are Not Mutually Exclusive in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Jun 15;13(12):3577–84.
67. Hinz N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive

review. *Cell Commun Signal*. 2019 Dec;17(1):154.

68. Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, Oki E, Kataoka A, Ohno S, et al. Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer. *Breast Cancer*. 2006;13(2):137–44.
69. Spears M, Cunningham CA, Taylor KJ, Mallon EA, Thomas JSJ, Kerr GR, et al. Proximity ligation assays for isoform-specific Akt activation in breast cancer identify activated Akt1 as a driver of progression. *The Journal of Pathology*. 2012;227(4):481–9.
70. Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol*. 2001 Jul;14(7):672–6.
71. Bose S, Crane A, Hibshoosh H, Mansukhani M, Sandweis L, Parsons R. Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. *Hum Pathol*. 2002 Apr;33(4):405–9.
72. Araki K, Miyoshi Y. Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2018 Jul;25(4):392–401.
73. Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, et al. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *The Journal of Pathology*. 2005;207(2):139–46.
74. McAuliffe PF, Meric-Bernstam F, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Deciphering the Role of PI3K/Akt/mTOR Pathway in Breast Cancer Biology and Pathogenesis. *Clinical Breast Cancer*. 2010 Nov;10:S59–65.
75. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. A Functional Genetic Approach Identifies the PI3K Pathway as a Major Determinant of Trastuzumab Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2007 Oct;12(4):395–402.
76. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K Status. *The American Journal of Pathology*. 2010 Oct;177(4):1647–56.
77. Litton JK, Burstein HJ, Turner NC. Molecular Testing in Breast Cancer. :7.
78. Mollon LE, Anderson EJ, Dean JL, Warholak TL, Aizer A, Platt EA, et al. A Systematic Literature Review of the Prognostic and Predictive Value of PIK3CA Mutations in HR+/HER2–Metastatic Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. 2020 Jun;20(3):e232–43.
79. Ellis H, Ma CX. PI3K Inhibitors in Breast Cancer Therapy. *Curr Oncol Rep*. 2019 Dec 11;21(12):110.
80. Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011 Dec;13(6):224.
81. Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, Tran Dien A, Garberis I, Droin N, et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2020 Mar;31(3):377–86.

SUPPLEMENTARY DATA

SUPPLEMENTARY TABLE S1

Table S1. Antibodies and details of immunohistochemistry analyses performed in the present study

Antibodies	Clone	Dilution	Antigen retrieval	Detection Kit	Manufacturer	Automatic stainer	Staining pattern
ER	SP1	Prediluted	TBE pH 8.4	Ultraview DAB	Roche (Ventana)	Benchmark XT	Nuclear
PR	1E2	Prediluted	TBE pH 8.4	Ultraview DAB	Roche (Ventana)	Benchmark XT	Nuclear
HER2	4B5	Prediluted	TBE pH 8.4	Ultraview DAB	Roche (Ventana)	Benchmark XT	Membranous
Ki67	MIB-1	1/50	TBE pH 8.4	Ultraview DAB	Agilent (Dako)	Benchmark XT	Nuclear

ER: estrogen receptor; HER2: human epithelial growth factor receptor 2; PR: progesterone receptor; TBE: Tris-borate-EDTA.

SUPPLEMENTARY TABLE S2

Table S2. Details of FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) analyses performed in the present study



ZytoLight® SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe



Background

The ZytoLight® SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe is designed for the detection of ERBB2 gene amplification frequently observed in solid malignant neoplasms e.g. breast cancer samples. The ERBB2 gene (a.k.a. HER2 and NEU) is located in the chromosomal region 17q12 and encodes a 185-190 kDa transmembrane glycoprotein, p185, acting as a cellular growth factor receptor. The p185 protein belongs to the EGFR (epidermal growth factor receptor) subgroup of the RTK (receptor tyrosine kinase) superfamily also including EGFR (ERBB1, HER1), ERBB3 (HER3), and ERBB4 (HER4). Amplification of the proto-oncogene ERBB2, observed in approximately 20% of all breast cancer samples, has been correlated with a poor prognosis of the disease. Similar results have been obtained for a variety of other malignant neoplasms e.g. ovarian cancer, stomach cancer, and carcinomas of the salivary gland.

References

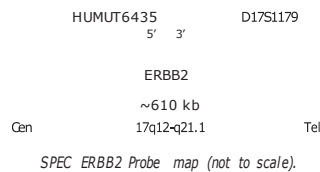
- Baselga J, et al. (1999) *Semin Oncol* 26: 78-83.
- Brockhoff G, et al. (2016) *Histopathology* 69: 635-46.
- Brunello F, et al. (2012) *Histopathology* 60: 482-8.
- Brunner K, et al. (2010) *Anal Quant Cytol Histol* 32: 78-89.
- Coussens L, et al. (1985) *Science* 230: 1132-9.
- Ettl T, et al. (2012) *Br J Cancer* 106: 719-26.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Hynes NE & Stern DF (1994) *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-84.
- Moelans CB, et al. (2011) *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 380-92.
- Park JB, et al. (1989) *Cancer Res* 49: 6605-9.
- Popescu NC, et al. (1989) *Genomics* 4: 362-6.
- Sassen A, et al. (2008) *Breast Cancer Res* 10: R2.
- Slamon DJ, et al. (1987) *Science* 235: 177-82.
- Voutsas IF, et al. (2013) *Int J Radiat Biol* 89: 319-25.
- Wolff AC, et al. (2018) *J Clin Oncol* 14: 437-41.

Probe Description

The SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe is a mixture of an orange fluorochrome direct labeled CEN 17 probe specific for the alpha satellite centromeric region of chromosome 17 (D17Z1) and a green fluorochrome direct labeled SPEC ERBB2 probe specific for the chromosomal region 17q12-q21.1 harboring the ERBB2 gene.



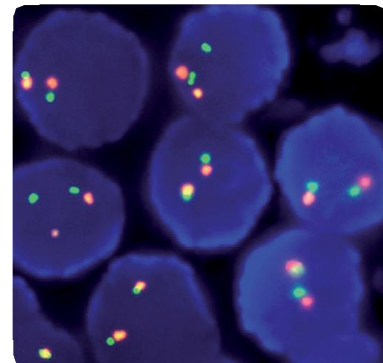
Ideogram of chromosome 17 indicating the hybridization locations.



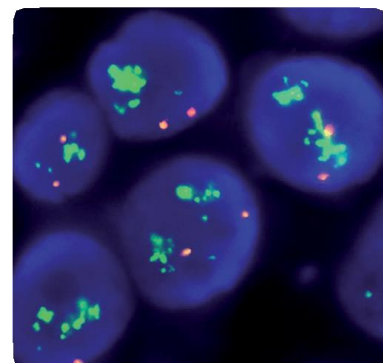
SPEC ERBB2 Probe map (not to scale).

Results

In a normal interphase nucleus, two orange and two green signals are expected. In a cell with amplification of the ERBB2 gene locus, multiple copies of the green signal or green signal clusters will be observed.



Normal interphase cells, ERBB2 (green), CEN 17 (orange).



Breast carcinoma tissue section, ERBB2 gene cluster (green), CEN 17 (orange).

Prod. No.	Product	Label	Tests* (Volume)
Z-2015-50	ZytoLight® SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe CE IVD	●/●	5 (50 µl)
Z-2015-200	ZytoLight® SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe CE IVD	●/●	20 (200 µl)
Z-2020-5	ZytoLight® SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit CE IVD Incl. Heat Pretreatment Solution Citric, 150 ml; Pepsin Solution, 1 ml; Wash Buffer SSC, 210 ml; Probe, 0.05 ml; 25x Wash Buffer A, 50 ml; DAPI/DuraTect-Solution, 0.2 ml	●/●	5
Z-2020-20	ZytoLight® SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit CE IVD Incl. Heat Pretreatment Solution Citric, 500 ml; Pepsin Solution, 4 ml; Wash Buffer SSC, 560 ml; Probe, 0.2 ml; 25x Wash Buffer A, 100 ml; DAPI/DuraTect-Solution, 0.8 ml	●/●	20

* Using 10 µl probe solution per test. CE IVD only available in certain countries. All other countries research use only! Please contact your local dealer for more information.

SUPPLEMENTARY TABLE S3

Table S3. Pathogenic variants of genes identified in the three groups by DNA-sequencing

Gene	Variants	Consequence	HER2-low	HER2-negative	HER2-positive
PIK3CA	p.(Arg108His)	Missense	1	0	0
	p.(Glu110del)	Deletion in frame	0	0	1
	p.(Glu365Lys)	Missense	0	0	1
	p.(Glu453Lys)	Missense	1	0	0
	p.(Glu542Gln)	Missense	1	0	0
	p.(Glu542Lys)	Missense	4	0	1
	p.(Glu545Lys)	Missense	2	3	1
	p.(Gly1049Arg)	Missense	1	0	0
	p.(Gly118Asp)	Missense	1	0	0
	p.(His1047Arg)	Missense	9	3	1
	p.(His1047Leu)	Missense	3	0	1
	p.(His450_Leu455del)	Deletion in frame	1	0	0
	p.(Lys111_Ile112delinsAsn)	Deletion in frame	1	0	0
	p.(Met1043Val)	Missense	0	1	0
	p.(Val105_Arg108del)	Deletion in frame	1	0	0
	p.(Val344Met)	Missense	0	1	0
p.(Val346Glu)	Missense	1	0	0	
AKT1	p.(Glu17Lys)	Missense	3	0	0
PTEN	p.(Arg378fs)	Deletion - Frameshift	0	0	1
TP53	c.920-2A>C	SNV intronic	0	0	1
	p.(Ser127Phe)	Missense	0	0	1
	p.(Arg213Arg)	Synonymous	0	0	1
	p.(Met133Lys)	Missense	0	0	1
	p.(Tyr236Asp)	Missense	0	0	1
	p.(Gly302fs)	Frameshift	0	0	1
	p.(Val272Met)	Missense	0	0	1
	p.(Arg337Cys)	Missense	0	0	1
	p.(Gln104*)	Nonsense	1	0	0
	p.(Ser185fs)	-	0	0	1
	p.(Tyr220His)	Missense	0	0	1
	p.(His179Arg)	Missense	0	0	1
	p.(His233del)	Deletion in frame	0	0	1
p.(Ile50HisfsTer2)	-	1	0	0	
BRCA2	p.(Ser1667*)	-	0	0	1
	p.(Val1283fs)	Frameshift	1	0	0
	c.8755-1G>T	Splice acceptor	1	0	0
	Tyr2601Trpfs*46	Splice donor protein truncated	0	0	1
ARID1A	p.(Gln200*) / p.(Pro225fs)	-	0	0	1
	p.(Leu657HisfsTer19)	-	1	0	0
BRCA1, KRAS, NRAS, BRAF	No mutation found				

SNV : single nucleotide variant

TITRE DE LA THESE : LES TUMEURS MAMMAIRES HER2-LOW : ANALYSE COMPARATIVE CLINICO-PATHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DE CETTE NOUVELLE ENTITE

AUTEUR : CELINE ANDRÉ

RESUME :

CONTEXTE: Les cancers du sein HER2-low sont une entité émergente avec l'avènement d'anticorps drogue conjugués. L'objectif de ce travail a été de les comparer aux cancers HER2-negative et HER2-positive.

METHODES: Il a été collecté 62 cancers HER2-low diagnostiqués entre 2007 et 2021 au CGFL, appariés sur le statut hormonal à 20 HER2-negative et 43 HER2-positive. Un recueil des données clinicopathologiques et des analyses moléculaires et transcriptomiques (DNA et RNA sequencing par NGS) ont été effectuées.

RESULTATS: Les cancers HER2-low ont des données histopronostiques favorables comparées aux HER2-positive: grade faible ($p=0.0034$) et scores de prolifération bas (score mitotique et Ki67 $p=0.0179$ et $p=0.0001$), de même que comparées aux HER2 2+ faiblement amplifiés. Ils ont aussi plus de mutations PIK3CA ($p=0.0079$) en faveur d'une augmentation du taux mutationnel corrélée à l'absence d'amplification HER2. Un résultat inverse est retrouvé pour les mutations TP53 ($p=0.0006$). Aucune différence mutationnelle n'existe entre les HER2-low et HER2-negative. L'analyse transcriptomique des HER2-low retrouve un profil hétérogène: double-équivoque et HER2 2+ faiblement amplifiés ont une expression génique proche; HER2 1+ ont un profil divers selon la présence d'une mutation PIK3CA, soulignant une hétérogénéité biologique. La mutation PIK3CA conduit à une plus forte activation des voies de signalisation que l'expression de HER2.

CONCLUSION: La nouvelle catégorie HER2-low présente des similarités histopronostiques, moléculaires et transcriptomiques avec les HER2-negative. Le taux mutationnel PIK3CA élevé sans amplification de HER2 pourrait expliquer l'inefficacité des anti-HER2 classiques.

MOTS-CLES : CANCER DU SEIN, HER2-LOW, HER2, IMMUNOHISTOCHIMIE, PROFIL MOLECULAIRE, PIK3CA, PROFIL TRANSCRIPTOMIQUE