

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA1



**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE VIE**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

***MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCES DE LA NATURE  
ET DE LA VIE***

**Spécialité :**

**BIOSIGNALISATION CELLULAIRE ET MOLECULAIRE, IMMUNOLOGIE**

**Présentée par**

**CHAMI Safia  
HADJ HAMDI Ibtissem**

**THEME**

**ETUDE DU CANCER DE SEIN TRIPLE NEGATIF ET L'INFILTRAT  
LYMPHOCYTAIRE AVANT ET APRES LA CHIMIOETHERAPIE  
NEOADJUVANTE**

Devant le jury composé de :

BENYAHYIA.A	Maitre assistant	examineur
CHERALLAH.A	Maitre de conférences classe B	présidente
KOUCHEKAR.A	Maitre de conférences classe A	promotrice
AISSANI.R	Maitre assistante	Co- promotrice

**Promotion : 2015 /2016**

## **REMERCIEMENTS**

On remercie ALLAH le tout-puissant de nous avoir donné le courage, la volenté et la patiente de mener à terme ce présent travail.

Tout d'abord de grands remerciements a Mr OUMOUNA M., le chef département de biologie à Médéa, qui m'a proposé un sujet très intéressant, et a Mr NASRI R., professeur à l'université de Médéa qui a su nous aiguiller de nous partager une partie de sa thèse de doctorat et partager aussi avec nous des articles ou contenues qu'il trouvait au gré de la navigation sur la toile.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promoteur Mme KOUCHKAR A. Docteur au CPMC qui a très volontiers accepté d'être le promoteur de ce projet. Sa grande connaissance dans le domaine, ainsi que son expérience, a joué un rôle important dans la conception de ce travail, de nous accompagner, nous conseiller et de nous guider avec le sourire tout au long de notre parcours.

Nous tenions également à remercier Mme AISSANI R., professeur à l'université de BLIDA 1 pour les études qu'elle nous a donné pendant deux années qu'on a passé avec elle et pour son encadrement tout au long de ces quelques mois de travail qu'on a continué d'apprendre d'eux.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos enseignants de l'université de BLIDA 1

Nous tenions a remercier également tout personnel du laboratoire d'anatomie pathologique pour les jours précieux passe à discuter d'engagement, de stratégie de marques, pour leur temps plus que précieux pris pour répondre à nos questions et nous avoir permis de réaliser ce stage dans un cadre agréable.

## DEDICACES

Je dédie ce mémoire :

A mes chers parents, baba qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.

A mes chers frères Mohamed, Yousef, bel Kassem, Abderrahmane qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A tout nouveau lignage et nouvel personnel qui m'aiment et que je les aime je vous dédie aujourd'hui ma réussite.

A mes tantes, oncles, cousins et cousines, neveux et nièces paternels et maternels

Et à mon binôme, pour son compagnon tout au long de notre parcours, avec de joies, de tristesse qu'on a partagé ensemble. Je lui souhaite tout le bonheur du monde.

A tous mes amies, En souvenir des années au primaire, au collège, au lycée, à la mosquée et à l'université ou on a partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent. A tous mes compagnons de promotion.

**Ibtissem**

## DEDICACES :

Je dédie ce modeste travail comme un geste de gratitude à :

L'âme de mon père : Belkacem, qui est toujours présent dans mon cœur, et qu'il soit aux paradis inchalah.

Ma très chère mère adorable : Zahra qui ma soutenue pendant toutes mes longues années d'études.

Je tiens a remercie mes très chères sœurs : Djamila, Salima, Fouzia, khalida

Mon cher frère : Mohamed, je te souhaite le bonheur et la réussite.

A mes grandes mères, et grands pères, à mes oncles et tantes.

Que dieu garde ma famille pour moi et me garde pour eux.

A une personne exemplaire, adorable à ma 5emme sœur la trop belle charmante

Ibtissem.

Aussi je tiens à remercier mes chères amies de cursus d'études ainsi qu'à mes sœurs de la cité 4.

Je remercie tous les personnes qui ont de près ou de loin m'aidé et m'aimé.

Un spéciale remerciement a une personne irremplaçable qui soutenu jusqu'au bout, qui a toujours été présente a mes cotés pour : m'aider ; m'encourager ; m'écouter et m'aimer... A

Ma mère

**SAFIA**

## Liste des figures

**Figure N°1 :** développement tumoral et immunosurveillance

**Figure N°2 :** Diagramme représentant la démarche expérimentale

**Figure N° 3:** Représentation graphique selon les tranches d'âges.

**Figure N°4 :** représentation graphique selon la taille tumorale

**Figure N°5 :** représentation graphique selon la classification TNM

**Figure N°6 :** Mastectomie avec curage axillaire

**Figure N° 7:** Tumorectomie muni d'un harpon (flèche).

**Figure N° 8:** Coupe histologique d'une réponse pathologique complète.

**Figure N°9 :** mastectomie avec reliquat (étoiles).

**Figure N° 10 :** mastectomie sans reliquat, zones de remaniements fibrohyalin (flèche).

**Figure N° 11 :** Tumorectomie sans reliquat tumorale (flèche).

**Figure N° 12:** Coupe histologique d'un carcinome canalaire infiltrant dans la biopsie HE.

**Figure N°13 :** Marquage immunohistochimique de l'infiltrat lymphocytaire CD3+.

**Figure N°14:** marquage immunohistochimique de l'infiltrat lymphocytaire CD20+ au niveau des microbiopsies.

**Figure N°15 :** marquage immunohistochimique de cellules lymphocytaires CD4+.

**Figure N°16 :** Marquage immunohistochimique a l'aide du CD8 montrant l'absence de cellules CD8+ en intra-tumorale.

**Figure N°17 :** Marquage immunohistochimique d'un infiltrat lymphocytaire CD3+ au niveau de la PO.

**Figure 18 :** Distribution des cellules lymphocytaire CD20+ au niveau des pièces opératoires.

**Figure N°19 :** marquage immunohistochimique de l'infiltrat lymphocytaire CD20+ au niveau de la PO.

**Figure N°20:** Distribution des cellules lymphocytaires CD4+ au niveau des pièces opératoires.

**Figure 21 :** marquage immunohistochimique d'un infiltrat lymphocytaire CD4+ de niveau 2+ en périphérie de la tumeur.

**Figure N° 22 :** marquage immunohistochimique de cellules lymphocytaires CD8+.

## **Liste des tableaux**

**Tableau N°1 :** Les caractéristiques générales des tumeurs TN

**Tableau N°2:** Les anticorps primaire utilisés

**Tableau N°3 :** Réponse histologique à la chimiothérapie

**Tableau N°4:** Niveaux d'infiltrations lymphocytaires au niveau des microbiopsies (avec et sans reliquat)

**Tableau N°5 :** les sous-populations de lymphocyte infiltrant la tumeur (avec reliquat)

**Tableau N°6:** Tableau récapitulative des différentes étapes pour confection des coupes

**Tableau N° 7:** Etape de coloration de l'hématoxyline-éosine.

## **Liste des graphes**

**Graphe N°1 :** distribution de l'infiltrat inflammatoire en situation périphérique dans la microbiopsie

**Graphe N° 2:** distribution de l'infiltrat inflammatoire au niveau du stroma dans de la biopsie

**Graphe N° 3:** distribution de l'infiltrat inflammatoire en situation périphérique au niveau des microbiopsies et des PO (avec reliquat)

**Graphe N° 4:** distribution de l'infiltrat inflammatoire du stroma tumoral au niveau des microbiopsies et des PO (avec reliquat)

**Graphe N°5 :** distribution des lymphocytes CD3+ au niveau des microbiopsies

**Graphe N° 6:** Distribution des cellules lymphocytaires CD20 + (microbiopsies)

**Graphe N° 7 :** Distribution des cellules lymphocytaires CD4 + (microbiopsies)

**Graphe N° 8 :** Distribution des cellules lymphocytaires CD8 + (microbiopsies)

**Graphe N° 9:** Distribution des cellules lymphocytaires CD3+ au niveau des pièces opératoires.

**Graphe N° 10:** Distribution des cellules lymphocytaires CD8+ au niveau des pièces opératoires.



## Résumé

Introduction: le cancer du sein est un problème de santé publique et sa prise en charge thérapeutiques reste pour certains sous types problématique.

Le cancer du sein triple négatif est un sous-type dont seul le traitement systémique est validé en particulier la chimiothérapie néoadjuvante vu sa chimiosensibilité.

Les cellules néoplasiques mammaires induisent les mécanismes suppresseurs de tumeur impliquant l'activation de cellules de l'immunité innée et adaptative, dans la situation où l'élimination est incomplète, l'inflammation devient chronique, ceci va favoriser la mise en place de mécanismes d'immunosuppression et les cellules cancéreuses sont capables d'échapper au contrôle immunitaire et de progresser rapidement dans l'organisme.

Le but de notre étude est de déterminer la corrélation de l'infiltrat lymphocytaire avec la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante.

Matériel et méthodes : Notre étude a intéressé 10 patientes avec un cancer du sein triple négatif ayant reçu des cures de chimiothérapies néoadjuvante.

Une analyse morphologique puis immunohistochimique à l'aide de certains anticorps (CD3, CD20, CD4, CD8) a été réalisée sur des microbiopsies et des pièces opératoires afin de quantifier l'infiltrat des cellules immunes et leur disposition dans le tissu tumoral. L'appréciation de cet infiltrat (cellules immunes en périphérie, dans le stroma tumoral, ou en intra-tumoral) s'est faite *via* une méthode semi-quantitative, ce qui nous a permis de révéler quatre niveaux d'infiltration.

Résultats : L'infiltration lymphocytaire est dans 50% des cas un infiltrat de niveau 1+ faible. Cet infiltrat est retrouvé de manière quasi-équivalente au niveau des microbiopsies et des pièces opératoires. Ce sont les microbiopsies sans reliquat tumoral qui ont un infiltrat plus important.

Mot clé : cancer de sien triple négatif

chimiothérapie néoadjuvante

L'infiltrat lymphocytaire

## **Abstract**

Introduction: breast cancer is a public health problem and its therapeutic management remains for certain subtypes problematic

Triple-negative breast cancer is a subtype of which only systemic therapy is validated especially neoadjuvant chemotherapy given its chemosensitivity

Mammary neoplastic cells induce tumor suppressor mechanisms involving the activation of cells of innate and adaptive immunity, in the situation where elimination is incomplete, inflammation becomes chronic, this will favor the establishment of mechanisms of Immunosuppression and cancer cells are able to escape immune control and progress rapidly in the body

The aim of our study is to determine the correlation of the lymphocyte infiltrate with the response to neoadjuvant chemotherapy

**MATERIAL AND METHODS:** Our study involved 10 patients with triple-negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy.

A morphological and then immunohistochemical analysis using certain antibodies (CD3, CD20, CD4, CD8) was performed on microbiopsies and surgical specimens in order to quantify the infiltrate of the immune cells and their disposition in the tumor tissue. The evaluation of this infiltrate (immune cells in the periphery, in the tumor stroma, or intra-tumor) was done via a semi-quantitative method, which allowed us to reveal four levels of infiltration.

**Results:** Lymphocytic infiltration is in 50% of cases infiltrate of level 1 + low. This infiltrate is found almost equally at the level of microbiopsies and surgical specimens. It is the microbiopsies without residual tumor that have a greater infiltrate.

## المخلص

مقدمة: سرطان الثدي هو مشكلة صحية عامة و التكفل العلاجي يبقى إشكالية لبعض الأنواع الفرعية

سرطان الثدي الثلاثي السلبي هو نوع فرعي حيث أن ( la chimiotherapie neoadjuvante ) هي العلاج الوحيد الذي يجوز استعماله نظرا الى (la chimiosensibilité) خلايا الثدي الورامية تحفز اليات قاع الورم و ذلك بتشغيل خلايا المناعية و الكيفية في حالة عدم التخلص الكلي من هذه الخلايا يصبح الالتهاب مزمن , و هذا سيعزز انشاء اليات كبت المناعة و الخلايا السرطانية تصبح قادرة على الخروج من السيطرة المناعية و التحرك بسرعة في الجسم .

الهدف من دراستنا هو تحديد الارتباط الجهاز اللمفوي مع الاستجابة للعلاج الكيميائي. المواد و الطرق خلال هذا العمل اجرينا دراسة على 10 مريضات بسرطان الثدي الثلاثي السلبي حيث تلقين جرعات من العلاج الكيميائي.

ان التحاليل الشكلية و الكيميو مناعية بمساعدة بعض الأجسام المضادة (CD3. CD20.CD4.CD8) على خزعات و عينات جراحية لقياس تسلل الخلايا المناعية و ترتيبها في نسيج الورم (خلايا مناعية في محيطها, في وسط الورم او داخل الورم) عن طريق وسيلة شبه كمية التي سمحت لنا بالكشف عن اربعة مستويات من التسلل .

النتائج تسلل لمفاوية في 50% من حالات التسلل مستوى ضعيف +1 تم العثور على > التسلل بطريقة متساوية بين الخزعات و العينات الجراحية.

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AP-1** : Facteur de transcription, hétérodimère de Fos et Jun

**AR**: avec reliquat

**bcl2**: B cell lymphoma gene 2

**BRCA1/BRCA2**: Breast Cancer 1/2 (cancer du sein)

**BLBC** : basal-like breast cancer

**BL** : basal like

**BP**: biopsie

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**CSTN**: cancer de sein triple negative

**CPMC** : Centre Pierre et Marie Curie

**c-Myc** : cellular-myelocytose

**CNA** : La chimiothérapie néoadjuvante

**CTL** : lymphocytes T cytotoxiques

**CCI**: Carcinome canalaire infiltrant

**CD3** : cluster de différenciation 3

**CD4**: cluster de différenciation 4

**CD8**: cluster de différenciation 8

**CD20**: cluster de différenciation 20

**DAMPs** : Damaged Associated Molecular Patern

**Fas**: Induit l'apoptose

**FasL**: Ligand du Fas

**HE**: Hématoxyline Eosine

**HER2:** Human Epidermal Growth Factor Receptor2

**IHC:** Immunohistochimie

**IFN- $\gamma$**  : Interféron gamma

**MCP-1** : Monocyte Chemoattractant Protéine-1

**N** : niveau d'infiltrat

**NF- $\kappa$ B** : nuclear factor-kappa B

**NR:** non réalisable

**PTEN:** phosphatase and tensin homolog

**PRR** : Pattern Recognition Receptor

**P53:** Gène suppresseur de tumeur impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire

**pCR:** réponse pathologique complète

**PO:** pièce opératoire

**RANTES:** Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

**RE:** Récepteurs aux œstrogènes

**RP:** Récepteurs aux progestérones

**RH** : Récepteurs hormonaux

**TNBC** : triple négatives breast cancer

**TN** : triple négatif

**TGF- $\beta$**  : transforming growth factor beta

**TAMs** : Les macrophages associés aux tumeurs

**TNM:** Tumor Node Metastases

**SBR:** Scarff, Bloom et Richardson

**SR:** sans reliquat

## Glossaire

**La chimiothérapie:** est un traitement comportant l'administration de médicaments qui agissent sur les cellules cancéreuses, soit en les détruisant, soit en les empêchant de se multiplier.

Les médicaments agissent sur les autres cellules de l'organisme qui se développent rapidement, et cela explique les effets secondaires de la chimiothérapie. Mais nos bonnes cellules sont résistantes et très nombreuses, alors que les cellules cancéreuses sont en nombre beaucoup plus faible et sont plus fragiles. C'est ce qui explique l'efficacité du traitement (**TRAITEMENT ET CONSEIL LA CHIMIOTHERAPIE**)

**Protocole:** modalités de traitement par un ou plusieurs médicaments associés de chimiothérapie. Définit les doses, fréquences des cures, séquence d'association, voies d'administration (**revue scientifique de principes généraux de chimiothérapie, 2010**)

### **Puce à ADN ou microarray**

Un microarray est une surface solide (verre ou silicium), et généralement plane sur laquelle sont fixées des molécules (ADN, ARN, ADN, ARNc et autres) en guise de sondes suivant un ordre connu. La technique d'analyse des puces à ADN consiste en une hybridation inverse : la sonde est fixée sur le support et la cible capturée est marquée par un fluorophore. L'excitation du fluorophore par le laser a pour effet l'émission d'un signal qui est quantifié, si la cible est présente dans le milieu analysé (**article Microarray d'ADN**).

## Tables des matières

### Chapitre I : Synthèse bibliographiques

Introduction .....	1
I. Cancer du sein .....	2
II. Classification moléculaire du cancer du sein .....	3
II.1. Profil luminal A ou B.....	4
II.2. Profil Her2.....	4
II.3. Triple négatif.....	4
III. Traitements du cancer du sein triple négatif .....	5
IV. Cancer du sein et immunité anti-tumoral .....	7
IV.1. Phases de l'immunosurveillance des tumeurs .....	7
IV.2. Réponse anti-tumorale .....	8
IV.2.1. Immunité innée anti-tumorale .....	8
IV.2.2. Immunité adaptative anti-tumorale .....	10
IV.2.2.1. Lymphocytes T CD8+ .....	11
IV.2.2.2. Lymphocytes T CD4+ .....	11
IV.2.2.3. Les lymphocytes B.....	11
IV.3. Mécanismes d'échappement tumoral .....	12
IV.3.1. Microenvironnement pro-tumoral .....	12
IV.3.2. Faible immunogénicité des cellules tumorales .....	12
IV.3.3. Recrutement de populations immunitaires régulatrices .....	13
IV.3.4. Facteurs solubles immunosuppresseurs .....	13
IV.3.5. Dérégulation des signaux d'apoptose .....	13

<b>IV.3.6. Barrière physique .....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre II : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>14</b>
<b>Chapitre III : Résultats et discussions .....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre IV : conclusion.....</b>	<b>44</b>



# INTRODUCTION

---

## Introduction :

Premier cancer de la femme au monde, le cancer du sein constitue un problème de santé publique, avec une augmentation de l'incidence et une mortalité qui reste stable. En Algérie, un accroissement régulier de l'incidence a été objectivé depuis le début des années 1990 et touche des femmes relativement jeunes (**Hannoun, 2001**).

Le cancer du sein est une maladie hétérogène, qui varie aussi bien par ses caractéristiques cliniques et morphologiques que par le profil biologique de chaque tumeur (**Mombelli, 2014**). Les cancers mammaires sont classés selon leur type histologique, leur grade, leur statut hormonal récepteurs œstrogéniques (RE) récepteurs progestéronique (RP) et Her2. Ce qui conduit à considérer quatre sous-groupes dits moléculaires selon leur expression phénotypique. Différentes approches thérapeutiques peuvent être utilisées dans la prise en charge de ces cancers, les indications variants selon le type histologique, l'extension de la maladie, et leur classification moléculaire (**Richard, 2012**).

Les carcinomes mammaires triples négatifs (RE, RP, HER2 négatifs) en particulier ne disposent pas actuellement de thérapeutique ciblée. Malgré les nouveaux schémas de chimiothérapie, le pronostic de ce type de cancer reste sombre (**Perou et al., 2000 ; sorlie et al., 2003 ; lim et al., 2009**).

Des études réalisées sur le cancer du sein et d'autres cancers, supportent la notion qui indique que l'infiltration tumorale par les lymphocytes est corrélée à une réponse immunitaire anti-tumorale. En outre, le degré de l'infiltrat inflammatoire et, spécialement, la présence de lymphocytes est corrélé avec un bon pronostic dans de nombreux types de cancer. Par conséquent, les lymphocytes intra-tumoraux (TILs) indiquent une réponse immunitaire anti tumorale qui peut contribuer au contrôle de la croissance et la propagation de certaines tumeurs (**Toso, 1996 ; Hadden, 1999**).

D'une manière générale, à la fois dans le traitement adjuvant et néoadjuvant, la chimiothérapie pourrait déclencher l'immunosuppression et réinitialiser a atténuer la fonction immunitaire. Le résidu tumoral suivant la chimiothérapie néoadjuvante dans le cancer du sein triple négatif est considéré comme un mauvais pronostic. La chimiothérapie néoadjuvante peut engendrer l'accumulation de TILs dans le résidu tumoral, et la déplétion de Treg immunosuppressive, qui devrait présager une issue favorable (**Savas et al., 2015**).

Dans ce sens, l'objectif principal de notre étude vise à évaluer le niveau d'infiltrat inflammatoire au niveau des tumeurs triple négatives (TNBC). Pour ce faire, nous avons travaillé sur des lames HE et IHC, de prélèvements biopsiques de patientes pré-traitées par chimiothérapie néoadjuvante, ainsi que des pièces opératoires obtenues après traitement des patientes. Ceci nous permettra de corréler le résultat avec l'effet de la chimiothérapie néoadjuvante.

# GENERALITES

---

## I. Cancer du sein :

Le cancer est une pathologie du génome de la cellule qui survient dans les tissus des organismes vivants présentant un temps de vie assez long, tels que les vertébrés. En effet, le cancer nécessite pour se développer des tissus qui présentent une capacité à se régénérer dans le temps et dont les cellules somatiques vont accumuler des mutations (**Junttila, 2009**). La notion de « cancer du sein » relève d'une nomenclature générique qui fait référence à tout un ensemble de proliférations néoplasiques de la glande mammaire qui diffèrent tant du point de vue histologique qu'en ce qui concerne leur comportement évolutif. (**Tubiana et Koscielny, 1987 ; 1990**)

### I.1. Epidémiologie :

#### Dans le monde :

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes. Il est la cause majeure de décès liés au cancer dans le monde, avec plus de 800 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. (**Parkin et al., 2003**) .Il représente la première cause de mortalité féminine dans la tranche d'âge de 35 à 55 ans, constituant ainsi un sérieux problème de santé publique (**Moss, 1997**). En 2007, 1.3 million de femmes ont été diagnostiqués pour un cancer du sein (**Garcia, et al., 2007**), Aux états unis, son incidence est l'une des plus élevée au monde : 110 cas pour 100000 femmes ( 1970) et 'le national Institute of Health', a estimé pour la période allant de 1990 à 2000, qu'une femme sur huit développera un cancer du sein au cours de sa vie pour une espérance de vie de 85 ans (**Mombelli, 2014**) .En Europe, l'incidence est intermédiaire, varierait de 60 à 110 pour 100000 femmes ( 80 pour 100000 femmes en France) . En Asie du Sud-est, le cancer du sein est en première place, il n'est qu'en seconde position après le cancer de l'estomac chez les femmes dans l'Est Asiatique, et après le cancer du col au centre et au sud de l'Asie (**Breast cancer in developing countries 2009**). En Afrique du Nord, l'incidence est de 32.7/100.000 femmes et la mortalité est de 17.8/ 100.000, selon les données de globocan 2008.

#### En Algérie:

La dernière décennie montre une place importante du cancer du sein en algerie. En effet, après avoir occupé la seconde place après le cancer du col de l'utérus, il occupe actuellement la première place chez la femme (**Guendouz, 2014**). Un accroissement régulier de l'incidence a été objective depuis le début des années 1990 et touche des femmes relativement jeunes (**Hannoun, 2001**).

### I.2. Facteurs de risque :

#### I.2.1 Antécédents familiaux :

Il existe une certaine prédisposition familiale à développer certaines maladies chroniques comme le cancer. (**Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2001**)

Le risque estimé est dépendant de l'âge d'apparition de cancer dans la famille, de degré et du type de parenté, du statut pré ou post ménopausique ainsi que du caractère bilatérale (**Offit et al., 1994 ; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer.2012**).

# GENERALITES

---

## I.2.2. Antécédents personnels de cancers :

Un antécédent de cancer, de traitement immunosuppresseur par chimiothérapie et/ou radiothérapie sus diaphragmatique, sont reconnus comme des facteurs favorisant l'apparition d'un cancer secondaire et notamment d'un cancer du sein (**Boyd et al., 1999**).

## I.2.3. Antécédents personnels de maladies mammaires :

Les femmes, qui ont eu un cancer du sein, ont 5 fois plus de risque de développer un nouveau cancer dans le même sein lorsque la chirurgie a été conservatrice, ou dans le sein controlatéral que la population générale (**Lostumbo et al., 2004 ; Buist et al., 2010**).

## I.2.4. Génétique :

Il s'agit d'une maladie génétiquement et cliniquement hétérogène dans lesquels différents gènes de susceptibilité ainsi que certaines de mutation ont été identifiées. Trois gènes de prédisposition au cancer du sein ont été caractérisés : *BRCA1* et *BRCA2* localisés sur les chromosomes 17 et 13 respectivement, et *BRCA3* qui serait localisé sur le chromosome 8 et dont le rôle reste à définir. D'autres gènes de susceptibilité comme le gène *c-Myc*, *p53*, *PTEN* (**Van Sprundel, 2005**).

## I.2.5. Exposition hormonal :

Il est couramment admis que le niveau d'imprégnation œstrogénique et la durée d'exposition aux œstrogènes sont des facteurs favorisant l'apparition d'un cancer du sein tels que l'âge des premières règles, âge de la première grossesse, nombres de pares et de gestes, allaitement, âge de la ménopause (**Nkondjock et al., 2005**).

## I.2.6. Surpoids et les habitudes de vie :

L'obésité est associée à un risque de cancer du sein multiplié par 2 chez les femmes ménopausées, L'excès de tissus adipeux entraîne l'augmentation de la production et du temps d'exposition aux hormones stéroïdiennes, de plus, après la ménopause, l'aromatation des androgènes dans le tissu adipeux est l'une des plus considérables sources d'œstrogènes circulants (**Rehman et al., 2010**).

## I.3. Facteur pronostic :

Les éléments de pronostic du cancer du sein sont de plusieurs ordres : cliniques, histologiques et biologiques (**Mombelli, 2014**).

## II. Classification moléculaire du cancer du sein (annexe I) :

Récemment, des techniques de biologie moléculaire de type microarray, ont permis de classer les cancers du sein en 5 groupes distincts : Luminal A, Luminal B, HER2, Normal-like, Triple négatif (**Perou et al., 2000 ; Sorlie et al., 2003 ; Lim et al., 2009**).

# GENERALITES

## II.1. Profil luminal A ou B :

60 à 65% des cancers du sein sont caractérisés par une expression élevée de récepteurs hormonaux et une absence d'expression de l'Her2. Le récepteur à l'œstrogène alpha est moins exprimé dans la classe luminal B. Une forte prolifération dans le phénotype luminal entraîne un risque relatif plus important par rapport aux tumeurs lumineales de faible prolifération. Les lumineales A sont des tumeurs hormonosensibles pures et bénéficient de monothérapie antihormonale. Les lumineales B devraient bénéficier en plus de l'introduction de la chimiothérapie (penault-liorca, 2007 ; Freres et al., 2010 ; Bourggiera et al.,2012).

## II.2. Profil Her2 :

Il représente jusqu'a 25 % des cancers du sein. Il est définie comme incluant toutes les tumeurs HER2 quelque soit leur expression des récepteurs hormonaux. Leur phénotype est HER2plus, CK8/18/19plus, leur pronostic est défavorable (Mathieu , 2007).

## II.3. Triple négatif :

Il représente 10 à 15 % des carcinomes infiltrant du sein, (Hannoun, 2001) dont 75 à 85 % appartiennent à la classe Basal-Like. (Rakha et al., 2007). Les cancers du sein triple négatif sont définis comme des tumeurs dépourvues d'expression de récepteur d'œstrogène (ER), le récepteur de la progestérone (PR), et la surexpression de HER2 (Perou et al., 2000).

Les caractéristiques générales des tumeurs TN sont représentées dans le **tableau N°1**. Les cancers du sein triple négatif sont généralement de hauts grades nucléaires, et ils montrent un profil d'expression plus agressif avec une faible expression de Bcl-2, mais de forte expression de p53 et Ki67 (Foulkes et al., 2004 ; Fulford et al., 2006 ; Chivukula et al., 2008 ; Dogan et al., 2008 ; Nishimura and Arima, 2008 ; Tian et al., 2008).

Tableau I : caractéristiques générales du cancer du sein triple négatif

Caractéristiques générales du cancer du sein triple négatif
Souvent présenté comme cancer d'intervalle
Faible association entre la taille tumorale et l'implication de ganglions lymphatiques
Un grand risque d'une récurrence précoce
La récurrence est vue entre les premières et les troisièmes années après le diagnostic
Les métastases sont rarement précédées par des récurrences locales
La récurrence locale n'est pas révélatrice d'une maladie métastatique
Plus fréquent chez les jeunes femmes
Forte association avec l'obésité
Prévalence accrue pour les métastases cérébrales
La plupart des décès était possible pendant les six premières années
Rapide progression depuis le début de métastase jusqu'à la mort
Grande chimiosensibilité
Un facteur de risque dans les tumeurs avec ganglion lymphatique négatif
Molécules spécifiques ciblées sont déterminées récemment

# GENERALITES

---

Sur le plan histologique, on retrouve essentiellement des carcinomes canalaire de haut grade et de type non spécifique, des carcinomes métablasique et des carcinomes médullaires. Les caractéristiques tumorales morphologiques sont celles d'un cancer agressif ; la masse tumorale refoule les tissus voisins et présente des zones de nécrose et souvent centrales (**Diaz et al., 2007**).

L'association entre les tumeurs TN et la voie BRCA1 a été mise en évidence. (**Foulkes et al., 2003 ; Lakhani et al., 2005**). Il s'avère que la voie BRCA1 conduit au développement de deux sous type du cancer du sein, la triple négatif, et le basale-like (BLBC) (**Tim et al ; 2011**). La majorité des cancers du sein présentant une mutation familiale du gène BRCA1 ont un aspect morphologique de type TN ou BLBC. Leur profil immunohistochimique est superposable dans 75 à 90% des cas (**Foulkes et al., 2004**). Ainsi que leur degré d'instabilité génique liée à une pathologie primitive de la réparation de l'ADN (**Mullan et al., 2006**). Leur profil évolutif est également semblable (**Foulkes et coll, 2004**).

La perte d'expression de la voie PTEN est associée au phénotype triple négatif. (**Perren et al., 1999 ; Saal et al., 2008**). Il existe d'autres gènes qui sont mutés plus fréquemment dans le TNBBC, dont les oncogènes RB1 et KRAS, connus pour augmenter la croissance de la tumeur. (**Hu et al., 2009**).

Les analyses d'expression génique du cancer du sein TN ont récemment identifié 6 sous-types distincts (**Lehmann et al., 2014**):

- ✓ BL1 (BL pour basal-like) caractérisé par une signature génique enrichie de gènes du cycle cellulaire et de la réponse aux dommages de l'ADN.
- ✓ BL2 caractérisé par une surexpression de la signalisation des facteurs de croissance et des marqueurs myoépithéliaux.
- ✓ M et MSL sont deux sous-types mésenchymateux avec une forte expression des gènes impliqués dans la différenciation et la signalisation des facteurs de croissance.
- ✓ IM est un sous-type immuno-modulateur qui surexprime les gènes liés aux processus cellulaires immunitaires.
- ✓ LAR est un sous-type luminal qui a la particularité d'exprimer des récepteurs aux androgènes.

Le pronostic des patients atteints de ce type de tumeur est très pauvre, non seulement parce que les thérapies ciblées sont exclues, mais aussi parce que ces tumeurs semblent être plus agressives que d'autres sous-types de cancer du sein semblables au basale-like (**Nofech-Mozes et al., 2009**).

### III. Traitements du cancer du sein triple négatif :

#### III.1. Traitements systémiques :

La chimiothérapie est le seul traitement systémique validé dans les cancers du sein TN. Etant donné que leur index mitotique est élevé, ces tumeurs sont plus chimio-sensibles que les autres sous-groupes en particulier en situation néoadjuvante. La chimiothérapie néoadjuvante (CNA) permet de prévenir la production de facteurs circulants qui sont à l'origine de la stimulation des facteurs de croissance de tumeurs. Elle correspond à l'utilisation d'un

## GENERALITES

---

traitement cytotoxique systémique avant le traitement locorégional (chirurgie et/ou radiothérapie). La terminologie de traitement néoadjuvant pour le cancer du sein a été utilisée au début des années 80, lors de l'introduction de la CNA dans le traitement des ostéosarcomes (**Mombelli, 2014**). Selon (**Liu et al., 2010**) les avantages théoriques de la CNA sont :

- ✓ L'éradication des micro-métastases occultes, lors d'une exposition précoce à la chimiothérapie.
- ✓ Une réduction du risque de dissémination des cellules tumorales, lors du geste chirurgical.
- ✓ Une prévention d'un effet rebond prolifératif après chirurgie ; il a été décrit une prolifération rapide au niveau des sites résiduels après exérèse de la tumeur primitive, et une prolifération accrue au niveau des métastases.
- ✓ Administration des drogues cytotoxiques au sein d'un réseau vasculaire intact. Le flux sanguin est plus important au sein de la tumeur qu'au niveau du tissu mammaire normal.
- ✓ La CNA permettra d'avoir un modèle *in vivo* pour d'apprécier les effets des drogues et la réponse de la tumeur.
- ✓ Dans le but d'obtenir un effet esthétique.

La chimiothérapie systémique permet l'évaluation précoce de la réponse ou de la résistance aux drogues cytotoxiques. La CNA aura aussi pour but d'obtenir une meilleure survie sans récurrences. La rémission complète de toute tumeur viable dans le sein ou les ganglions, est considérée comme un indicateur de l'éradication totale de toute maladie locorégionale, et de là même une éradication de foyers de micrométastases à distance. Cette hypothèse est soutenue par une meilleure survie globale chez les patientes ayant une réponse histologique complète (**Kuerer et al., 1999**).

Classiquement, les indications de la CNA associent les tumeurs dites localement avancées et les cancers du sein inflammatoires, mais elle est aussi indiquée dans un but conservateur. De nombreuses classifications sont proposées pour l'évaluation histopathologique de la réponse à la chimiothérapie. Ces systèmes de grading sont de nature semi-quantitative. La classification proposée pour le cancer du sein triple négatif est la classification de Sataloff (**annexe II**) (**Wolmark et al., 2001 ; Van der Hage et al., 2001**)

La classification de **Sataloff (1995)** a été élaborée par une équipe de Philadelphie, évaluée sur 36 patientes. Elle associe la réponse histologique au niveau du parenchyme mammaire et ganglionnaire, Les réponses sont gradées de A à D, de la réponse complète (A) à une absence de réponse (D), avec entre les deux une appréciation plutôt subjective d'une réponse supérieure ou inférieure à 50%. Dans le groupe A, la réponse complète admet la présence de cellules isolées de moins de 2 mm, ainsi que d'une composante *in situ*.

Cette classification va permettre de subdiviser les patientes selon la réponse histologique, en associant la réponse au niveau du tissu mammaire avec la réponse au niveau des ganglions, en regroupant ensemble « les bons répondeurs » réponses supérieure à 50% et « les mauvais répondeurs ». Cette étude a mis en évidence une meilleure survie chez les patientes ayant une réponse histologique complète (**Sataloff et al., 1995**).

# GENERALITES

---

## IV. Cancer du sein et immunité anti-tumoral :

Le cancer du sein est souvent initié par des changements génétiques et épigénétiques au niveau des gènes qui régulent la fonction des cellules épithéliales mammaires. Divers mécanismes suppresseurs de tumeur sont mobilisés pour éliminer les cellules néoplasiques mammaires et donc limiter leur propagation dans l'organisme. En effet, le système immunitaire est capable de reconnaître et de diriger des réponses cytotoxiques contre les cellules cancéreuses, qui expriment des antigènes tumoraux induits par transformation néoplasique. Le système immunitaire reconnaît un « soi altéré » grâce à l'expression, par les cellules tumorales, d'Ag particulier ou de molécules membranaires induite par la transformation néoplasique. Le microenvironnement tumoral contribue fortement à l'évolution du phénotype tumoral vers des profils plus agressifs, capables d'échapper aux différents mécanismes anti-tumoraux et de progresser rapidement dans l'organisme. Cette évolution est décrite dans un concept, largement adopté par le commun des scientifiques, et qu'on appelle le concept « immuno editing » ou l'« immuno-surveillance » (**Lacroix et al., 2006 ; Coussens et Pollard, 2011 ; Xu et al., 2011 ; Nicholls et al., 2012**) (**Figure 1A et B**).

### IV.1. Phases de l'immuno-surveillance des tumeurs :

L'immuno-surveillance est un concept attribué à la fonction physiologique du système immunitaire adaptatif. Elle est représentée par la destruction des cellules transformées, et la prévention de leur expansion avant qu'elles ne deviennent des tumeurs dangereuses (**les bases de l'immunologie fondamentales et cliniques**). En revanche, le système immunitaire ne protège pas seulement l'hôte, mais il participe aussi à la sélection de variants tumoraux ayant la capacité de survivre dans un environnement immunologique intact (**pdf cours**).

Le double jeu du système immunitaire a rendu le concept de l'immuno-surveillance insuffisant, pour décrire toutes les interactions entretenue avec la tumeur, il évolua en a un nouveau concept qui est l'immunoediting.

L'immunoediting est composé de trois phases, d'où son nom, règles des trois Es, qui sont comme suit : élimination, équilibre et échappements

#### IV.1.1 Elimination :

Cette phase est enclenchée dès la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire. Le développement tumoral, qui se fait aux dépens du tissu sain, met en place un contexte pro-inflammatoire par la libération de signaux de danger (DAMPs pour Damaged Associated Molecular Patern) (**Escamilla-Tilch et al., 2013**) . Ce contexte favorise alors le recrutement et l'activation de cellules cytotoxiques de l'immunité innée ainsi que le recrutement des cellules présentatrices d'antigène, qui activeront ensuite l'immunité adaptative. Ainsi, durant cette étape, la tumeur est contrôlée par le système immunitaire, voire entièrement éliminée (**Michels et al., 2004**) (**Figure 1C**).

# GENERALITES

---

## IV.1.2. Equilibre (Immunoélection) :

La relation dynamique entre le système immunitaire et la tumeur conduit à une phase d'équilibre, qui peut durer de nombreuses années. Durant cette période certaines cellules tumorales peu prolifératives et/ou peu immunogènes ont survécu à la phase d'élimination. La tumeur est dite « en dormance » : elle est contrôlée mais continue d'évoluer lentement (**Vesely et Schreiber, 2014**) Plus longtemps dure cet équilibre, plus il y a de risques qu'une mutation entraînant l'échappement au contrôle immunitaire des cellules tumorales. Durant cette longue phase, les cellules tumorales subissent une pression importante du système immunitaire qui conduit à un phénomène de sélection des phénotypes les plus adaptés à survivre que l'on nomme « immunoélection » (ou "immunoediting"). D'autre part l'inflammation associée aux cancers et l'instabilité génétique des cellules tumorales semblent contribuer à l'établissement d'un microenvironnement pro-tumoral et immunosuppresseur (**Mombelli, 2014**) (**Figure 1C**).

## IV.1.3. Echappement tumoral (Immunosubversion) :

Les clones résistants, ainsi sélectionnés, lors de l'immunoélection, sont capables d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Ils vont alors permettre à la tumeur de proliférer brusquement voire générer des métastases : c'est la phase d'échappement. L'échappement est croissant puisque la tumeur accumule de nombreux et différents mécanismes au fil du développement de la maladie. Les populations tumorales sont hétérogènes, ainsi que leurs mécanismes d'échappement, ce qui rend leur élimination par le système immunitaire ou par un traitement immunologique d'autant plus difficile (**Mombelli, 2014**) (**Figure 1C**).

## IV.2. Réponse anti-tumorale :

La réponse anti-tumorale est un mécanisme complexe et collaboratif entre les cellules de l'immunité innée (NK, NKT, CD...), de l'immunité adaptative (T CD8+ et TCD4+) et des cellules à la frontière entre ces deux réponses (T $\gamma$  $\delta$ ). Chaque type cellulaire possède des caractéristiques et des fonctions spécifiques dont le but est de collaborer de façon directe ou indirecte afin d'éliminer la tumeur (**Dranoff, 2004**).

### IV.2.1. Immunité innée anti-tumorale :

Les DAMPs sont des signaux de souffrance cellulaire qui vont activer des récepteurs cellulaires de l'immunité innée (PRR : Pattern Recognition Receptor), présents à la fois sur les cellules immunitaires et d'autres cellules, comme les cellules épithéliales, fibroblastiques ou endothéliales, et ainsi déclencher une réaction inflammatoire. Les cellules tumorales étant des cellules altérées, émettent des DAMPs et activent l'immunité innée.

L'inflammation peut conduire à la destruction des cellules tumorales, ainsi qu'à la réparation tissulaire. Au cours de ce processus, il y aura recrutement des cellules cytotoxiques de l'immunité innée dans le tissu menacé et leur activation. L'activation se fait suite à la sécrétion de facteurs solubles ; les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18...), les chimiokines. Par ailleurs, des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , sont également libérées au cours de l'inflammation pour aboutir à la suppression de la réaction inflammatoire. La réponse innée anti-tumorale implique les cellules cytotoxiques de la première ligne de défense, telles que les cellules natural killer T (NKT), les lymphocytes



# GENERALITES

T- $\gamma\delta$ , mais aussi et principalement les lymphocytes natural killer (NK) et les macrophages. (Mombelli, 2014).

Les lymphocytes NK sont les principales cellules de l'immunité innée impliquées dans l'immunité anti-tumorale. Elles sont capable de détruire une grande variété de cellules cibles, qu'elles soient infectées par un virus ou transformées. (Mombelli, 2014). Elles possèdent deux grands types de récepteurs (NKR), les récepteurs dits "activateurs" et ceux dits "inhibiteurs" ; l'intégration des différents signaux induisant leur activité cytotoxique ou leur tolérance. Par ailleurs ces cellules sont capables, après activation, principalement de produire l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) qui a un pouvoir anti-tumoral. (Cooper et al.,2001).

Les macrophages sont activés suite à la sécrétion d'IFN- $\gamma$  au niveau du site tumoral par les NK. La présence de ces cellules est également favorisée par la sécrétion de chimiokines telles que MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted), et de cytokines inflammatoires (IL-12, IFN- $\alpha$ ) par les cellules dendritiques et les cellules NK. Les fonctions anti-tumorales sont attribuées aux sous type M1. Ce dernier diffère du sous type M2 par son activation dite « classique », via l'IFN- $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$ , et l'engagement des TLRs. Les macrophages M1 produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-23 et IL-6, qui induisent la stimulation des lymphocytes Th1 (Gordon et Martine, 2010).

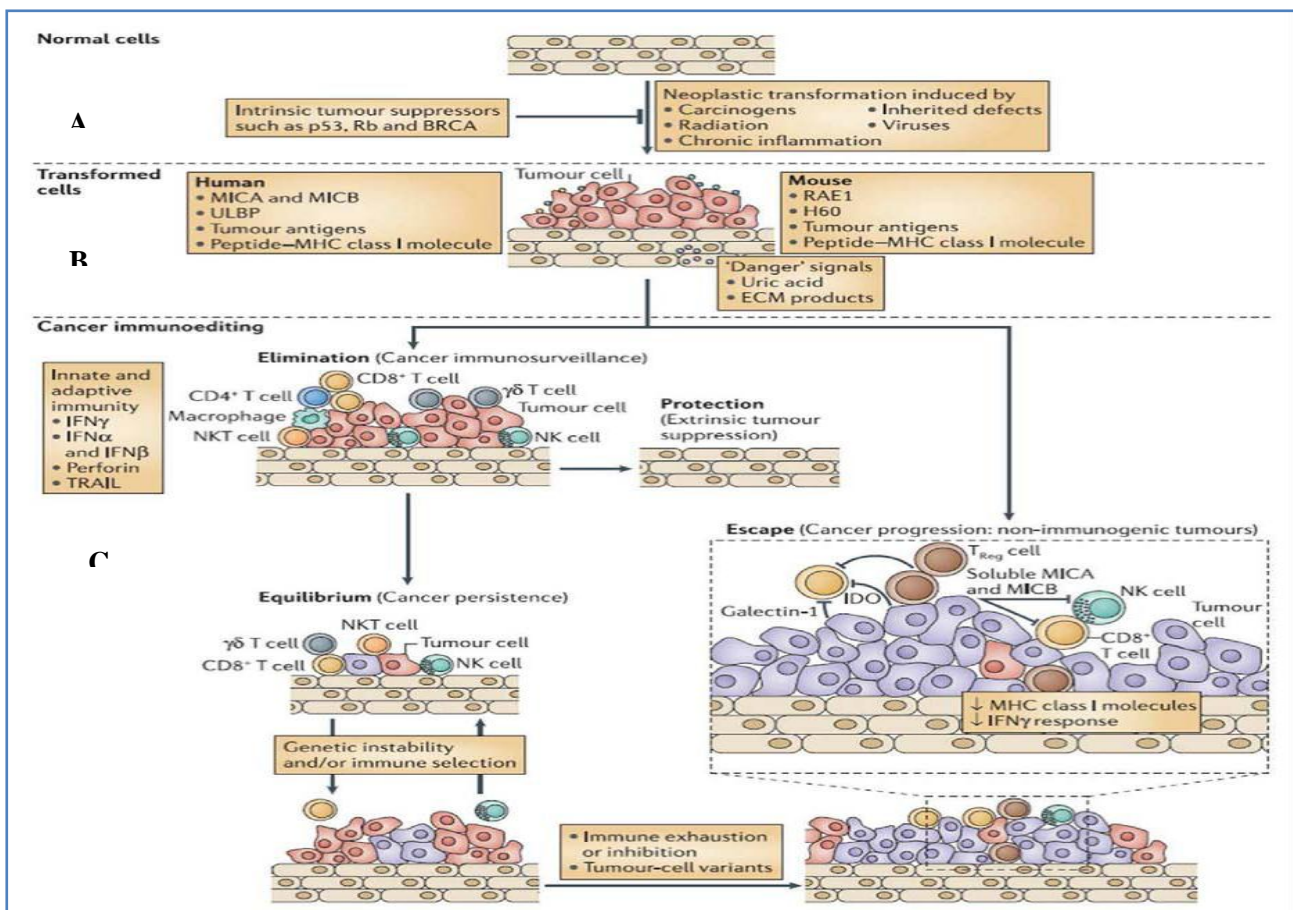


Figure 1 : Développement tumoral et immunosurveillance.

A et B. Transformation néoplasique d'une cellule normale sous l'influence de l'environnement.

C. Concept d'immunosurveillance ou « immuno-editing »

## GENERALITES

---

Le rôle des macrophages dans la progression tumorale est justifié par le fait qu'ils jouent un rôle fondamental dans la réponse inflammatoire chronique (qui participe à la carcinogénèse), mais également par la corrélation établie entre une densité élevée en macrophages et un mauvais pronostic (**Pollard, 2004**).

### IV.2.2. Immunité adaptative anti-tumorale :

Le contexte inflammatoire du site tumoral favorise le recrutement de cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques, qui sont à l'interface entre la réponse innée et la réponse adaptative. D'autre part les cellules tumorales, suite aux nombreuses mutations génétiques ou épigénétiques qu'elles subissent, expriment des molécules aberrantes parfois antigéniques et immunogéniques, que l'on appelle les antigènes tumoraux. La nécrose ou l'apoptose de ces cellules au sein du tissu tumoral va libérer des antigènes tumoraux qui seront alors capturés par les cellules dendritiques immatures infiltrant le site inflammatoire. Sous l'influence des DAMPs, celles-ci vont maturer, c'est-à-dire exprimer à leur surface les molécules de Co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T et migrer dans un organe lymphoïde secondaire pour présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T naïfs associés aux molécules du CMH aux lymphocytes T CD4+ ou CD8+ (**Barry et Bleackley, 2002**). En effet, l'activation des lymphocytes T naïfs ne sera effective que si l'interaction initiale entre les lymphocytes T et cellules dendritiques est permise par les nombreuses molécules d'adhésion (ICAM-1/LFA1, LFA3/CD2, VCAM-1/VLA4) et si le premier signal (reconnaissance du peptide : CMH/TCR + CD4 ou CD8) est accompagné des signaux dits de co-stimulation (deuxième signal : B7/CD28). Les lymphocytes T activés vont alors proliférer et se différencier en cellules T effectrices telles que les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), lymphocytes T auxiliaires (ou lymphocytes "helper" : Th), et les cellules mémoires.

#### IV.2.2.1. Lymphocytes T CD8+ :

Suite à leur activation, les lymphocytes T CD8+ naïfs entrent dans une phase de prolifération et de différenciation aboutissant à une population clonale de cellules cytotoxiques ou CTL. Les CTL migrent dans la tumeur et éliminent les cellules tumorales par cytotoxicité. Pour cela, les CTL disposent de deux principales voies inductrices de mort : la voie perforine/granzyme et la voie Fas/Fas-L. Il existe également une troisième voie basée sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$  qui, libérées à proximité des cellules cibles peuvent entraîner leur mort. (**Chávez-Galán et al., 2009**).

#### IV.2.2.2. Lymphocytes T CD4+ :

Les lymphocytes Th1 sont importants dans les réponses immunitaires contre les pathogènes intracellulaires tels que les virus ou les bactéries et participent principalement à l'immunité à médiation cellulaire. Ils peuvent également intervenir dans l'immunité humorale. La cytokine effectrice principale est l'IFN- $\gamma$  qui joue un rôle important dans l'inhibition et la destruction des cellules tumorales. L'IFN- $\gamma$  favorise également le signal délivré lors de l'interaction CD40 (sur la cellule présentatrice d'antigènes) et CD40L (sur le lymphocyte T CD4+ activé), qui active les cellules présentatrices d'antigènes et donc augmente le potentiel d'activation des lymphocytes T naïfs. En parallèle, les lymphocytes Th1 favorisent la différenciation des lymphocytes T CD8+ en CTL *via* l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$ . Il est également intéressant de noter que certains lymphocytes Th1 peuvent avoir des capacités cytolytiques dépendantes de la voie Fas/Fas-L et de la perforine (**Hsieh et al., 2014**). L'infiltration spontanée des cellules Th1 a été observée dans divers cancers et parfois corrélée

## GENERALITES

---

à un pronostic favorable (**Bui et Schreiber, 2007**), leur action anti-tumorale passe principalement par la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , ainsi que par l'inhibition des lymphocytes Th2.

Concernant le rôle des Th2 dans l'immunité anti-tumorale, il a été démontré que la production de TGF- $\beta$  et d'IL-10, par ces cellules, favorise la croissance tumorale. En effet, ces cytokines régulent négativement la réaction inflammatoire et créent un environnement favorable au développement de la tumeur et à l'échappement immunitaire (**Yang et Bolpetti, 2010**) De plus les lymphocytes Th2 inhibent la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes Th1, un acteur anti-tumoral important.

Les cellules Th17 ont été retrouvées dans le microenvironnement tumoral de nombreux cancers, notamment les tumeurs du sein (**Manel et al., 2008**). La fonction biologique des lymphocytes Th17 tend vers une fonction pro-inflammatoire, caractérisée par une forte sécrétion d'IL-17A. Les Th17 et l'IL-17A ont été rapportés comme indicateurs de mauvais pronostic dans les cancers (**Manel et al., 2008 ; Cochaud et al., 2013**).

### IV.2.2.3. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B reconnaissent les antigènes sous une forme native par leur immunoglobuline de surface, qui constitue le récepteur pour l'antigène. Cet antigène peut se présenter sous forme soluble ou membranaire. Ceci diffère des modalités de reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T, qui nécessite que l'antigène soit dégradé et présenté par des cellules présentatrices « professionnelles », qui délivrent des signaux de costimulation aux lymphocytes T (**Von Andrian et Mempel, 2003**).

Les plasmocytes dérivants des lymphocytes B activés, sont responsables de la synthèse des anticorps anti-tumoraux et ils peuvent aussi provoquer une action cytotoxique directe (**Savas et al., 2015**).

## IV.3. Mécanismes d'échappement tumoral :

### IV.3.1. Microenvironnement pro-tumoral :

Lors de l'échappement au système immunitaire, les cellules tumorales n'étant pas toutes éliminées, l'inflammation devient chronique. Ceci va favoriser la mise en place de mécanismes d'immunosuppression *via* l'expression au sein du tissu, par les cellules tumorales ou par les cellules immunitaires infiltrantes, de cytokines régulatrices. Parmi ces cytokines, nous retrouvons, principalement, l'IL-6, qui module l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (**Kanterman et al., 2012**). L'immunosuppression générale se traduit également par l'activation de voies de signalisations centrales. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) qui, sous stimulation continue inflammatoire, est constitutivement active et assure la transcription de gènes inflammatoires cibles, comme le TNF- $\alpha$ . Ce dernier stimule la croissance et la survie des tumeurs et de plusieurs cellules immunitaires (**Umansky et Sevko, 2012**).

Les facteurs de transcription tels que la famille des STAT, AP-1 (**He et al., 2011**) régulent également les cytokines pro-inflammatoires et les médiateurs de renouvellement des cellules souches, la prolifération cellulaire et leur survie, tous impliqués dans le maintien de l'inflammation. Cette immunosuppression se reflète également par une perte d'expression de la chaîne  $\delta$  (CD247) du TCR responsable de l'anergie, c'est-à-dire le fait que la cellule

## GENERALITES

---

effectrice reconnait l'antigène tumoral mais n'est plus réactive, ou de la diminution de cellules effectives innées NK et adaptatives lymphocytes T (**Baniyash et al., 2014**).

### IV.3.2. Faible immunogénicité des cellules tumorales :

- **Perte d'antigène immunogène** : les cellules tumorales peuvent supprimer leurs antigènes de surface, par exemple en endocytant les anticorps qui s'y fixent afin de se purger de leurs antigènes (**DuPage et al., 2013**). Des études ont montré que des tumeurs exprimant faiblement un antigène, bien que pouvant être reconnues par des lymphocytes T préalablement activés, ne permettaient pas d'activer des lymphocytes T anti-tumoraux spécifiques.

- **Perte des molécules d'adhésion à la surface des cellules tumorales** : et ce afin d'empêcher les cellules immunitaires de s'y fixer. Nous retrouvons aussi la perte des molécules de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T (**De Haart et al., 2013**), les lymphocytes T peuvent alors devenir anergiques.

- **Délétion des molécules de CMH-I présentatrices des antigènes tumoraux** : ce qui va inhiber la réponse T, tout en conservant l'expression d'autres allèles de CMH-I pour ne pas activer les cellules NK (**Campoli, 2012**).

### IV.3.3. Recrutement de populations immunitaires régulatrices :

Certaines cytokines et chimiokines sécrétées par la tumeur favorisent l'accumulation au sein de la tumeur de nombreuses populations cellulaires régulant la réponse immunitaire.

- **Les cellules Treg** : qui infiltrent la tumeur en réponse à des cytokines telles que TGF- $\beta$  et IL-10 (**Whiteside, 2014**) et jouent un rôle clé dans la régulation de l'immunosurveillance. Elles ont en effet été retrouvées dans de nombreux types de cancer et souvent corrélées à un mauvais pronostic (**Mougiakakos et al., 2010**). Les proportions respectives de lymphocytes Treg et de cellules effectrices anti-tumorales lors de l'apparition de la tumeur détermineraient le rejet de la tumeur ou sa progression (**Whiteside, 2014**).

- **Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)** : qui infiltrent presque tous les types de tumeurs. Naturellement, la survie et l'activation prolongée des macrophages conduit à la destruction tissulaire et devrait donc éliminer les cellules tumorales. Cependant, les TAMs sont des macrophages de type M2, transformés sous l'influence de cytokines inappropriées et du microenvironnement. Ces cellules vont alors produire des facteurs de croissance et des facteurs angiogéniques, conduisant à la dégradation de la matrice extracellulaire et favorisant l'invasion des cellules tumorales (**Mantovani et al., 2011**).

- **Les cellules dendritiques immatures** : qui sont un phénotype courant du microenvironnement inflammatoire chronique. Sans l'expression à leur surface des molécules de co-stimulation elles peuvent induire l'anergie ou réduire l'activité des lymphocytes T, de plus ces cellules supportent la croissance tumorale via le recrutement et l'activation des lymphocytes Treg (**Belkaid et Oldenhove, 2008**).

- **Les cellules myéloïdes immunosuppressives** : qui représentent une population cellulaire immature également présente dans la plupart des cancers. Leur propriété principale est leur capacité à inhiber aussi bien les réponses immunes innées qu'adaptatives (**Gabrilovich et**

## GENERALITES

---

**Nagaraj, 2009**). Leur nombre est fortement augmenté dans des conditions d'inflammation chronique, ce qui diminue le nombre des cellules myéloïdes matures telles que les macrophages et les cellules dendritiques.

### IV.3.4. Facteurs solubles immunosuppresseurs :

- **Cytokines immunorégulatrices** : les deux principales étant le TGF- $\beta$  et l'IL-10. Le TGF- $\beta$  a d'abord un effet anti-tumoral (anti-prolifératif et anti-invasif), mais celui-ci est rapidement compensé par son effet immunosuppresseur comme l'induction de lymphocytes Tregs (sécréteurs d'IL-10), ainsi que par le détournement de certaines voies de signalisation à l'avantage de la cellule tumorale (**Padua et Massagué, 2009**). L'IL-10 peut aussi être sécrétée par les cellules tumorales et va changer le profil de la réponse immunitaire en inhibant les cellules dendritiques et en favorisant l'apparition de lymphocytes Tregs (**Elkord et al., 2010**).

- **Cytokines pro-inflammatoires** : telles qu'IL-6 et IL-23. Ces cytokines contribuent à la carcinogénèse et à la croissance tumorale en entretenant l'inflammation chronique favorable à ce développement. De plus elles favorisent la production d'autres cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-17.

- **Les MIC solubles** : des molécules inhibitrices du récepteur NKG2D, activateur indispensable de la cytotoxicité des cellules NK et des CTL peuvent également être produites par les cellules tumorales et induire une altération des réponses immunitaires anti-tumorales (**Vitale et al., 2014**).

### IV.3.5. Dérégulation des signaux d'apoptose :

- **Surexpression de molécules anti-apoptotiques** comme bcl-2 (**Kirkin et al., 2004**).

- **Activation constitutive de p53** ou autres oncogènes codants pour des protéines anti-apoptotiques (**Erb et al., 2005**).

- **Inhibition des cascades de caspases** qui devraient aboutir à l'apoptose des cellules tumorales (**Erb et al., 2005**).

- **Expression de Fas-L** à la surface des cellules tumorales qui vont induire l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques (**Whiteside, 2007**).

### IV.3.6. Barrière physique :

De nombreux types de tumeurs surexpriment des molécules telles que des fibres de collagène ou des facteurs de coagulation qui vont former une barrière physique entre les cellules tumorales et le système immunitaire, une sorte de "site de privilège immunitaire" où les cellules immunitaires n'ont pas accès et où la tumeur peut donc proliférer (**Rygiel et al., 2011**).

## MATERIEL ET METHODES

---

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique du centre Pierre et Marie Curie d'Alger (CPMC), durant une période de 6 mois (Mars à aout 2016). Nous avons analysé l'infiltrat lymphocytaire au niveau de tumeurs mammaires triple négatives de 10 patientes, avant et après chimiothérapie.

### I. Matériel

#### I.1. Matériel biologique :

Nous avons analysé deux types de tissu tumoral de patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif. Ces patientes ont bénéficié de deux protocoles de chimiothérapie néoadjuvante, entrant dans le cadre d'un essai clinique (Annexe III). Il s'agissait de :

- ✓ 10 pièces biopsiques obtenues avant chimiothérapie.
- ✓ 10 pièces opératoires obtenues après 6 cycles de chimiothérapie néoadjuvante.

#### Matériel non biologiques

Tous les appareils, réactif et solutions que nous avons utilisés sont mentionnés dans (Annexe IV).

### II. Méthodes

#### II.1. Démarche expérimentale

Dans le diagramme suivant, nous avons résumé l'ensemble de la démarche expérimentale, adoptée dans notre étude. Nous avons établi les étapes suivantes :

- A partir des données archivées, nous avons obtenus l'âge des 10 patientes ainsi que la taille de leur tumeur.
- A partir des microbiopsies mammaires, nous avons, réalisé une étude histologique pour en déterminer le type, le grade SBR (Annexe V) et les récepteurs hormonaux.
- Nous avons évalué le taux de réponse pathologique selon la classification de Sataloff (AnnexeII).
- Nous avons examiné les lames issues de la coloration hématoxyline-éosine (HE), afin de quantifier l'infiltrat des cellules immunes et leur disposition dans le tissu tumoral à partir des microbiopsies et des pièces opératoires. L'appréciation de cet infiltrat (cellules immunes en périphérie, dans le stroma tumoral, ou en intra-tumoral) s'est faite *via* une méthode semi-

## MATERIEL ET METHODES

---

quantitative, qui nous a permis de révéler quatre niveaux d'infiltration (allant du plus faible au plus intense), selon la saturation du stroma tumoral par les cellules immunes :

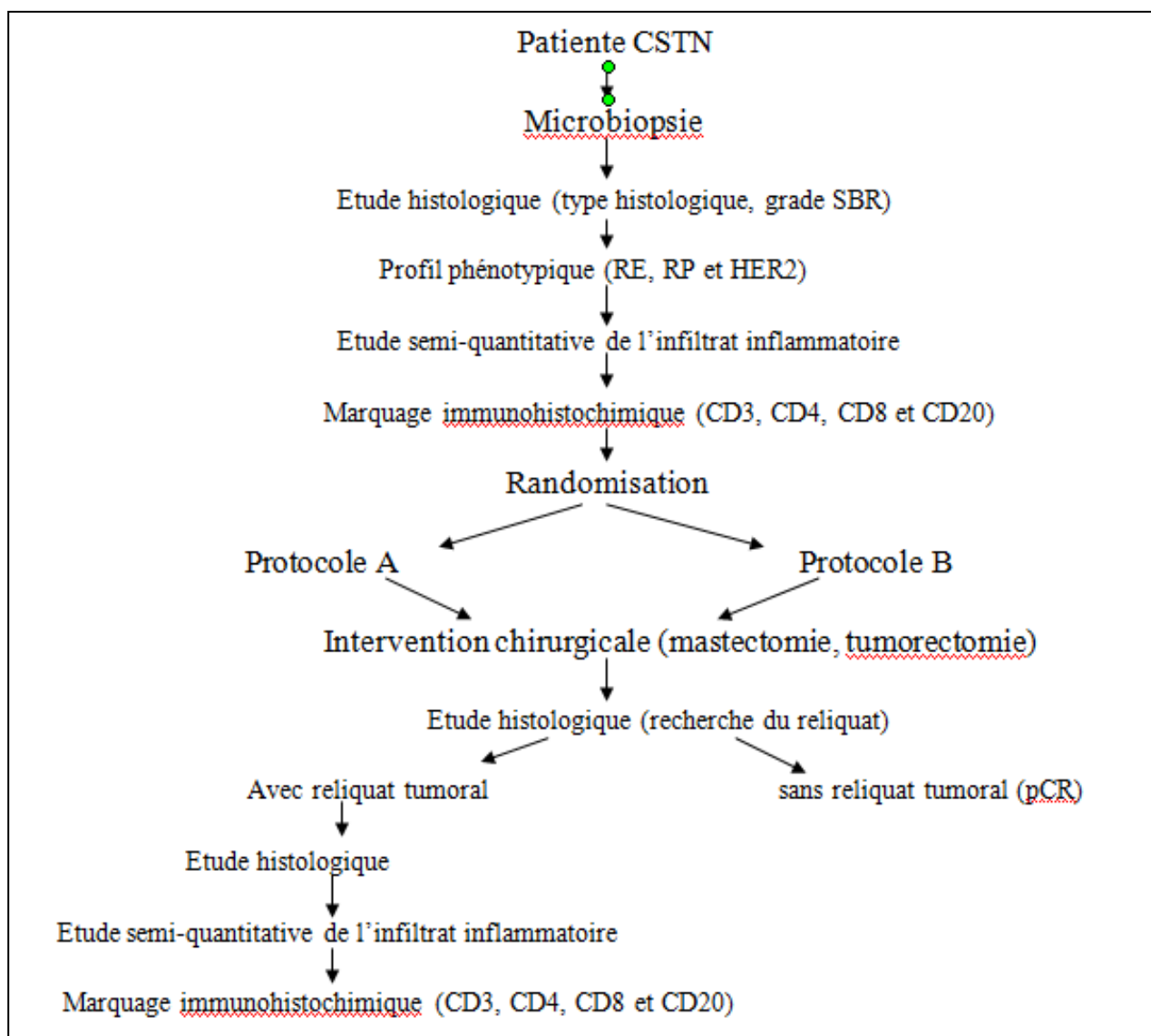
- ✓ Niveau 0 : Absence de cellules immunes.
- ✓ Niveau 1 : les cellules immunes représentent 1 à 25%.
- ✓ Niveau 2 : Les cellules immunes représentent 25 à 50 %.
- ✓ Niveau 3 : les cellules immunes représentent 50 à 75 %.
- ✓ Niveau 4 : les cellules immunes représentent 75 à 100 %.

- Le type d'infiltrat a été déterminé par une étude immunohistochimique, en ciblant les populations lymphocytaires suivantes :

- ✓ Lymphocytes T (anticorps anti-CD3).
- ✓ lymphocytes B (anticorps anti-CD20).
- ✓ lymphocytes CD4+ (anticorps anti-CD4).
- ✓ lymphocytes CD8+ (anticorps anti-CD8).

**Remarque : L'étude macroscopique ainsi que la coloration HE sont résumées dans les**

**(Annexe VI)**



**Figure 2 :** Diagramme représentant la démarche expérimentale.

## II. Etude de l'infiltrat lymphocytaire par immunohistochimie

### Principe :

C'est une technique qui permet l'identification in situ, sur coupe histologique, d'un antigène cellulaire ou tissulaire. Cette technique est basée sur une réaction spécifique antigène-anticorps utilisant des anticorps mono- ou polyclonaux conjugués à une substance fluorescente ou à une enzyme qui réagit avec son substrat en donnant une coloration facile à observer au microscope optique en lumière blanche. Ainsi, on peut visualiser et quantifier la molécule cible sur une coupe tissulaire. Elle peut être réalisée sur du matériel fixé, inclus en paraffine et stocké sur une longue période. Cependant l'IHC



## MATERIEL ET METHODES

---

n'est fiable que si au préalable toutes les étapes de la technique, depuis la fixation des tissus jusqu'à la révélation du complexe Ag-Ac, ont été bien contrôlées. Pour réaliser notre partie immunohistochimique, nous avons utilisé un Kit DAKO (Référence K8000).

### ✓ Etape 1 : Préparation des lames (Silanisation des lames)

- Pour la technique immunohistochimique, nous avons travaillé avec des lames silanisées (chargées positivement, pour une meilleure adhérence des tissus), qui sont préparées après immersion des lames dans un bac qui contient une solution de silane ( $\text{SiH}_4$ ) diluée à 7% (7ml de silane/100ml d'acétone) pendant 2 à 3 min. Ensuite, un rinçage dans un autre bac contenant de l'acétone, puis un second rinçage à l'eau distillée. Le séchage est réalisé à température ambiante et à l'abri de la poussière.

- Nous avons étalé les prélèvements sur des lames silanisées dans un bain marie qui contient de l'eau chauffée à 40°C. Un numéro du bloc et l'anticorps utilisé sont marqués sur la lame à l'aide d'un crayon. Les lames sont incubées dans une étuve à 37°C pendant une 24h

- Avant de procéder à la coloration, les coupes de tissus fixés au formol (pré requis indispensable à l'obtention des tests IHC fiables) et inclus dans de la paraffine doivent être soumises à **un déparaffinage** au xylène (3 bains, 5 min chacun), **une réhydratation** à l'éthanol de concentration décroissante (3 bains, 5 min chacun) puis un rinçage à l'eau distillée.

### ✓ Démasquage antigénique :

Cette étape vise à briser les ponts créés par le formol lors de la fixation afin de rendre les sites antigéniques accessibles, en utilisant un tampon à pH= 9. Les lames sont plongées dans une solution TRS (Target Retrieval Solution. Dako référence K8000) préchauffée dans un bain marie à 95° pendant 40 minutes. Les lames sont ensuite retirées et maintenues à température ambiante pendant 20 min, avant d'être rincées à l'eau distillée d'abord, afin d'éviter un choc thermique puis au PBS (Phosphate Buffered Saline, référence K8000/K8002).

### ✓ Blocage de peroxydase endogène :

Les peroxydases endogènes sont des enzymes responsables de l'apparition d'un marquage non spécifique faussant l'interprétation du profil IHC, d'où la nécessité de bloquer leur activité en utilisant une solution de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 3% (référence K8000). La zone étudiée est délimitée à l'aide du DAKO Pen (référence S2002) aux propriétés hydrophobe et insoluble dans

## MATERIEL ET METHODES

---

l'acétone et l'alcool, ce qui permet d'éviter le débordement des différents réactifs lors de la manipulation. Dès lors, les tissus sont mis à incuber pendant 5 minutes dans quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène. Enfin, les lames sont rincées à l'eau distillée puis immergées dans le tampon PBS.

### ✓ Etape 2 : Incubation avec l'anticorps primaire

Nous avons ajouté (200-300µl) d'anticorps primaire (anticorps de RA, référence S2003), cette solution a été diluée à 2% (2µl de l'anticorps RA /100 µl de diluant (Référence S2022)). Une goutte de cette préparation a été déposée sur chaque lame pendant 30 minutes dans une chambre froide, elles sont ensuite rincées au PBS (2 fois, pendant 5min).comme mentionné dans le tableau 4 ci- dessous :

## MATERIEL ET METHODES

**Tableau II : Les anticorps primaire utilisés**

Anticorps	Clone	Type	Laboratoire	Référence	Dilution
CD3	2B11 + pD7/26	POLYCLONAL RABBIT ANTI- HUMAN	DaKoCytomation	IR503	Pré dilué
CD20	F 7.2.38	Monoclonal Mouse Anti- Human	DaKoCytomation	M7254	Pré dilué
CD4	JCB117	Monoclonal Mouse Anti- Human	DaKoCytomation	M7050	Pré dilué
CD8	123 C3	Monoclonal Mouse Anti- Human	DaKoCytomation	M7304	Pré dilué
Ki 67	p G- M1	Monoclonal Mouse Anti- Human	DaKoCytomation	M0814	

### ✓ Etape 3 : Incubation avec l'anticorps secondaire

Les lames sont incubées avec la solution Nous avons ajouté quelques gouttes de la solution LABELLED polumer-HRP anti-mouse (Référence K8000), qui est un polymère de dextrane couplé à des molécules de peroxydase et à des molécules d'anticorps secondaires de souris pendant 30 min puis dans du PBS (2 fois, pendant 5 min).

### ✓ Etape 4 : Révélation

La révélation est réalisée en utilisant le mélange constitué de la solution DAB (DiAmino Benzidine, Référence K8000) (1ml) et une goutte de chromogène rouge. Quelques gouttes de ce mélange sont appliquées sur les lames (5 min) qui ensuite sont rincées à l'eau distillée. La HRP oxyde le DAB en cas de positivité et aboutit à l'apparition d'un précipité brun visible en microscopie optique dont l'intensité est d'autant plus importante que l'antigène est présent à la surface membranaire.

### ✓ La contre coloration

Cette étape rend possible le repérage topographique du marquage IHC et permet la mise en évidence des autres constituants cellulaires. Ces lames sont contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer puis rincées à l'eau courante, une coloration nucléaire bleue est visualisée. Une post contre-coloration à l'eau ammoniacuée et un rinçage à l'eau distillée sont réalisés.

Le montage des lames : Les coupes de tissus colorées sont ensuite montées à l'aide d'un milieu de montage aqueux de type Faramount Aqueous Mounting Medium (Référence S3025) et une lamelle (20x40mm) est ensuite posée sur les lames, qui ainsi, seront prêtes à l'observation.

### **Lecture:**

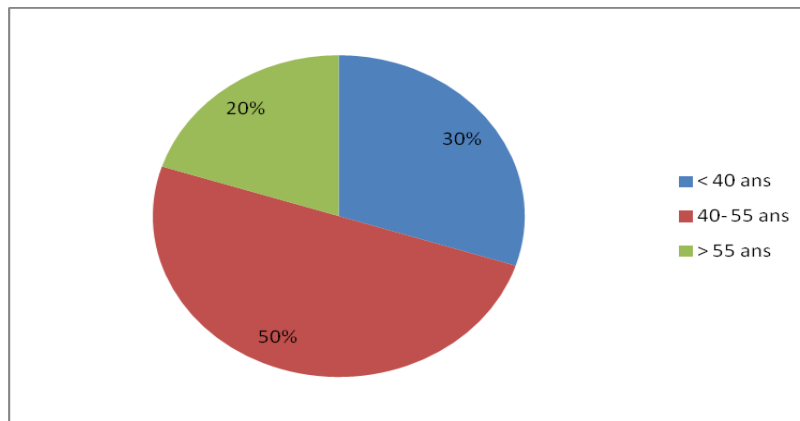
Les lames d'IHC sont observées sous microscope optique, grossissement x100, x400. Des photos sont prises.

## RESULTATS

Notre étude a été réalisée sur 10 patientes, subdivisées en 2 groupes : 5 patientes avec reliquat tumoral et 5 patientes sans reliquat tumoral. Les différents paramètres cliniques et anatomopathologiques des patientes sont résumés dans ce qui suit.

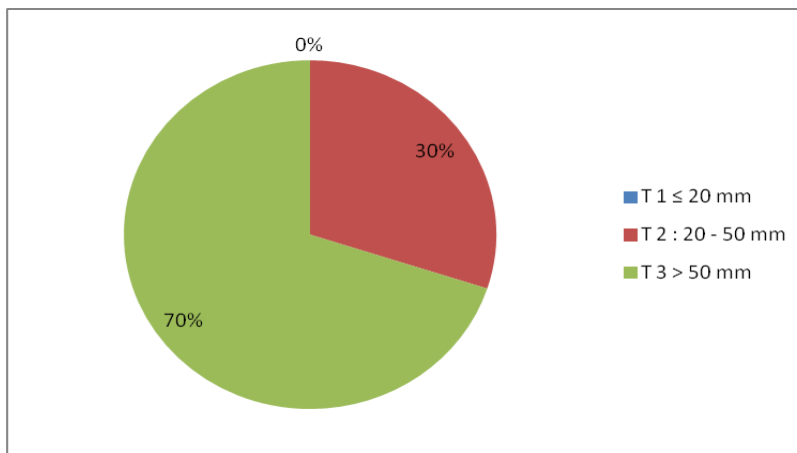
### I. Caractéristiques cliniques et histologiques:

L'âge des patientes variait entre 36 et 65 ans, avec une moyenne de 42 ans. 50 % des patientes avaient un âge se situant entre 40 et 50 ans, 30 % avaient moins de 40 ans et 20% avaient un âge supérieur à 55 ans (**figure3**).



**Figure 3 : Représentation graphique selon les tranches d'âges.**

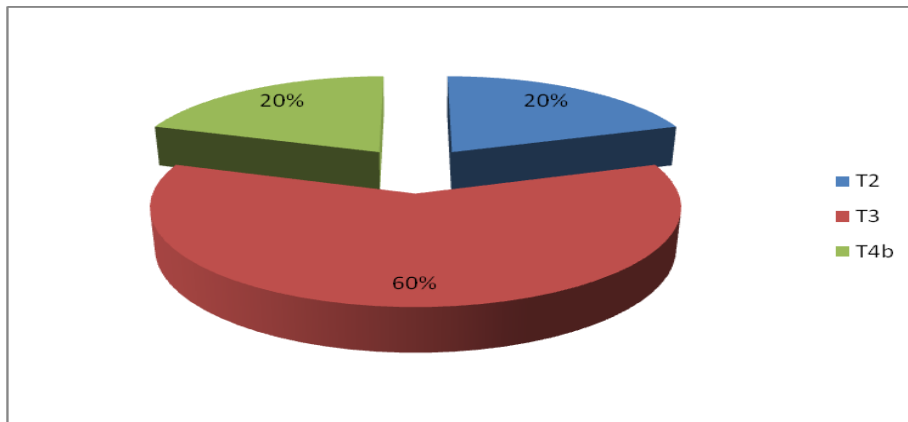
La taille tumorale variait de 45 mm à 130 mm, avec une moyenne de 71.5mm. La majorité des tumeurs (70%) avaient un diamètre supérieur à 50mm. Le reste faisait entre 20 et 50 mm de diamètre (**figure 4, Figure 6 et 7**).



**Figure 4 : représentation graphique selon la taille tumorale**

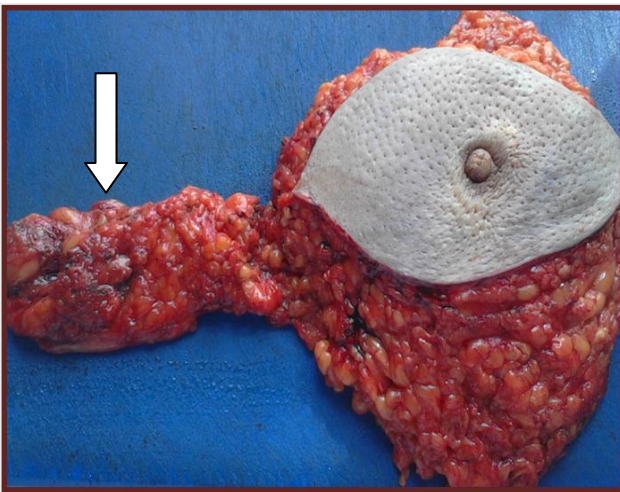
## RESULTATS

Toutes les patientes avaient un carcinome canalaire infiltrant de grade III de SBR (annexe VII), dont 60% était de stade T3 (**figure 5**)

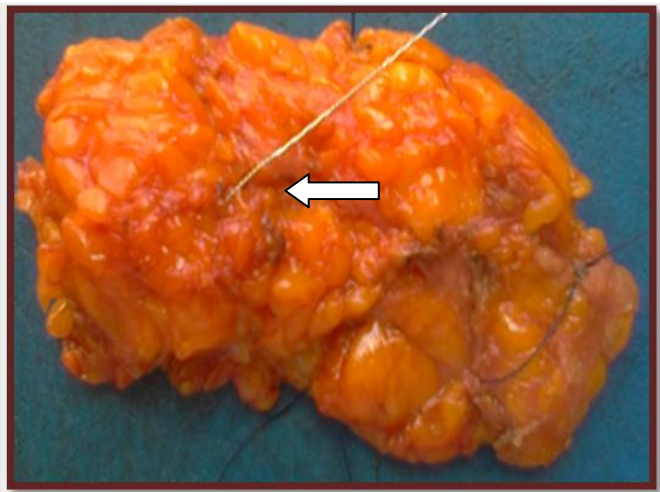


**Figure 5 : représentation graphique selon la classification TNM**

L'étude immunohistochimique des trois biomarqueurs RE, RP et HER2 s'est révélée négative. Il s'agissait donc d'un carcinome canalaire infiltrant triple négatif (TNBC).



**Figure 6 : Mastectomie avec curage axillaire (Flèche blanche)**



**Figure 7: Tumorectomie muni d'un harpon (Flèche blanche)**

### II. Résultat de l'étude de la réponse pathologique selon la classification de sataloff :

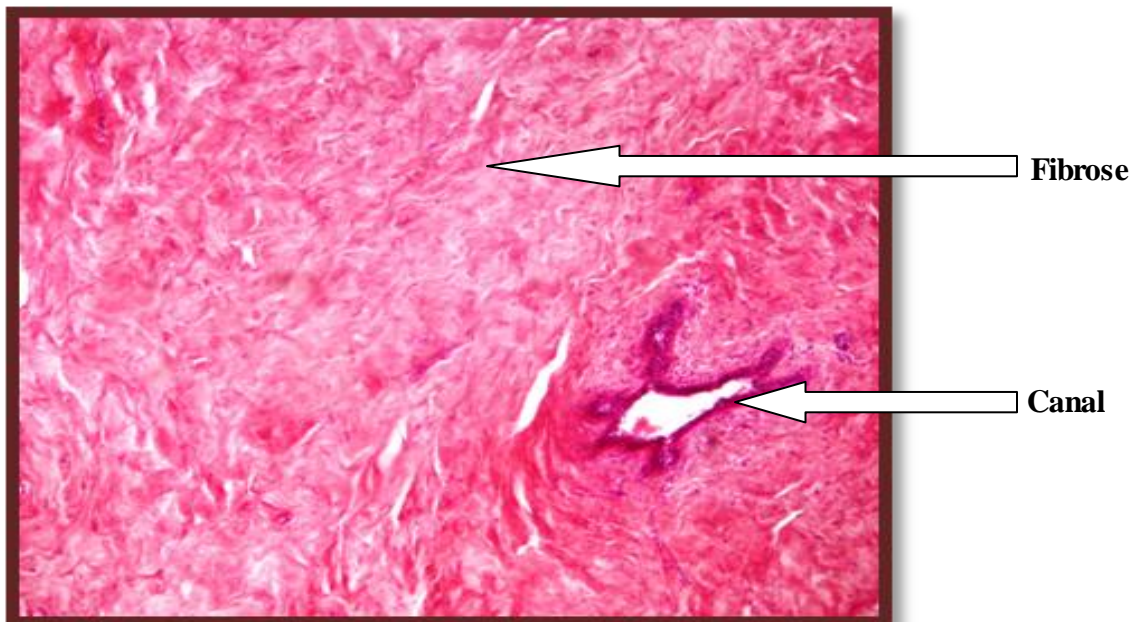
Après la chimiothérapie, 50% de patientes avait une réponse histologique partielle sur le sein (TB, TC), et 50% une réponse histologique complète (TA). La réponse histologique

## RESULTATS

totale au niveau des ganglions (NA) concernait 70 % des patientes (**Tableau III, figures 8, 9, 10 et 11**).

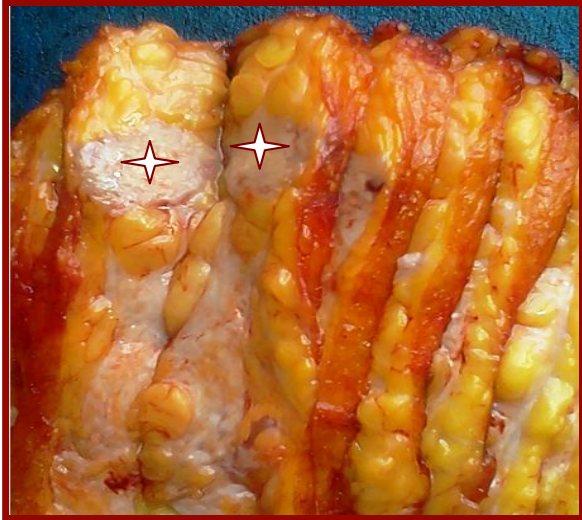
**Tableau III: Réponse histologique à la chimiothérapie.**

	Réponses à la chimiothérapie au niveau du sein.	Réponses à la chimiothérapie au niveau des adénopathies.	Protocole thérapeutique
1 <sup>er</sup> cas	TC	NA	B
2 <sup>e</sup> cas	TB	ND	B
3 <sup>e</sup> cas	TB	NA	A
4 <sup>e</sup> cas	TB	NB	A
5 <sup>e</sup> cas	TB	NB	A
6 <sup>e</sup> cas	TA	NA	B
7 <sup>e</sup> cas	TA	NA	B
8 <sup>e</sup> cas	TA	NA	A
9 <sup>e</sup> cas	TA	NA	A
10 <sup>e</sup> cas	TA	NA	B



**Figure 8 :** Coupe histologique d'une réponse pathologique complète HE (Gx40)

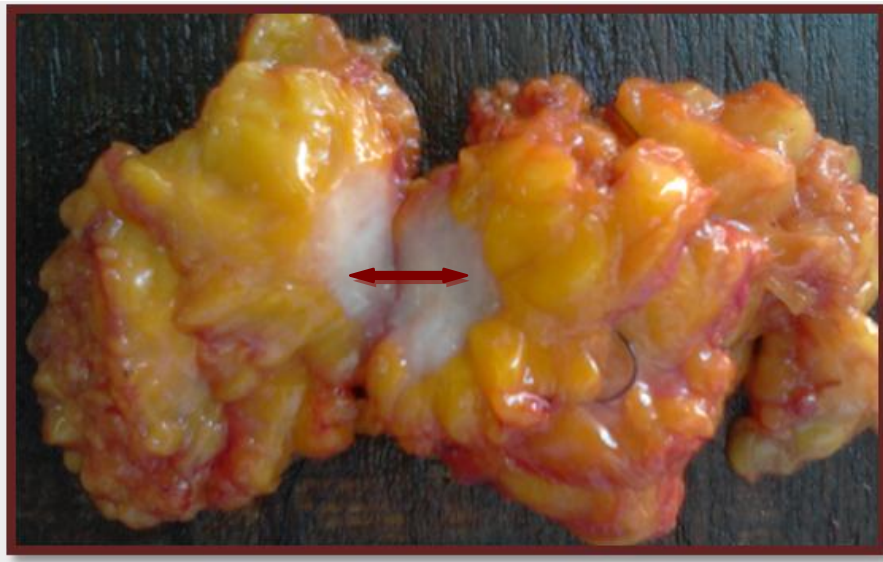
## RESULTATS



**Figure 9** : mastectomie avec reliquat (Etoiles)



**Figure 10** : Tumorectomie sans reliquat tumorale (Flèche)



**Figure 11**: Tumorectomie sans reliquat tumorale (flèche)



## RESULTATS

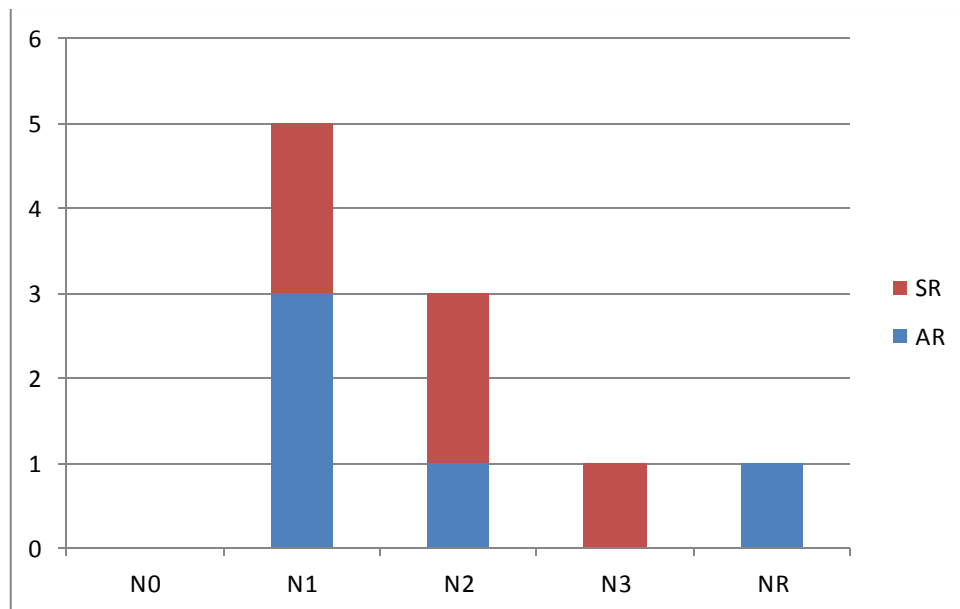
### III. Résultats de l'étude de l'infiltrat inflammatoire sur coupes histologiques:

L'analyse microscopique des tumeurs nous a révélé, après coloration HE et étude morphologique, la présence de différents niveaux de l'infiltrat inflammatoire.

#### III.1. Résultats de l'étude de l'infiltrat inflammatoire au niveau des microbiopsies avec ou sans reliquat:

##### ✓ Périphérie de la tumeur :

- La répartition de l'infiltrat inflammatoire en périphérie était globalement de 50% pour le niveau 1+, de 30% pour le niveau 2+, et 10% pour le niveau 3+.
- 75% des patientes avec reliquat tumoral avaient 75% d'infiltrat de niveau 1+, et 25% de niveau 2+.
- 80% des patientes sans reliquat tumoral avaient un niveau d'infiltrat réparti avec égalité entre les niveaux 1+ et 2+ en situation périphérique de la tumeur, et 20% de niveau 3+ (Graphe 1).

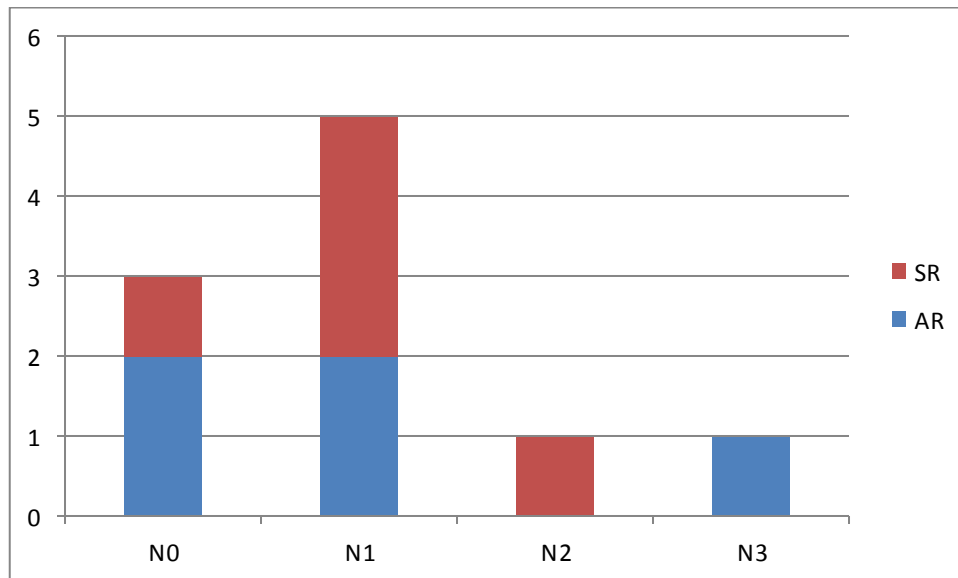


**Graphe 1: distribution de l'infiltrat inflammatoire en situation périphérique en fonction de nombre de patientes et de niveau d'infiltrat dans la microbiopsie AR: avec reliquat SR: sans reliquat**

## RESULTATS

### ✓ **Stroma tumoral :**

- Le taux d'infiltrat inflammatoire était de 50% pour le niveau 1+, 30% sans infiltrat et 10% pour les niveaux 2+et 3+.
- 60% des patientes sans reliquat sont de niveau 1+, 20% de niveau2+ et 0 (Graphe 2).
- 80% des patientes avec reliquat avaient un niveau d'infiltrat reparti entre 0 et 1+ au niveau du stroma tumoral et de 20% de niveau 3+.



**Graphe 2: distribution de l'infiltrat inflammatoire fonction de nombre de patientes et de niveau d'infiltrat au niveau du stroma dans de la biopsie.**

### ✓ **intra-tumeur :**

- 100% des patientes sans reliquat n'ont pas d'infiltrat inflammatoire, par ailleurs seul deux cas ont présenté quelques cellules lymphocytaires (patientes avec reliquat) (Tableau IV).

## RESULTATS

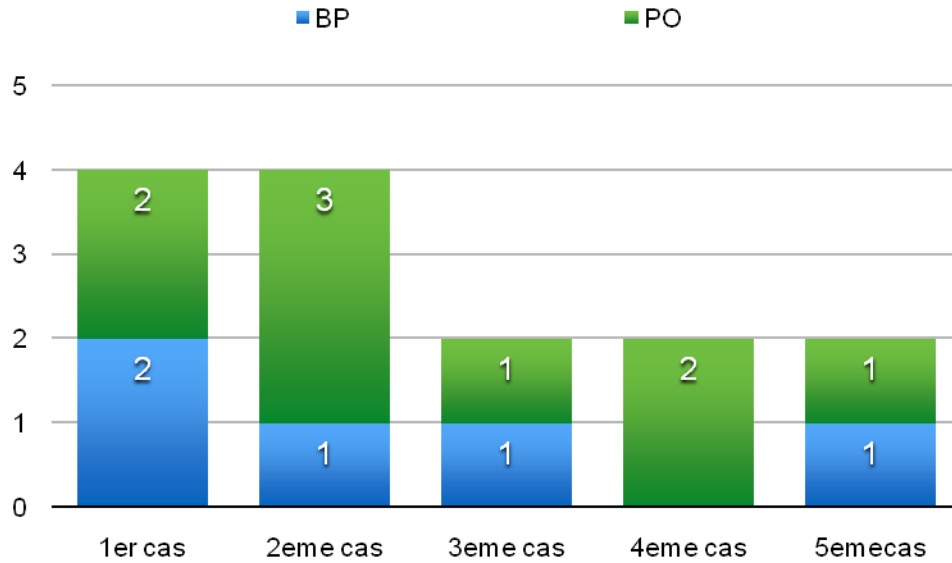
**Tableau IV : Niveaux d'infiltrations lymphocytaires au niveau des microbiopsies (avec et sans reliquat)**

	HE		
	PE	ST	IT
Avec reliquat			
1 <sup>er</sup> cas	2+	1+	présence
2 <sup>e</sup> cas	1+	0	0
3 <sup>e</sup> cas	1+	1+	0
4 <sup>e</sup> cas	NR	3+	présence
5 <sup>e</sup> cas	1+	0	0
Sans reliquat			
1 <sup>er</sup> cas	2+	1+	0
2 <sup>e</sup> cas	1+	0	0
3 <sup>e</sup> cas	2+	1+	0
4 <sup>e</sup> cas	1+	1+	0
5 <sup>e</sup> cas	3+	2+	0

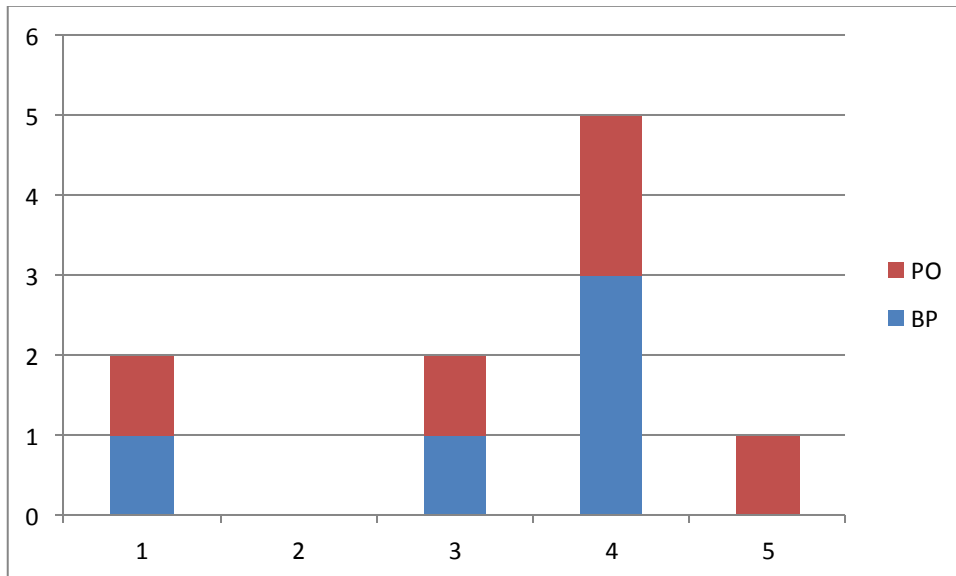
### III.2. Etude de l'infiltrat inflammatoire au niveau des microbiopsies et des pièces opératoires avec reliquat tumoral :

Les taux de l'infiltrat inflammatoire, sur microbiopsies et sur la pièce opératoire étaient globalement identiques, concernant la périphérie et le stroma (**Grphe 3 et 4, tableau V**).

## RESULTATS



**Graphe 3 : distribution de l'infiltrat inflammatoire en situation périphérique au niveau des microbiopsies et des PO (avec reliquat).**



**Graphe 4 : distribution de l'infiltrat inflammatoire du stroma tumoral fonction de nombre de patientes et de niveau d'infiltrat au niveau des microbiopsies et des PO (avec reliquat)**

## RESULTATS

**Tableau V : les sous-populations de lymphocyte infiltrant la tumeur (avec reliquat)**

Avec reliquat :		HE		
		PE	ST	IT
1 <sup>er</sup> cas	biopsie	2+	1+	présence
	PO	2+	1+	présence
2 <sup>eme</sup> cas	biopsie	1+	0	0
	PO	3+	0	0
3 <sup>eme</sup> cas	biopsie	1+	1+	0
	PO	1+	1+	0
4 <sup>eme</sup> cas	biopsie	NR	3+	présence
	PO	2+	2+	présence
5 <sup>eme</sup> cas	biopsie	1+	0	0
	PO	1+	1+	0

**HE\*** : hématoxyline-éosine, **PE\*** : péri tumoral, **ST\*** : stroma, **IT\*** : inter tumoral, **PO\*** : pièce opératoire **NR \*** : non réalisable.

✓ **Périphérie de la tumeur :**

- 60 % sont de niveau 1+ au niveau de la biopsie, et 40 % se répartissent avec égalité entre le niveau 1+ (**Figure 12A**) et le niveau 2+ (**Figure 12B**).

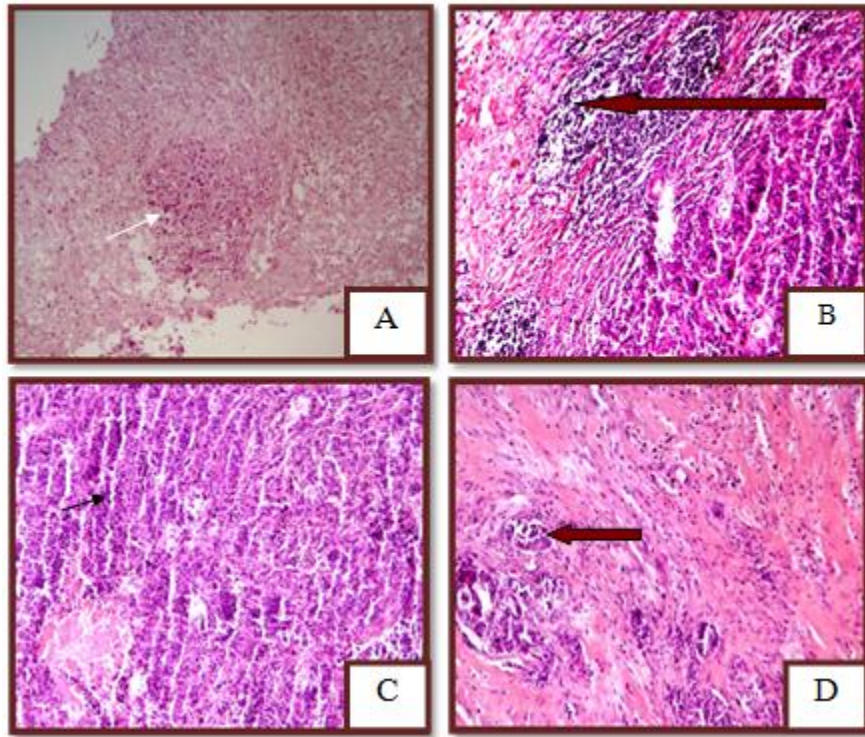
✓ **Stroma tumoral :**

- Nous retrouvons la même répartition de l'infiltrat entre la biopsie et les pièces opératoires dans le stroma tumorale, 60% avec un niveau 0 et 40 % avec le niveau 1+ (**Figure 12D**).

✓ **Intra-tumoral :**

## RESULTATS

- 60 % des tumeurs ne présentait pas d'infiltrat inflammatoire intra-tumoral. Le reste (40%) avait un infiltrat inflammatoire intra-tumoral dans la biopsie et la pièce opératoire (**Figure 12C**).



**Figure 12:** Coupe histologique d'un carcinome canalaire infiltrant dans la biopsie HE (Gx200, Gx400)

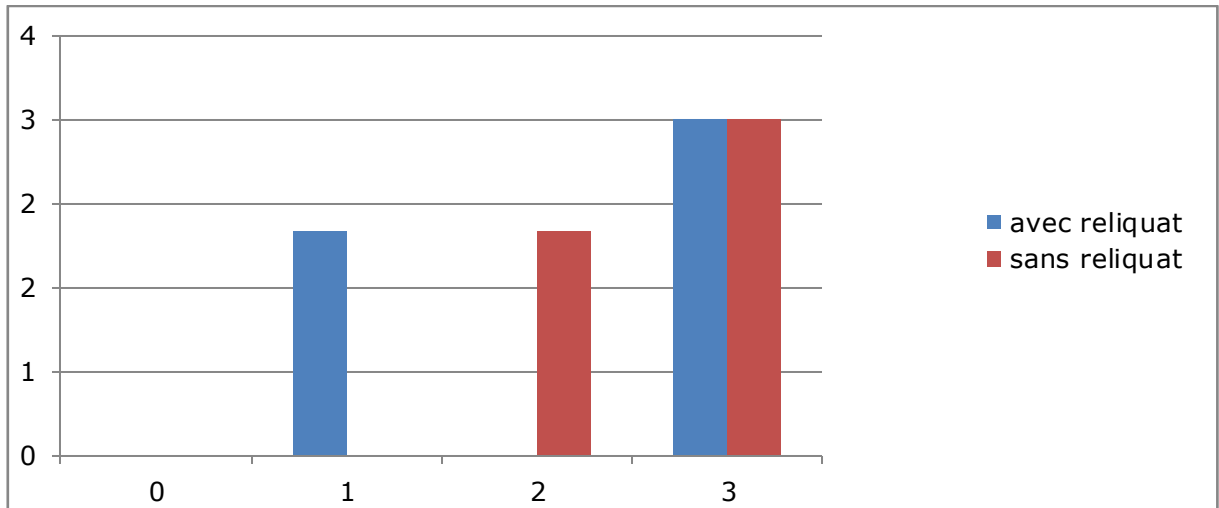
(A) Infiltrat inflammatoire de niveau 1 en situation péri-tumoral. (B) infiltrat inflammatoire de niveau 2 en situation péri-tumoral. (C) Présence d'infiltrat inflammatoire en situation intra-tumoral. (D) Rares cellules inflammatoires dans le stroma. (Voir flèche)

#### IV. Etude de l'infiltrat inflammatoire après immunohistochimie :

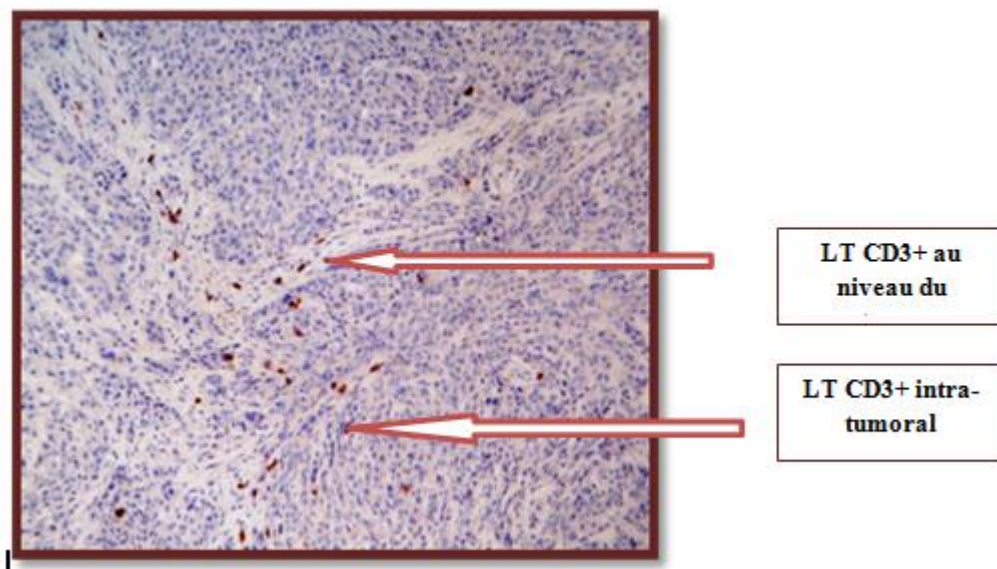
##### VI.1. Etude de l'infiltrat inflammatoire CD3+ au niveau des microbiopsies :

L'étude de la distribution du niveau d'infiltrat de CD3, nous a permis de constater un taux d'infiltration plus important chez les patients sans reliquat (**Grphe 5, figure13**).

## RESULTATS



**Graphe 5 : Distribution des lymphocytes CD3+ fonction de nombre de patientes et de niveau d'infiltrat au niveau des microbiopsies.**

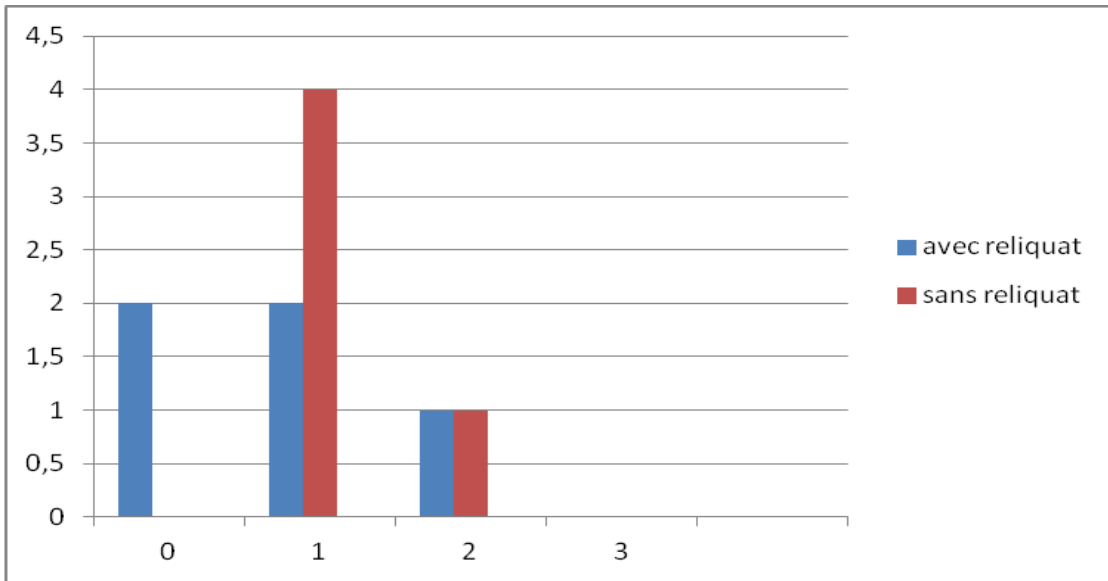


**Figure 13 :** Marquage immunohistochimique de l'infiltrat lymphocytaire T CD3+, Infiltrat lymphocytaire faible [1+] au niveau du stroma et intra-tumorale. IHC (Gx200)

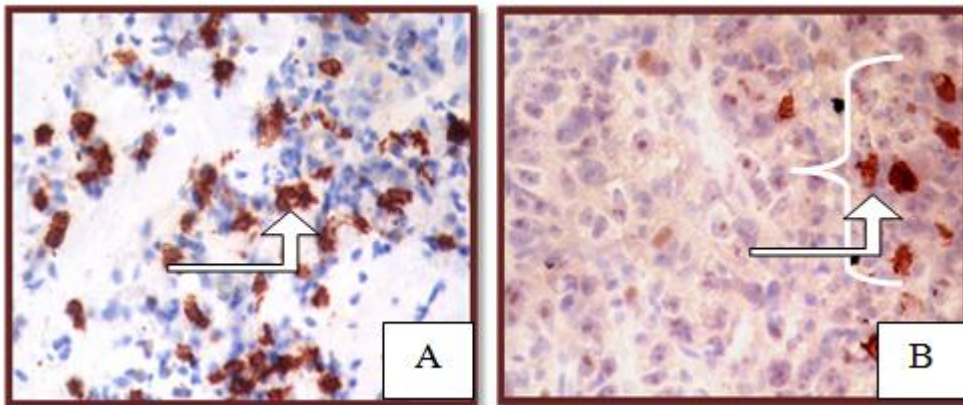
### **IV.2. Etude de l'infiltrat inflammatoire CD20 + au niveau des microbiopsies :**

L'étude de la distribution des cellules CD20+ retrouve chez les patientes sans reliquat un infiltrat léger (**Figure 14.B**) a modéré (**Figure 14.A**) plus important que chez les patientes avec reliquat (**Graphe 6**).

## RESULTATS



**Grphe 6 : Distribution des cellules lymphocytaires CD20 +en fonction de nombre de patientes et de niveau d'infiltrat dans microbiopsies.**



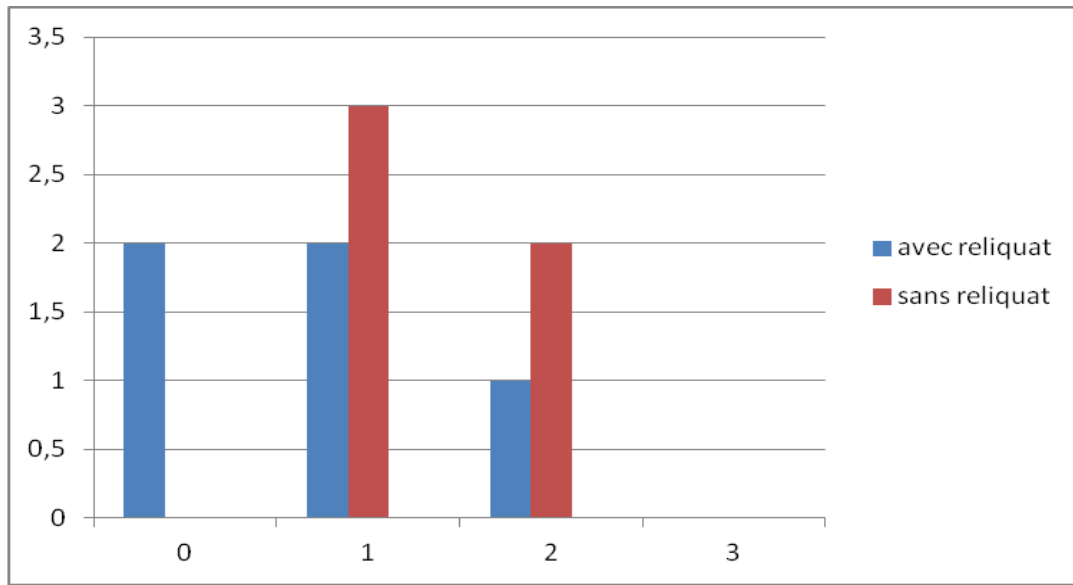
**Figure 14 :** marquage immunohistochimique de l'infiltrat lymphocytaire CD20+ au niveau des microbiopsies, (A) Infiltrat lymphocytaire modéré en situation péri-tumorale. (B) présence d'un infiltrat lymphocytaire minime CD20+ en situation intratumoral. IHC (Grx40) . ( } ) : Infiltrat minime. ( ↗ ) : cellule B



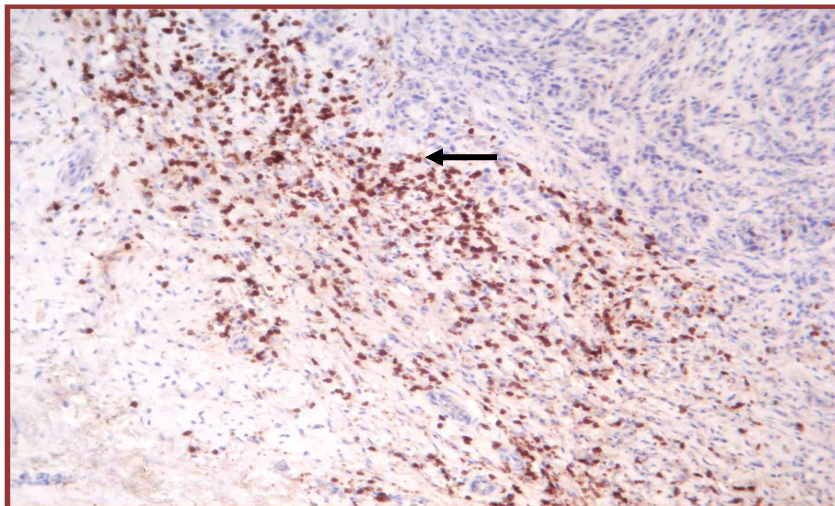
## RESULTATS

### IV.3. Etude de l'infiltrat inflammatoire CD4+ au niveau des microbiopsies :

L'analyse du graphe révèle que les lymphocytes CD4+ sont en nombre plus important avec des niveaux légers à modérés plus importants chez les patientes sans reliquat tumoral (**Graphe 7, figure 15**).



**Graphe 7 : Distribution des cellules lymphocytaires CD4 + fonction de nombre de patientes et de niveau d'infiltrat dans microbiopsies.**

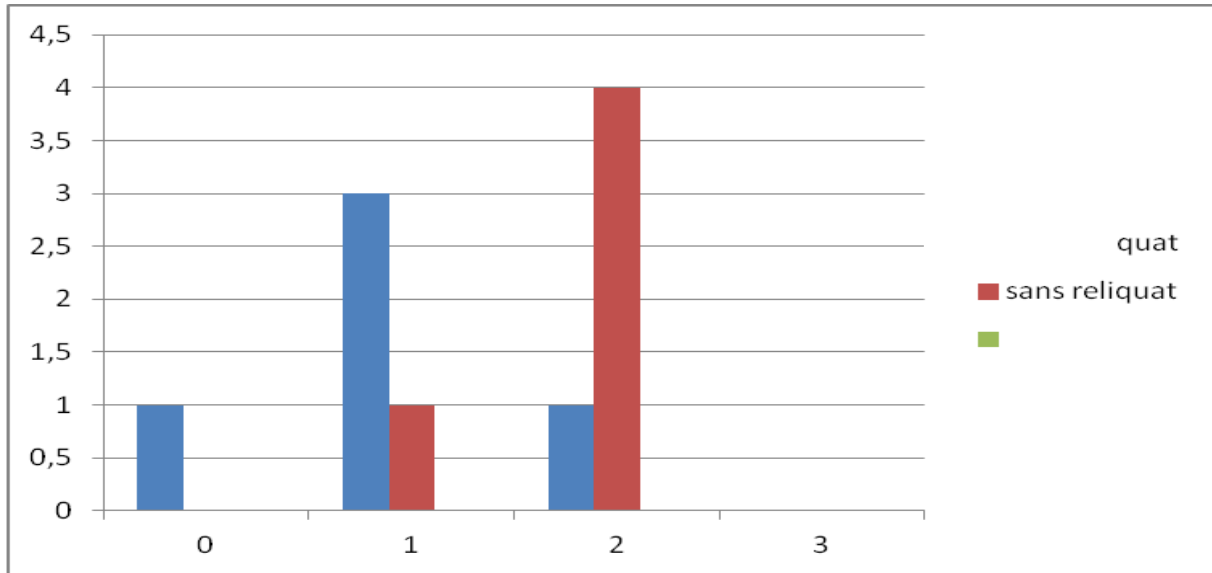


**Figure 15 : marquage immunohistochimique de cellules lymphocytaires CD4 +, montrant un infiltrat modéré en périphérie de la tumeur. IHC ( Grx20 ( → ) : cellule T CD4+**

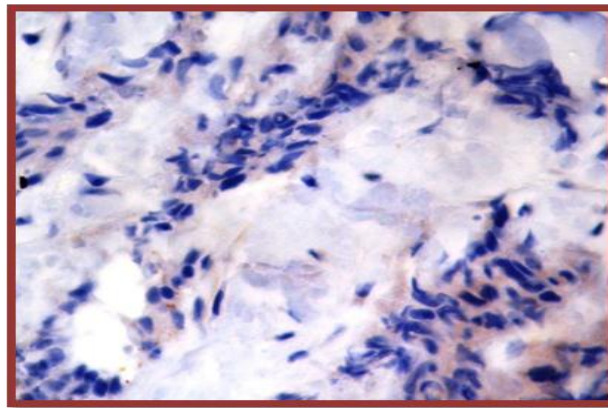
## RESULTATS

### IV.4. Etude de l'infiltrat inflammatoire CD8+ au niveau des micro-biopsies :

La distribution des cellules CD8+ révèle que la majorité des patientes sans reliquat tumoral avaient un infiltrat d'intensité modéré (Graphe 8, Figure 16)



**Graphe 8 :** Distribution des cellules lymphocytaires CD8+ fonction de nombre de patientes et de niveau d'infiltrat dans microbiopsies.



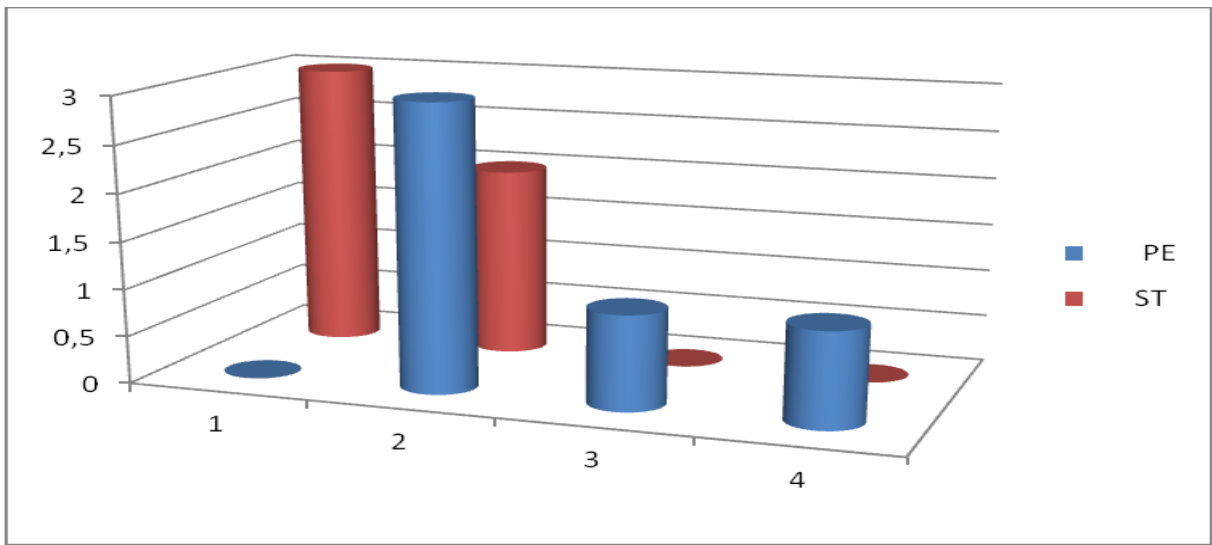
**Figure 16 :** Marquage immunohistochimique de cellules lymphocytaires CD8+, montrant l'absence de cellules CD8+ en intra-tumorale. IHC (Gx400)

### IV.5. Etude de l'infiltrat inflammatoire CD3+ au niveau des pièces opératoires :

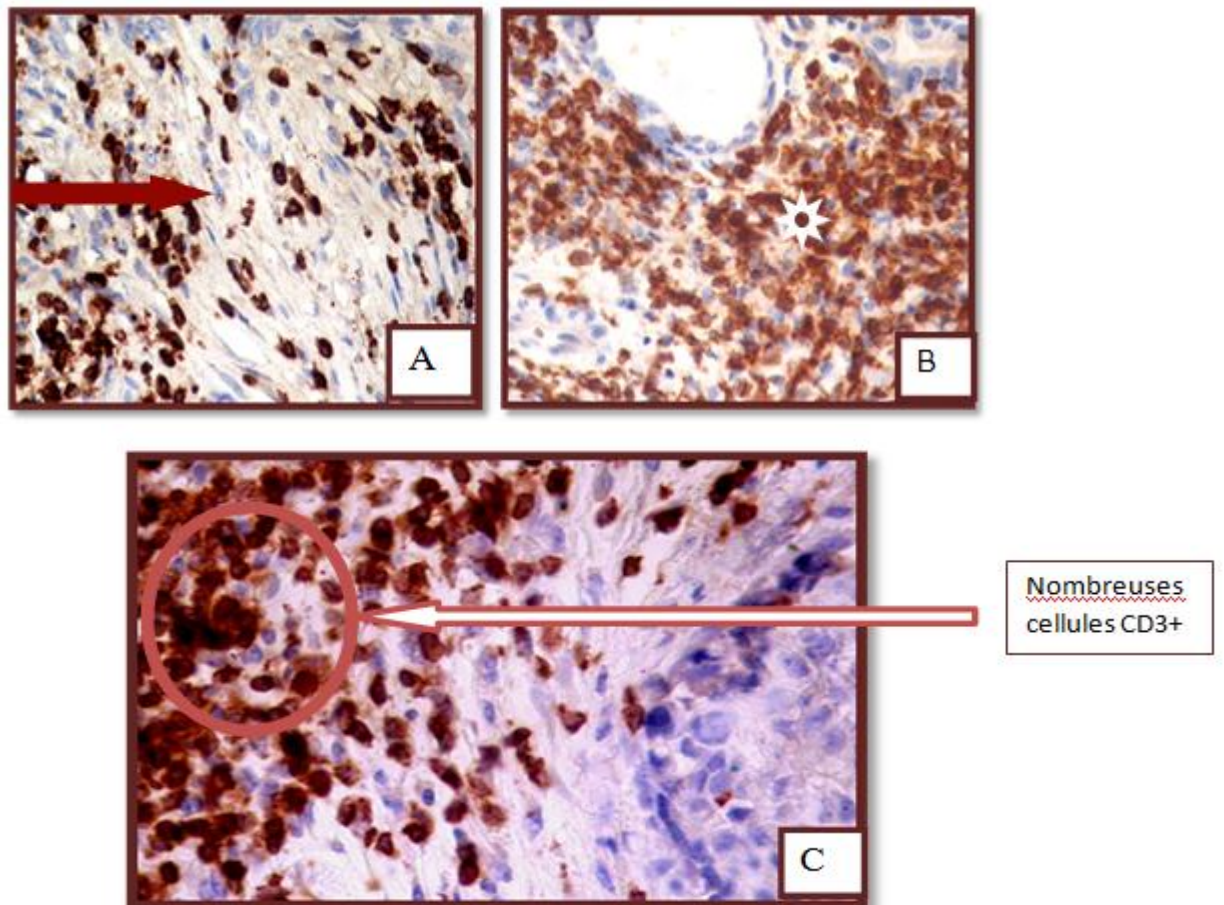
L'étude de la distribution des cellules CD3+, montre que les lymphocytes ont plus tendance à se disposer en périphérie de la tumeur avec des taux qui sont élevés. Au sein de la

## RESULTATS

tumeur les niveaux sont plus bas (Figures 17.B, C, A, Graphe 9). De plus, nous avons constaté la présence de CD3 dans 60% des cas en situation intra-tumoral.





**Graphe 9 : Distribution des cellules lymphocytaire CD3+ en fonction de nombre de patientes et de niveau d'infiltrat au niveau des pièces opératoires.**



**Figure 17 : Marquage immunohistochimique d'un infiltrat lymphocytaire CD3+ au niveau de la PO.**

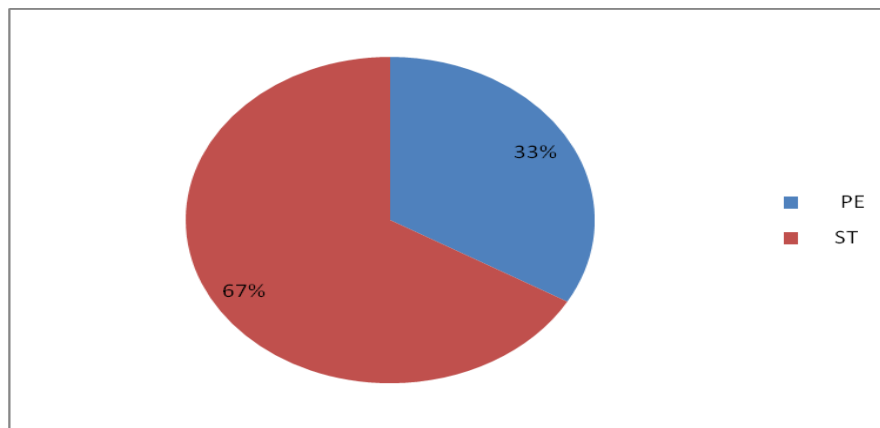
## RESULTATS

(A) Infiltrat lymphocytaire [2+] dans le stroma. (B) Infiltrat lymphocytaire [3+] en périphérie de la tumeur. (C) infiltrat lymphocytaire [4+] en périphérie de la tumeur.

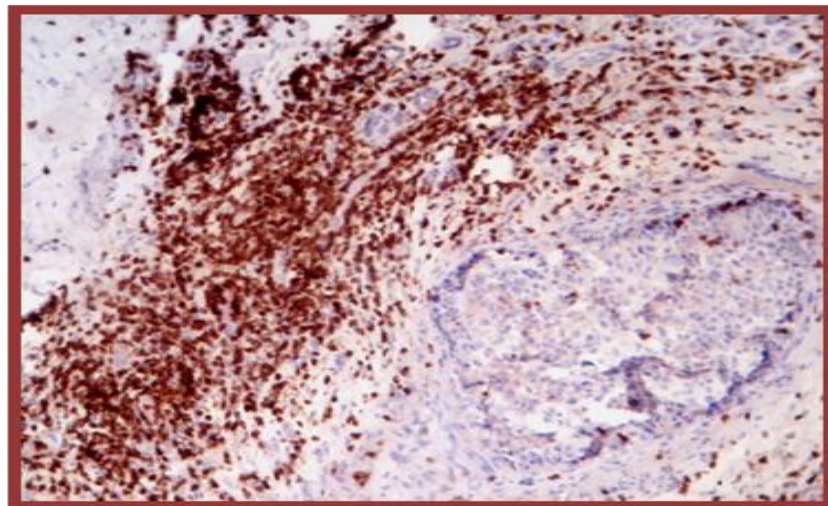
(IHC Gx40). (  ) : cellule du stroma. (  ) : infiltrat T CD3+

### IV.6. Etude de l'infiltrat inflammatoire CD20 + au niveau de la pièce opératoire :

L'étude immunohistochimique des cellules CD20 + (**figure18**) a révélé que dans la majorité des cas, soit 67%, l'infiltrat est intense au niveau du stroma tumoral. Au niveau de la périphérie, il représente 33% des cas d'un niveau 2+ (**Figure 19**). Il n'y avait pas de cellules CD20+ en situation intra-tumoral chez toutes les patientes.



**Figure 18 : Distribution des cellules lymphocytaires CD20+ au niveau des pièces opératoires.**

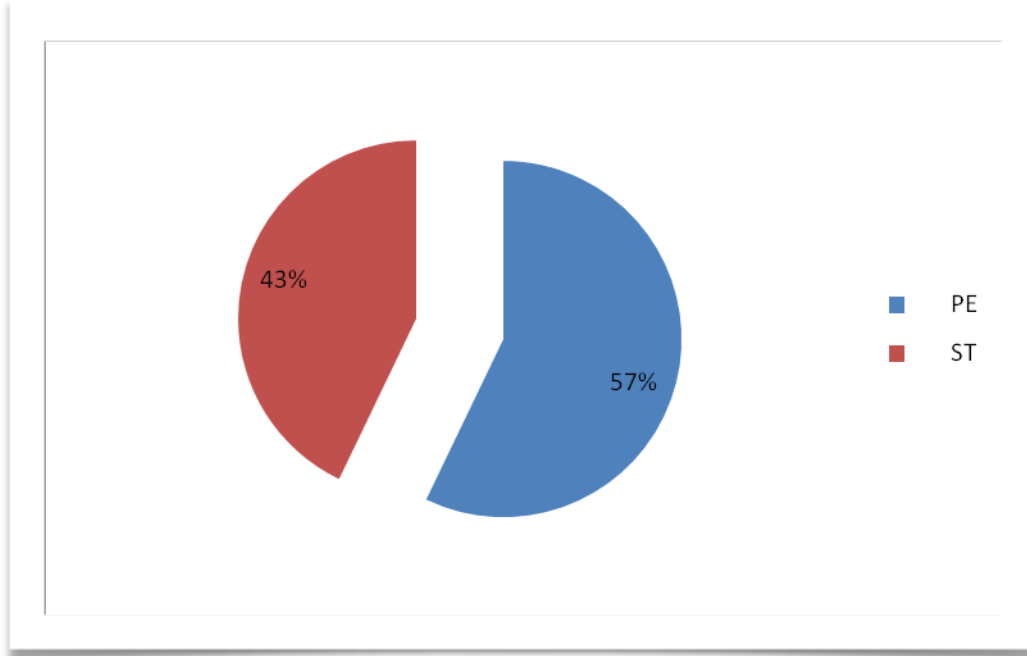


**Figure 19 : Marquage immunohistochimique de l'infiltrat lymphocytaire CD20+ au niveau de la PO, infiltrat de niveau 2+ en périphérie de la tumeur. IHC ( Grx200 ).il : infiltrat lymphocytaire**

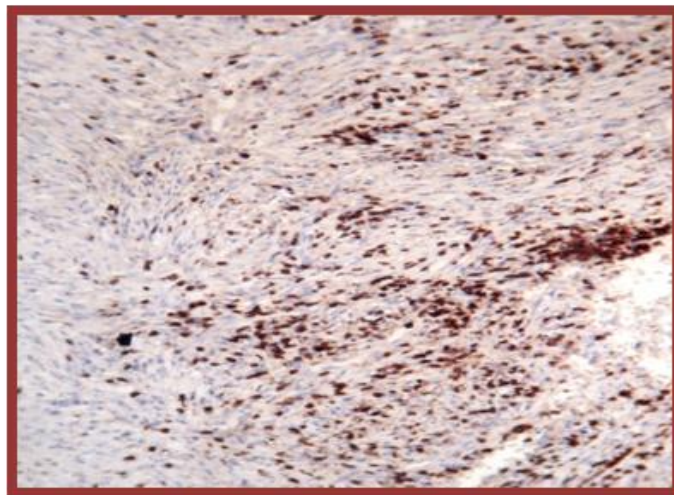
## RESULTATS

### IV.7. Etude de l'infiltrat inflammatoire CD4+ au niveau de la pièce opératoire :

La majorité des cellules inflammatoires 57% ont tendance à se disposer vers la périphérie (**figure21**) plutôt qu'au niveau du stroma tumoral soit dans 43% des cas (**figure20**). Il n'y avait pas de cellules CD4+ en situation intra-tumoral chez toutes les patientes.



**Figure 20 : Distribution des cellules lymphocytaires CD4+ au niveau des pièces opératoires.**

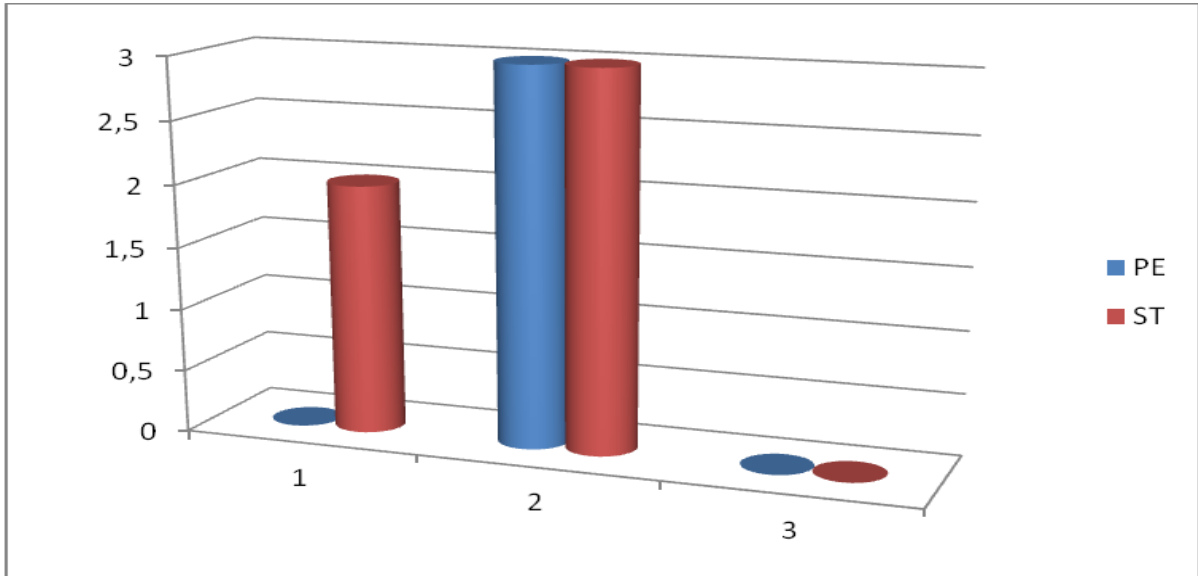


**Figure 21 : marquage immunohistochimique d'un infiltrat lymphocytaire CD4+ de niveau 2+ en périphérie de la tumeur, IHC (Gx200). (→) : T CD4+**

## RESULTATS

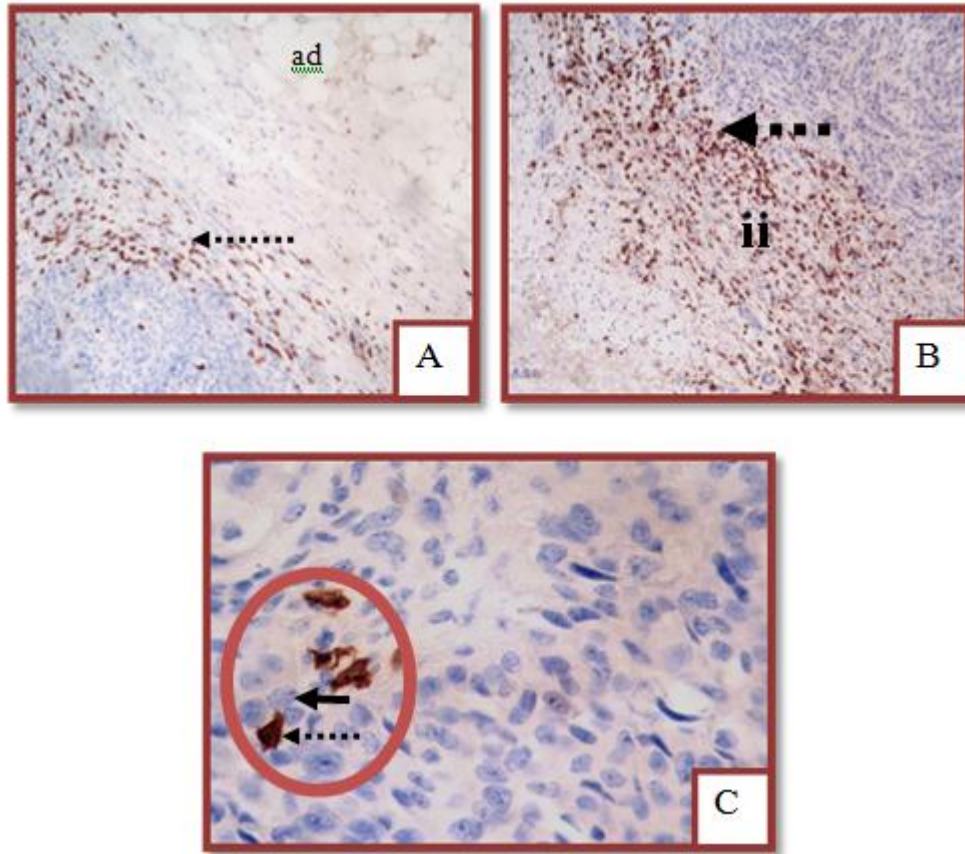
### IV.8. Etude de l'infiltrat inflammatoire CD8+ au niveau des pièces opératoires

Les cellules CD8+ se disposent dans 60% des cas à la fois en périphérie et au niveau du stroma tumoral (**graphe10, Figure 22.A et 22.B**). Nous avons remarqué la présence de cellules CD8+ dans 60% des cas en situation intra-tumoral (**Figure 22.C**).



**Grphe 10 : Distribution des cellules lymphocytaires CD8+ en fonction de nombre de patientes et de niveau d'infiltrat au niveau des pièces opératoires.**

## RESULTATS



**Figure 22 : marquage immunohistochimique de cellules lymphocytaires CD8+. IHC (Gx400 )**

(A) Infiltrat lymphocytaire CD8+ de niveau 1+ en périphérie de la tumeur (B) Infiltrat lymphocytaire CD8+ de niveau 2+ en périphérie de la tumeur. (C) présence de quelques cellules lymphocytaire au contact de cellules tumorales.(voir cercle). ad : adipocyte. ii : infiltrat lymphocytaire (→ ) : Cellule tumorale. (->) : cellule T CD8+

## DISCUSSION

---

### Discussion :

La réponse immune dans le cancer du sein est un mécanisme qui serait responsable de la progression tumorale et un facteur conditionnant la réponse aux molécules thérapeutiques cytotoxiques. Les lymphocytes intra tumoraux (TILs) sont le reflètent le microenvironnement tumoral, et leur développement peut être lié à la réponse clinique, suite à une chimiothérapie néoadjuvante. La réponse immune qui s'en suit (recrutement des cellules dendritiques, apprêtement et présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes) développe des mécanismes anti-tumoraux spécifiques qui limitent la dissémination des cellules cancéreuses. La présence de TILs serait donc de bon pronostic.

Notre étude a porté sur une série de 10 patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif, traitées par chimiothérapie néoadjuvante dans le cadre d'un essai clinique. Nous avons analysé des prélèvements biopsiques pré thérapeutiques et des prélèvements sur pièces opératoires après traitement, afin de mettre d'identifier les acteurs cellulaires de la réponse immune anti tumorale.

Notre étude a révélé une répartition de l'âge entre 36 et 65 ans avec une moyenne de 42 ans, dont une majorité de patientes entre 40 et 50 ans. D'après **gert stockmans et al., 2012**, les cancers triples négatifs ont tendance à toucher des patientes de moins de 50 ans. **Bauer et al., 2007**, ont observé un âge plus jeune (moins de 40 ans) sur une cohorte de 6370 patientes.

Dans notre étude le carcinome canalaire infiltrant [CCI] était exclusif ; ils étaient tous de grade III. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature (**Dent et al., 2007**). L'étude macroscopique des tumeurs a révélé une taille moyenne de 71.5 mm. **Dent et al., 2007**, rapportent que les tumeurs triple négatives ont une taille tumoral plus large que les tumeurs non triple négatives.

Les tumeurs TN sont sensibles à la chimiothérapie. L'accumulation de cellules cancéreuses apoptotiques, peut contribuer au développement de mécanismes immunitaires qui facilitent l'élimination des cellules cancéreuses vivantes (**Symmans et al., 2000**). L'étude histologique que nous avons effectué, à partir des prélèvements tumoraux montre que sur les trois zones analysées (périphérie, stroma et intra-tumoral), l'infiltrat inflammatoire se concentrait essentiellement à la périphérie de la tumeur (50% pour le niveau 1+, 30% pour le niveau 2+, et 10% pour le niveau 3+). Au niveau du stroma, le taux d'infiltrat inflammatoire était de 50% pour le niveau 1+, 30% sans infiltrat et 10% pour les niveaux 2+ et 3+. Une étude de **Demaria et al., 2001**, intéressant 25



## DISCUSSION

---

patientes, a retrouvait un taux d'infiltration inflammatoire minime chez 15 patientes (60%), modéré chez 5 patientes (20%), élevé chez une patiente (4%) et absent chez 4 patientes (16%).

**Salgado et al., 2015**, ont noté deux compartiments de l'infiltration lymphocytaire : autour de la tumeur et dans le stroma. Les lymphocytes qui se localisent dans le stroma et en intra tumoral ont été définis comme des TILs, ils sont localisés au sein de la niche tumorale. Les études de **Rovere et al., 1998 ; Ronchetti et al., 1999**, suggèrent que l'accumulation de cellules tumorales apoptotiques au-dessus d'un certain seuil peut déclencher l'activation de cellules dendritiques et la présentation antigénique, pour finalement aboutir à l'induction de lymphocytes T anti tumoraux. Une telle corrélation serait ajoutée comme un support à l'hypothèse que l'infiltration lymphocytaire présente une corrélation avec la réponse immunitaire anti tumorale protectrice (**Clemente et al., 1996 ; Naito et al., 1998**). Dans notre étude, nous avons constaté que le taux de l'infiltrat inflammatoire est plus important chez les patientes sans reliquat. Il existe de nombreuses publications qui prouvent que le système immunitaire inné et adaptatif jouent un rôle déterminant dans l'efficacité de la chimiothérapie, et que le système immunitaire lui-même peut être activé par des médicaments cytotoxiques. Le rôle positif des TILs, dans la réponse à la chimiothérapie a été rapporté dans de nombreuses études telles que celles de **Denkert et al., 2010 ; Yama gauchi et al., 2012 et Gu-Trantien, 2013. Denkter et al., 2014**, avancent que certains types de chimiothérapie, comme la carboplatine, ont une forte interaction avec le système immunitaire. **Denkert et al., 2010**, ont démontré que la présence de lymphocytes est hautement prédictive de la réponse aux anthracyclines et texanes en néoadjuvant.

L'étude immunohistochimique que nous avons réalisé a ciblée les marqueurs CD3, CD20, CD4 et CD8 spécifiques aux lymphocytes, lymphocytes B, LT4 et LT8 respectivement. L'étude de la distribution du niveau de l'infiltrat des cellules CD3+ et CD20+, nous a permis de constater un taux d'infiltration plus important chez les patientes sans reliquat. D'après **Whitford et al., 1992 et Chin et al., 1992**, les TILs dans le cancer du sein comprennent, en plus des cellules CD8+, une variété proportionnelle de cellules CD4+, de cellules B et rarement des cellules NK et sont plutôt retrouvés dans le CSTN et HER2-positif (**Yamaguchi et al., 2012 ; Ali et al., 2014**).

Les patientes en pCR ont un taux de cellules CD3+ plus prédominant que les cellules CD20+, ce qui est un marqueur de la valeur prédictive de la pCR (**Denkert et al., 2010 ; Hornychova al., 2008**). Ainsi, les lymphocytes T reflètent l'implication de l'interaction immunitaire de la tumeur en réponse à la chimiothérapie, alors que le rôle précis des cellules B est, actuellement pas bien défini, et reste controversé (**Mahmoud et al., 2012**).

## DISCUSSION

---

Notre étude a également révélé des taux importants de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> chez les patientes sans reliquat tumoral. Vu notre faible effectif nous n'avons pas réussi à établir un rapport CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

Dans le cancer du sein l'infiltration de la tumeur par les lymphocytes CD8 cytotoxique, a été fortement associée à la survie des patientes (**Mahmoud et al., 2011 ; Liu et al., 2014**) et la réponse au traitement (**Seo et al., 2013**).

**Gu-Trantien, et al., 2013**, ont révélé une prédominance des CD4<sup>+</sup> par rapport au CD8<sup>+</sup>, et suggèrent que la cytotoxicité de CD8<sup>+</sup> est minime chez les patientes non traitées. Des données récentes supportent le rôle complexe des cellules CD4<sup>+</sup>. Une infiltration lymphocytaire importante dans le cancer du sein est associée à une augmentation des populations CD4<sup>+</sup> Th1 et Tfh, et sont corrélés à une meilleure survie et un taux élevé de pCR. La présence de CD4<sup>+</sup> T reg a été associée à la fois avec un bon et mauvais pronostic (**Bates et al., 2006 ; West et al., 2013**).

Parmi les autres sous-populations de lymphocytes CD4<sup>+</sup>, les cellules Th1 la principale source cellulaire d'interféron, ont été associés à des résultats cliniques favorables (**Gu-trantien et al., 2013**), alors que les cellules Th2 ont été rapportées pour être associées à l'atténuation de la réponse anti-tumoral (**Ladoire et al., 2010**). La présence de cellules auxiliaires folliculaires, le plus récent des sous-ensembles CD4<sup>+</sup>, a récemment été associée positivement avec les résultats des patientes dans le traitement adjuvant et néoadjuvant (**Gnatiadis et al., 2012**).

Le résidu tumoral après la CNA dans le CSTN est considéré comme un marqueur très mauvais pour le pronostic (**Cortazar et al., 2014**). Par ailleurs la CNA peut résulter en une accumulation de TILs dans le résidu tumoral, et la déplétion de Treg, qui devrait présager d'une issue favorable. (**Demaria et al., 2001 ; Ladoire et al., 2008**). La CNA est, aussi, capable de favoriser l'infiltration tumoral par les macrophages, qui est associée à une augmentation du risque de récurrence (**Dieci et al., 2014 ; García-Martínez et al., 2014**).

La population de TILs stromal et intra tumorale sont hautement corrélées, bien que le stroma est observé avec un grand nombre de TILs et repartit une large variété entre les différentes tumeurs (**Denkert et al., 2010**). Alors que certaines tumeurs n'ont pas de TILs stromal, d'autres ont plus de 10,000 cellules immunitaires/mm<sup>2</sup> de tissu stromal. Les TILs stromal sont de vrais bio marqueurs, par rapport aux TILs intra tumoral, dans la prédiction de la thérapie et les résultats des patients.. (**Salgado et al., 2014 ; Denkert et al., 2010**). En outre, la croissance tumorale peut influencer la disposition des TILs dans une manière qui pourrait compromettre la comparaison entre les

## DISCUSSION

---

différentes tumeurs (**Salgado et al., 2014**). La croissance tumorale, quand elle est constituée de niche dense de cellules tumorales limitée par le stroma, est évaluée rapidement comme ayant un niveau élevé de TIL parce que le compartiment stromal est petit.

D'autre part, les tumeurs avec une croissance tumorale plus infiltrante et de plus grandes zones de stroma seront généralement marqués comme ayant un petit nombre de TILs (**Salgado et al., 2014**). De plus, des études menées par **Mahmoud et al., 2011** ; **Liu et al., 2014**, suggèrent que l'immunité adaptative médiée par les lymphocytes T et B constitue la base essentielle pour une réponse anti tumoral efficace et durable.

Malgré le faible effectif de notre série (ce qui ne nous a pas permis de réaliser une étude statistique), nos résultats suggèrent que le microenvironnement tumoral riche en cellules immunitaire, que ce soit à la périphérie de la tumeur, dans le stroma ou en intra-tumoral peut avoir un effet sur le processus tumoral, sous l'effet de la chimiothérapie néoadjuvante. Les cellules cancéreuses seraient éliminées par apoptose à l'aide de drogues cytotoxiques. Une étude avec un recrutement plus large et à l'aide d'une étude statistique robuste pourra confirmer les résultats présentés lors de cette étude.

## CONCLUSION

---

### **Conclusion :**

Notre étude dans son ensemble ; présente un intérêt tant sur le plan fondamental qu'appliqué.

Notre étude est une modeste contribution visant à rechercher une corrélation entre le niveau de l'infiltrat lymphocytaire et la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante, chez des patientes atteintes du cancer du sein triple négatif. Malgré un faible effectif, nous avons constaté que le traitement avait un effet activateur de l'immunité anti-tumorale. Cette immunité était principalement médiée par les lymphocytes T. De plus, la réponse pathologique augmentait en cas d'un niveau élevé de l'infiltrat lymphocytaire. Cette démarche pourrait constituer un facteur intéressant pouvant orienter l'approche thérapeutique.

En perspective, il serait intéressant d'augmenter le nombre de cas, et de corréler l'infiltrat lymphocytaire avec les facteurs clinico-pathologique.

## ANNEXES

### ANNEXE I

Classification moléculaire, profil immunohistochimique des différents sous-groupes

	RH	HER2	KI67	P53	CK5/6
<b>Luminal A</b>	Positif	Négatif	<14%	Taux très bas	/
<b>Luminal B</b>	Positif	Négatif	>14%	Taux élevé	/
<b>HER2 HER2/Luminal</b>	Négatif Positif	Positif Positif	Taux élevé	Taux élevé	/
<b>Triple négatif</b>	Négatif	Négatif	Taux élevé	Taux élevé	/
<b>Basal-like</b>	Négatif	Négatif	Taux élevé	Taux élevé	Positif

### ANNEXE II

Classification de Sataloff (1995)

Réponse sur le sein :

- TA : effet thérapeutique total ou pratiquement total
- TB : effet thérapeutique supérieur subjectivement à 50 %
- TC : moins de 50 % d'effet thérapeutique mais effet évident
- TD : pas d'effet thérapeutique

## ANNEXES

---

Réponse ganglionnaire :

<b>NA : effet thérapeutique évident, pas de métastases</b>
<b>NB : pas d'effet thérapeutique, pas de métastases</b>
<b>NC : aspects d'effet thérapeutique, mais présence de métastases</b>
<b>ND : pas d'effet thérapeutique, métastases viables</b>

### ANNEXE III

**Protocole A** : comprend 6 cures :

- Docetaxel (75mg/m<sup>2</sup>)
  - Carboplatine AUC5-6
  - 5 Fluorouracil (600 mg/m<sup>2</sup>)
  - Doxorubicin (60mg/m<sup>2</sup>)
  - Cyclophosphamide (600 mg/m<sup>2</sup>)
- 3cures
- 3 cures

**Protocole B** : comprend 6 cures :

- Docetaxel (100mg/m<sup>2</sup>)
  - 5 Fluorouracil (600 mg/m<sup>2</sup>)
  - Doxorubicin (60mg/m<sup>2</sup>)
  - Cyclophosphamide (600 mg/m<sup>2</sup>)
- 3cures
- 3 cures

# ANNEXES

---

## ANNEXE IV

### Matériels et Appareillages :

- Lames silanisées / Lamelles, réf. S2024.
- Agitateur.
- Appareil d'inclusion en paraffine (Leica Microsystems, modèle EG 1160, D-69226 Nussloch)
- Appareil de circulation automatique (Leica TP1020)
- Bacs en verre avec panier en verre
- Bain marie
- Balance de précision
- Cassettes en plastique
- Chambre humide
- Etuve thermostatées
- Station de déshydratation (Leica ST4040)
- Micropipettes réglables avec cônes adaptable (10-100µl)
- Microscope photonique Zeiss
- Microtome (Leica, Model RM2125)
- Minuteur
- Station de déshydratation. (Leica ST4040)
- Portes lames
- Réfrigérateur
- stylo délimitant : DAKO Pen (code 52002)
- Graveur (diamantin).

## ANNEXES

---



Appareil de circulation automatique (Leica TP1020) Automate d'inclusion (Leica TP 1020)



Microtome Leica



Bain marie



Automate de coloration HE (Leica ST4040)



Microscope photonique Zeiss



# ANNEXES

## Annexe V

### Grade histopronostique de Scarff Bloom Richardson (SBR)

<b><u>Différenciation tubulo-glandulaire</u></b>
Proportion de tubes ou glandes dans la tumeur (en % de surface tumorale)
• > 75% : tumeur bien différenciée : 1
• 10-75% : tumeur moyennement différenciée : 2
• < 10% : tumeur peu différenciée : 3
<b><u>Pléomorphisme nucléaire : degré d'atypie</u></b>
Apprécié sur la population tumorale prédominante
• Noyaux petits, réguliers, uniformes : 1
• Pléomorphisme modéré : 2
• Variation marquée de taille, de forme, avec nucléoles proéminents : 3
<b><u>Nombre de mitoses</u></b>
À compter au grossissement x 400 ;
• 1 sur quelques champs : 1
• 2 sur la majorité des champs : 2
• > 3 sur la majorité des champs : 3
<b><u>Score total par addition des 3 paramètres</u></b>
• 3-4-5 : Grade I
• 6-7 : Grade II
• 8-9 : Grade III

# ANNEXES

---

## Annexe VI

### . Technique histologique

#### a-Principe :

L'analyse histologique consiste à observer au microscope, les fragments de prélèvements opératoires afin d'identifier la nature des cellules composant la lésion.

Cet examen représente l'étape cruciale de l'analyse anatomopathologique, car il va permettre de définir :

- s'il s'agit d'une tumeur ou non,
- s'il s'agit d'une tumeur maligne (cancer) ou non,
- de classer cette tumeur maligne,
- de classer le type de sarcome selon la classification internationale de l'OMS 2002.

#### a. Mode opératoire :

##### **Fixation**

Le but de la fixation est de conserver les structures. En effet, le prélèvement des tissus provoque leur mort : les cellules déversent leurs enzymes, ce qui provoque une autodigestion du tissu. De plus, à l'air ambiant, les prélèvements peuvent être contaminés par des bactéries, ce qui entraîne une putréfaction des tissus.

Intérêts de la fixation :

- immobilisation des constituants tissulaires/cellulaires ;
- prévient l'autolyse cellulaire ;
- prévient de la putréfaction bactérienne post-mortem ;
- permet la technique histologique et les colorations ultérieures.

Le fixateur le plus commun en microscopie optique (MO) et le plus utilisé dans le monde est le formol à 4% (formaldéhyde à 10%).

Son principe repose sur le fait qu'il réagit avec les groupements aminés des protéines. La durée de fixation est variable et la quantité de fixateur utilisée doit être au moins dix fois plus importante que le volume de tissu à fixer : quelques heures suffisent donc pour fixer les petits fragments.

## ANNEXES

---

Le fixateur souvent utilisé en France est le liquide de Bouin (acide picrique+formol+acide acétique+eau).

Il présente le désavantage de provoquer un phénomène d'auto-fluorescence cellulaire pouvant gêner les observations au microscope photonique à fluorescence. Il dégrade aussi rapidement les acides nucléiques.

Rôle du fixateur :

- précipitation, polymérisation, coagulation des protéines ;
- mise en place des liaisons covalentes ;
- tue les cellules ;
- blocage des réactions enzymatiques.

### □ L'inclusion

Pour que la lumière puisse passer à travers le tissu à examiner, celui-ci doit être très fin. Or les tissus sont mous, il faut donc leur donner une consistance solide. C'est le principe de l'inclusion :

L'inclusion en paraffine consiste à infiltrer et à enrober les tissus à examiner avec de la paraffine.

L'inclusion est précédée de deux étapes essentielles présentées dans le tableau I. Il faut tout d'abord procéder à la déshydratation : on passe les tissus dans des bains d'alcool de degré croissant (70°, 80°, 90°, 95°, 99°, puis enfin 100°) pour éliminer le fixateur. L'alcool (éthanol) est ensuite remplacé par un solvant miscible à la paraffine : il s'agit soit de xylène, soit de toluène (hydrocarbures). Ces substances éliminent l'éthanol.

Au fur et à mesure de leur infiltration par le solvant, les tissus ont tendance à s'éclaircir : cette étape est donc parfois appelée éclaircissement ou clarification. Une fois totalement imprégné, le tissu est placé dans de la paraffine fondue (portée à 56/58°C) ; la chaleur provoque l'évaporation du solvant (et sa dissolution dans la paraffine) : les espaces ainsi libérés sont remplis par la paraffine.

Puis la paraffine est placée dans de petits moules, à température ambiante, ce qui provoque son durcissement et donc la rigidification des fragments tissulaires prélevés. On procède alors au démoulage : on obtient des fragments.

## ANNEXES

**Tableau VI:** Tableau récapitulative des différentes étapes pour confection des coupes.

Étapes	Réactifs	But
Déshydratation	Ethanol	Le tissu est débarrassé de l'eau qu'il contient dans six bains d'alcool de concentration croissante.
Eclaircissement	Xylène	L'éthanol est remplacé par un solvant miscible à la paraffine, le xylène qui réalise l'éclaircissement dans trois bains de permettant l'obtention d'un tissu plus transparent.
Imprégnation	Paraffine	Pénétration de paraffine dans le tissu dans 2 bains ; obtention de tissu plus rigide.

### □ La microtomie

Les coupes sont ensuite isolées dans le bloc de paraffine. On utilise pour cela un microtome, qui fait avancer le bloc sur un rasoir : le bloc avance d'environ de 3 à 4  $\mu$  à chaque fois (en MO classique, les coupes mesurent environ 5  $\mu$ m). L'ensemble des tranches vont former un ruban dans lequel on retrouve des coupes sériées de prélèvement tissulaire.

### □ L'étalement :

Ces derniers sont étalés dans un bain marie pour dissoudre la paraffine, on récupère les rubans avec les lames (sans oublier de graver le numéro de dossier sur les lames).

## ANNEXES

---

### □ Séchage :

Le séchage des lames se fait dans l'étuve à 60°C pendant 20 min pour favoriser l'adhésion de ces rubans sur les lames.

### □ Coloration

Les tissus de l'organisme ne sont pas spontanément colorés, ce qui rend les observations difficiles. Les colorants utilisés au cours de notre étude est celle de l'hématoxyline-éosine, qui met en évidence respectivement le noyau et le cytoplasme.

Hématoxyline est préparée par le fournisseur et l'éosine par le personnel du laboratoire, la coloration est faite par un automate de coloration qui contient 27 bacs où les lames vont séjournées 1 minute dans chacun avant d'être transféré au suivant. Cette technique associe une coloration nucléaire en bleu grâce à l'hématoxyline de Harris (coloration basique) et une coloration rose de cytoplasme grâce à l'éosine (coloration acide).

Avant d'effectuer la coloration, les coupes subissent une étape de déparaffinage et de réhydratation.

Après la coloration les lames sont montées pour préserver les colorations, présente dans le tableau VII .Les lames sont déshydratées grâce à des bains en toluène, puis on colle des lamelles de verre par-dessus (grâce à des résines synthétiques) afin de préserver les préparations. Les lames ainsi montées peuvent être conservées pendant plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années.

## ANNEXES

**Tableau VII:** Etape de coloration de l'hématoxyline-éosine.

<b>Étapes</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Principe</b>
<b>Déparaffinage et réhydratation</b>	Xylène	3 bains (5 minutes chaque bac), pour le déparaffinage.
	Ethanol	4 bains d'éthanol de concentration décroissante (une minute par bac) pour la réhydratation.
<b>Coloration de l'hématoxyline de Harris</b>	Hématoxyline de Harris	1 bain de 3 min suivi d'un rinçage à l'eau courante, ceci permet de colorer les noyaux en bleu.
<b>Coloration à l'éosine</b>	Eosine	1 bain d'une min suivi d'un rinçage à l'eau courante, ce qui colore le cytoplasme en rose.
<b>Déshydratation et éclaircissement</b>	Ethanol	Bain de concentration croissante pour déshydrater.
	Xylène	Bain de xylène pour éclaircir les tissus.
<b>Montage des lames</b>	Eukitt	Dépôt d'une goutte du milieu de montage lequel est recouverte d'une lamelle.

- **Observation microscopique et prise de photos.**

# ANNEXES

---

## Annexe VII

### 1) Classification TNM du cancer du sein, 7e édition, 2009, et stade UICC

Le système TNM distingue le stade clinique pré-thérapeutique noté « cTNM » et le stade anatomopathologique post-chirurgical noté « pTNM ».

#### Tumeur primitive T :

Tx : la tumeur primitive ne peut pas être évaluée

T0 : la tumeur primitive n'est pas palpable

-Tis : carcinome in situ

-Tis (DCIS) : carcinome canalaire in situ

-Tis (CLIS) : carcinome lobulaire in situ

-Tis (Paget) : maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente

NB : la maladie de Paget associée à une tumeur est classée en fonction de la taille de la tumeur

T1 : tumeur de 2 cm et moins dans sa plus grande dimension

T1mi : micro-invasion  $\leq 1$  mm dans sa plus grande dimension

NB : en cas de plusieurs foyers la taille du plus grand foyer est considéré et non la somme des foyers.

-T1a :  $1 \text{ mm} < \text{tumeur} \leq 5 \text{ mm}$  dans sa plus grande dimension

-T1b :  $5 \text{ mm} < \text{tumeur} \leq 1 \text{ cm}$  dans sa plus grande dimension

-T1c :  $1 \text{ cm} < \text{tumeur} \leq 2 \text{ cm}$  dans sa plus grande dimension

T2 :  $2 \text{ cm} < \text{tumeur} \leq 5 \text{ cm}$  dans sa plus grande dimension

T3 : tumeur  $> 5 \text{ cm}$  dans sa plus grande dimension

T4 : tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b)

-T4a : extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral

-T4b : oedème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau du même sein

-T4c : T4a + T4b

-T4d : cancer inflammatoire.

## ANNEXES

---

### **Ganglions lymphatiques régionaux pN**

Nx : l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué (par exemple déjà enlevés chirurgicalement ou non disponibles pour l'analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement)

N0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées

NB : les cellules isolées, ou les petits amas de moins de 0.2mm détectés par HE ou IHC.

N1 : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique

-N1mi : micrométastases > 0,2 mm et < 2 mm

-N1a : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires, dont au moins un ganglion siège d'un foyer de 2 mm.

-N1b : envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique

-N1c : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique (pN1a + pN1b)

N2 : envahissement ganglionnaire comme décrit ci-dessous :

-N2a : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire > 2 mm

-N2b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire.

N3 : envahissement ganglionnaire comme décrit ci-dessous :

-N3a : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires (avec au moins un amas cellulaire > 2 mm) ou envahissement des ganglions sous-claviculaires

-N3b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique

-N3c : envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux

### **Métastases à distance (M)**

MX : renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance

M0 : absence de métastases à distance

M1 : présence de métastase(s) à distance.



## ANNEXES

---

### Classification par stade UICC

<b>0</b>	<b>Tis N0 M0</b>
<b>I</b>	<b>T1 N0 M0</b>
<b>IIA</b>	<b>T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0 ;</b>
<b>IIB</b>	<b>T2 N1 M0 ; T3 N0 M0</b>
<b>IIIA</b>	<b>T0 N2 M0 ; T1* N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0</b>
<b>IIIB</b>	<b>T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0</b>
<b>IIIC</b>	<b>Tous T N3 M0</b>
<b>IV</b>	<b>Tous T Tous N M1</b>
T1* : inclus les T1 mic	

## Références

---

Ali, H. R. et al. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann. Oncol.* 25, 1536–1543.

An T, Sood U, Pietruk T et al. (1987). In situ quantification of inflammatory mononuclear cells in ductal infiltrating breast carcinoma. Relation to prognostic parameters. *Am J Pathol*; 128: 52–60.

Aude-Hélène Capietto. (2010) . Immunothérapie anti-cancéreuse et lymphocytes T-Vgamma9Vdelta2 : stratégies contre l'échappement tumoral. Doctorat de l'université de toulouse .Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier.

Baniyash, M., Sade-Feldman, M. & Kanterman, J. (2014). Chronic inflammation and cancer: suppressing the suppressors. *Cancer Immunol. Immunother.* 63, 11-20.

Barry, M. & Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 401-9.

Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, et al (2012). Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): A randomised, openlabel, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* 379:633-640.

Bates GJ, Fox SB, Han C et al. (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*; 24: 5373–5380

Belkaid, Y. & Oldenhove, G. (2008). Tuning Microenvironments: Induction of Regulatory T Cells by Dendritic Cells. *Immunity* 29, 362-371.

Bolpetti, A., Silva, J. S., Villa, L. L. & Lepique, A. P. (2010). Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunol.* 11, 27.

## Références

---

Bourggiera C, Heymann S, Vielh P, Azria D. (2012). Implications radiobiologiques de la classification moléculaire des cancers du sein : présent ou avenir ? *cancer/radiothérapie* 16, 29-33.

Boyd NF, Byng JW, Jong RA, et al. (1999). Quantitative classifications of mammographic densities and breast cancer risk: results from the Canadian national breast screening study. *J Natl Cancer Inst*; 87:670-5.

Breast cancer in developing countries. *The Lancet* (2009); Vol 374, November 7.

Bui, J. D. & Schreiber, R. D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* 19, 203-8.

Buist DS, Abraham LA, Barlow WE, et al. (2010). Diagnosis of second breast cancer events after initial diagnosis of early stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 124(3):863-73.

Campoli, M. (2012). HLA antigen and NK cell activating ligand expression in malignant cells: a story of loss or acquisition. *Semin Immunopathol.* 33, 321-334

Carsten Denkert, Gunter von Minckwitz, Jan C. Brase, Bruno V. Sinn, Stephan Gade, Ralf Kronenwett, Berit M. Pfitzner, Christoph Salat, Sherene Loi, Wolfgang D. Schmitt, Christian Schem, Karin Fisch, Silvia Darb-Esfahani, Keyur Mehta, Christos Sotiriou, Stephan Wienert, Peter Klare, Fabrice André, Frederick Klauschen, Jens-Uwe Blohmer, Kristin Krappmann, Marcus Schmidt, Hans Tesch, Sherko Kümmel, Peter Sinn, Christian Jackisch, Manfred Dietel, Toralf Reimer, Michael Untch, and Sibylle Loibl. 2014

Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R. & Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* 6, 15-25

## Références

---

Chin, Y. *et al.* (1992). Phenotypic analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from human breast cancer. *Anticancer Res.* **12**, 1463–1466

Chivukula M, Striebel JM, Ersahin C, Dabbs DJ (2008) Evaluation of morphologic features to identify “basal-like phenotype” on core needle biopsies of breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 16:411–416

Clemente, C. G., Mihm, M. C., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N.(1996) Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer (Phila.)*, 77: 1303–1310.

Cochaud, S. *et al.* (2013). IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Sci. Rep.* **3**, 3456

Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. **22**, 633-640

Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. (2014). Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 384, 164–172

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2001) Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet.*; 358(9291):1389-99.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2012 )Menarche, menopause, and breast cancer risk : individual participant meta-analysis, including 118964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet.* Nov; 13(11): 1141-51.

## Références

---

Cortazar, p.et al. ( 2014). Pathological complete reponse and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 384, 164-172

Coussens, L.M., Pollard, J.W.,(2011). Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 3.

Crosti, M. C., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rugarli, C., and Manfredi, A. A. (1998) Cutting edge: bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigenpresenting function. *J. Immunol.*, *161*: 4467–4471.

De Haart, S. J. *et al.* (2013). Accessory cells of the microenvironment protect multiple myeloma from T-cell cytotoxicity through cell adhesion-mediated immune resistance. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5591-601.

Dent R, trudeau m, Pritchard kl, et al. (2007). Triple negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin cancer res*; 13(15 pt 1) : 4429-34.

Denkert c, loibi s, et al (2010) .tumor associated lymphocytes as an independent predictore of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J clin oncol* 28: 105-113.

Demaria, S. *et al.* (2001). Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3025–3030.

Diaz LK, cryns VL, Symmans WF, Sneige N. (2007) triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. *Adv Anat pathol*; 14:419-30.

Dogan L, Atalay C, Yilmaz KB, Ozaslan C (2008) Prognosis in hormon receptor negative breast cancer patients according to ERBB2 status. *Neoplasma* 55:544–548.

## Références

---

Dranoff, G., (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4(1): p.11-22.

DuPage, M., Mazumdar, C., Schmidt, L. M., Cheung, A. F. & Jacks, T. (2012). Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature* **482**, 405-9

Elkord, E. *et al.* (2010). Review T regulatory cells in cancer: recent advances and therapeutic potential. 1573-1586

Erb, P. *et al.* (2005). Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation. *Immunol. Lett.* **100**, 68-72

Escamilla-Tilch, M. *et al.* (2013). The interplay between pathogen-associated and danger-associated molecular patterns: an inflammatory code in cancer? *Immunol Cell Biol* **91**, 601-10.

Fisher, B., Redmond, C., Fisher, E. & Caplan, R. (1988). Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 6, 1076-1087.

Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N, Trudel M, Akslen LA. (2003) Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95:1482-1485.

Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Bégin LR, Hamel N, Goffin JR, Wong N, Trudel M, Kapusta L, Porter P, Akslen LA (2004) The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53<sup>low</sup>/glomeruloid-microvascular-proliferation?) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res.* 2004; 64:830-835.

## Références

---

Freres p.j., collignon, c.gennigens. (2010) 'le cancer du sein triple négatif'. Rev med liège ; 65 :3 : 120-126

Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, Lakhani SR, Hanby A (2006). Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 49:22–34

Ivanov, I. I. *et al.* (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-33

Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162-74

Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ (2007). Global cancer facts & figures 2007. American Cancer Society, Atlanta, GA

Gianni L, Pienkowski T, Im YH, et al. (2012) Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): A randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 13:25-32.

Gordon, S. & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* **32**, 593–604 .

Globocan (2008). <http://globocan.iarc.fr/>.

Gnatiadis M, Singhal SK, Desmedt C et al. (2012) Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis. *J Clin Oncol*; 30: 1996–2004.

Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, et al. (2009) . Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9:353-363.

## Références

---

Griffith TS, Kazama H, VanOosten RL, et al. (2007). Apoptotic cells induce tolerance by generating helpless CD8-T cells that produce TRAIL. *J Immunol* 178:2679-2687.

Guendouz.H. (2014 ) . cancer du sein de la femme de moins de 35 ans : aspects épidémiologiques, pronostiques et thérapeutiques. Université d'Alger, faculté de médecine d'Alger .238p.

Gu-trantien c, loï s, garaud s, et al. (2013). CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J clin invest* 123 : 2873-2892.

Hadden, J. W. (1999). The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update. *Int. J. Immunopharmacol.*, 21: 79–101.

Hannoun.D. ( 2001 ). Etude de facteurs de risque du cancer du sein en Algérie. Thèse de doctorat de l'université de Montpellier I. Université de Montpellier I, faculté de médecine.

He, G. & Karin, M. (2011). NF-κB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* 21, 159-68

Hsieh, C. *et al.* (2014). Pillars Article: Development of T H 1 CD4 + T Cells through IL-12 Produced by Listeria.

Hu X, Stern HM, Ge L, O'Brien C, Haydu L, Honchell CD, Haverty PM, Peters BA, Wu TD, Amler LC, Chant J, Stokoe D, Lackner MR, Cavet G (2009). Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes. *Mol Cancer Res* 7:511–522

Junttila M R, Evan G I. (2009). p53 - a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer*, vol 9: 820-829.

Kanterman, J., Sade-Feldman, M. & Baniyash, M. (2012). New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Semin. Cancer Biol.* 22, 307–318



## Références

---

Kim, M.-K., Kim, K., Han, J. Y., Lim, J. M. & Song, Y. S. (2011). Modulation of inflammatory signaling pathways by phytochemicals in ovarian cancer. *Genes Nutr.* **6**, 109-15.

Kirkin, V., Joos, S. & Zörnig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**, 229-49

K.R Bauer, M. Brown, R.D. Cress, et al., descriptive analysis of estrogen receptor (ER) negative, progesterone receptor (PR) and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype, a population-based study from the California cancer registry, *cancer* 109 ( 9 ) (2007 ) 1721-1728.

Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. (1999) . Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary and axillary lymph node response to doxorubicin based neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol*; 17:460–467.

Ladoire, S. *et al.* (2008). Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2413–2420.

Ladoire S, Arnould L, Mignot G et al. (2011) T-bet expression in intratumoral lymphoid structures after neoadjuvant trastuzumab plus docetaxel for HER2-overexpressing breast carcinoma predicts survival. *Br J Cancer*; 105: 366–371.

Lacroix, M., Toillon, R.A., Leclercq, G., (2006). P53 and breast cancer, an update. *Endocr. Relat. Cancer* **13**, 293–325.

Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, Bishop T, Benitez J, Rivas C, Bignon YJ, Chang-Cluade J, Hamann U, Cornelisse CJ, Devilee P, Beckmann MW, Nestle-Kromling C, Daly PA, Haites N, Varley J, Lalloo F, Evans G, Maugard C, Meijers-Heijboer H, Klijn JG, Olah E, Gusterson BA, Pilotti S, Radice P, Schermeck S, Sobol H, *et al.* (2005). Breast Cancer Linkage Consortium:

## Références

---

Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res*, 11:5175-5180.

Lakhani SR, Lakhani SR, Hanby A (2006) Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 49:22–34

Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. Doi: 10.1172/JCI45014DS1.

Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, pal B, Hart AH, Asselin-labat ML, Gyorki DE, Ward T, Partanen A, Feleppa F, Huschtscha LI, Thorn HJ ; KconFab, Fox SB, Yan M, French JD, Brown MA, Smyth GK, Visvader JE, Lindeman GJ. (2009) Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med.*; 15 :907-13.

Liu S, Foulkes WD, Leung S et al. (2014) .Prognostic significance of FOXP3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res*; 16: 432.

Liu S V, Melstrom L, Yao K, Russell CA, Sener S F. (2010). Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer. *Journal of Surgical Oncology*; 101: 283- 291.

Lostumbo L, Carbine NE, Wallace J. *Prophylactic mastectomy for the prevention of breast cancer*. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2004 Oct 18 ;(4):CD002748.

Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG et al. (2011) Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*; 29: 1949–1955.

## Références

---

Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC et al. (2012) The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat*; 132: 545–553.

Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S, et al. (2008) .The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. *Blood*; 111: 4653–9.

Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D. R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ . *Nat. Immunol.* **9**, 641-9.

Mantovani, A., Germano, G., Marchesi, F., Locatelli, M. & Biswas, S. K. (2011). Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2522-5.

Mathieu M.C. (2007) les sous-types moléculaires des cancers du sein. La lettre de sénologue-- n° 38-octobre-novembre-décembre

Michels, J.-J., Marnay, J., Delozier, T., Denoux, Y. & Chasle, J. (2004). Proliferative activity in primary breast carcinomas is a salient prognostic factor. *Cancer* **100**, 455-64.

Mombelli S. ( 2014 ) . Cancers du sein et Immunologie anti-tumorale, université de Reims Champagne-Ardenne, Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé

Moss SM. (1997) Breast carcinoma mortality rates and screening. *Cancer*; 79:1-2.

Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R. & Johansson, C. C. (2010). Regulatory T cells in cancer. *Adv. Cancer Res.* **107**, 57-117

Mullan PB, Quinn JE, Harkin DP. (2006) The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene.*; 25 : 5854-63.

## Références

---

Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., and Ohtani, H. (1998) .CD8<sub>+</sub> T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58: 3491–3494,

Nicholls, C., Pinto, A.R., Li, H., Li, L., Wang, L., Simpson, R., Liu, J.P., (2012). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) induces cancer cell senescence by interacting with telomerase RNA component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 13308–13313..

Nishimura R, Arima N., (2008). Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? *Breast Cancer* 15:303–308

Nkondjock A, Ghadirian P. (2005) Facteurs de Risque du cancer du sein. *Medecine/Science*; 21:175-180.

Nofech-Mozes S, Trudeau M, Kahn HK, Dent R, Rawlinson E, Sun P, Narod SA, Hanna WM. ( 2009). patterns of recurrence in the basal and non basal subtypes of triple-negative breast cancers. *Breast cancer Res Treat* 118: 131-137.

Offit K, Brown K, Quantitating familial cancer risk: a resource for clinical oncologists. *J Clin Oncol.* 1994 Aug; 12(8): 1724-36.

Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, Hirata T, Yonemori K, Ando M, Tamura K, Katsumata N, Kinoshita T, Takiguchi Y, Tanzawa H, Fujiwara Y. (2012). Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 132:793–805.

Padua, D. & Massagué, J. Roles of TGFβ in metastasis. *Cell Res.* **19**, 89-102 (2009). 178.

## Références

---

Pannier M (2012). L'appropriation de la décision éclairée et de ses outils chez Les infirmières dans le cadre du programme québécois de Dépistage du cancer du sein. Université Du Québec À Montréal

Parkin DM, Ferlay J, Hamdi-Cherif M. (2003) .Cancer in Africa: epidemiology and prevention. IARC Press, Lyon.

penault-liorca.f. (2007) classification moléculaire des cancers du sein. Implication pratiques. Cancer du sein, compte rendu du cours supérieur francophone de cancérologie ( Saint-Paul-de-vence, p : 289-295).

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. Nature. ; 406:747-52.

Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia PL, Komminoth P, Lees JA, Mulligan LM, Mutter GL, Eng C (1999) Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. Am J Pathol 155:1253–1260.

Peter savas, Roberto salgado, carsten denkert, christo sotiriou Philip K. darcy, mark J Smyth and sherene loi (2015) clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. Reviews 1-14(6 )

Pollard, J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat. Rev. Cancer 4, 1-8

Rakha EA, El-sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. (2007) Prognostic markers in triple-negative breast cancer. Cancer; 109: 25-32.A

Rehman, A. G. *et al.* (2010). Incident cancer burden attributable to excess body mass index in 30 European countries. Int. J. Cancer **126**, 692–702

## Références

---

Richard. C. ( 2012 ). Cancer du sein Triple Négatif : Ciblage du Syndecan-1 pour la Radioimmunothérapie et l'immuno TEP. Thèse de doctorat de l'université de Nantes, faculté de médecine.

Ronchetti, A., Rovere, P., Iezzi, G., Galati, G., Heltai, S., Protti, M. P., Garancini, M. P., Manfredi, A. A., Rugarli, C., and Bellone, M. (1999 ) .Immunogenicity of apoptotic cells *in vivo*: role of antigen load, antigenpresenting cells, and cytokines. *J. Immunol.*, *163*: 130–136,

Rovere, P., Vallinoto, C., Bondanza, A., Crosti, M. C., Rescigno, M., Ricciardi Castagnoli, P., Rugarli, C., and Manfredi, A. A. (1998).Cutting edge: bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigenpresenting function. *J. Immunol.*, *161*: 4467–4471,

Rygiel, T. P., Stolte, E. H., de Ruiter, T., van de Weijer, M. L. & Meyaard, L. (2011). Tumor-expressed collagens can modulate immune cell function through the inhibitory collagen receptor LAIR-1. *Mol. Immunol.* **49**, 402-6

Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmstroöm PO, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R (2005) PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 65:2554–2559.

Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Persson C, Lovgren K, Jumppanen M, Staaf J, Johnson G, Pires MM, Maurer M, Holm K, Koujak S, Subramaniam S, Vallon-Christersson J, Olsson H, Su T, Memeo L, Ludwig T, Ethier SP, Krogh M, Szabolcs M, Murty VV, Isola J, Hibshoosh H, Parsons R, Borg A (2008) Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nat Genet* 40:102–107

## Références

---

Salgado, R. *et al.* (2015). Tumor-infiltrating lymphocytes and associations with pathological complete response and event-free survival in HER2-positive early-stage breast cancer treated with lapatinib and trastuzumab. *JAMA Oncol.* **1**, 448.

Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. (1995). Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast : a determinant of outcome. *J Am Coll Surg* 1995; 180:297-306.

Savas, P.S. *et al.* (2015). Lack of correlation neoantigens arising from tumor somatic mutations with tumor infiltrating lymphocytes ( TILs) or survival in HER2-positive breast cancer ( HER2+BC) . [Abstract] *J.clin. oncol.*33, a613.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D, .( 2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc natl acad sci USA*.

Stagg J, Loi S, Divisekera U *et al.* (2011) Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*; 108: 7142–7147.

Stockmans .G., Deraedt.K., Wildiers.H., Moerman.P., and Paridaens. R. ( 2012 ) .Triple-negative breast cancer . *pub med.*, (20) :614-620.

Tian XS, Cong MH, Zhou WH, Zhu J, Chen YZ, Liu Q (2008) Clinicopathologic and prognostic characteristics of triple-negative breast cancer. *Onkologie* 31:610–614.

Tim C. de Ruijter • Jürgen Veeck • Joep P. J. de Hoon • Manon van Engeland • Vivianne C. Tjan-Heijnen. (2011) . Characteristics of triple-negative breast cancer. *Rev springer. J cancer res clin oncol* 173: 183-192

Toso, J. F., Oei, C., Oshidari, F., Tartaglia, J., Paoletti, E., Lyerly, H. K., Talib, S., and Weinhold, K. J. (1996) MAGE-1-specific precursor cytotoxic T-lymphocytes

## Références

---

present among tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with breast cancer: characterization and antigen-specific activation. *Cancer Res.*, 56: 16–20.

Tubiana M, Koscielny S. (1987 ) [natural history of human cancer and prognostic factors. The example of breast cancer]. *Bull Cancer*; 74:43-57.

Tubiana M, Koscielny S. (1990) The natural history of breast cancer: Implications for a screening strategy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 19:1117-1120.

Umansky, V. & Sevko, A. (2012). Overcoming immunosuppression in the melanoma microenvironment induced by chronic inflammation. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 275-82.

Untch M, Fasching PA, Konecny GE, et al., (2011) .Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2– overexpressing breast cancer: Results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol* 29:3351-3357.

Van der Hage, J. A. *et al.* (2001). Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J. Clin. Oncol.* **19**, 4224–37

Van Sprundel TC, Schmidt MK, Rookus MA, et al. (2005) Risk reduction of contralateral breast cancer and survival after contralateral prophylactic mastectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer*; 93:287-92.

Vesely, M. D. & Schreiber, R. D. (2014). Cancer Immunoediting: antigens, mechanisms and implications to cancer immunotherapy. *Ann NY Acad Sci* **1284**, 1-5.

Vitale, M., Cantoni, C., Pietra, G., Mingari, M. C. & Moretta, L. (2014). Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1582-92.



## Références

---

Von Andrian UH, Mempel TR. (2003) Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol.*; 3: 867–78.

West NR, Kost SE, Martin SD et al. (2013) . Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer*; 108: 155–162.

Whitford, P., George, W. D. & Campbell, A. M. (1992). Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocyte activation and tumour cell MHC class I and II expression in breast cancer patients. *Cancer Lett.* 61, 157–164.

Whiteside, T. L. (2007). The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment. *Immunol. Invest.* 36, 25-46

Whiteside, T. L. (2014). Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol. Immunother.* 63, 67–72 .

Wolmark, N., Wang, J., Mamounas, E., Bryant, J. & Fisher, B. (2001). Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 152:12, 96–102 .

Xu, D., Takeshita, F., Hino, Y., Fukunaga, S., Kudo, Y., Tamaki, A., Matsunaga, J., Takahashi, R.U., Takata, T., Shimamoto, A., Ochiya, T., Tahara, H., (2011). MiR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J. Cell Biol.* 193, 409–424.

Yamaguchi, R. *et al.* (2012). Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum. Pathol.* 43, 1688–1694.